

Índice.

	Páginas
Introducción.	1
1. La flor de <i>Arabidopsis</i> .	3
2. Desarrollo floral.	3
3. Estructura del fruto de <i>Arabidopsis</i> .	6
4. Factores genéticos que controlan el desarrollo del gineceo.	8
4.1- De hoja a carpelo.	8
4.2- Organización del carpelo.	10
a) Organización adaxial-abaxial.	10
b) Organización medio-lateral.	11
c) Desarrollo del dominio lateral del carpelo.	13
d) Desarrollo de los tejidos marginales del carpelo.	14
e) Establecimiento de la polaridad apical-basal.	16
f) Cambios tras la fertilización del fruto.	19
5. Nuevos factores de transcripción implicados en el desarrollo del gineceo: los genes <i>NGA</i> .	19
Objetivos.	23
Resultados.	27
Capítulo 1. Caracterización de los genes <i>NGATHA</i>.	29
1.1. Búsqueda de mutantes de inserción para los genes <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	30
1.2. Caracterización fenotípica de los mutantes <i>nga1-4</i> y <i>nga2-2</i> .	37
1.3. Estudio del patrón de expresión de los genes <i>NGA</i> .	38
1.4. Localización subcelular de las proteínas <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	42
1.5. Estudio del papel de los genes <i>NGA</i> en el desarrollo del gineceo.	45
1.5.1 <i>Caracterización fenotípica de los mutantes nga.</i>	45
1.6. Obtención de líneas de sobreexpresión para el gen <i>NGA1</i> .	53
1.6.1. <i>Caracterización fenotípica y genética de las plantas transgénicas.</i>	54
Capítulo 2. El papel de los genes <i>NGA</i> en las rutas de señalización hormonal.	57
2.1. Los mutantes <i>nga</i> tienen afectada la respuesta a auxinas.	57
2.2. Relación entre brasinoesteroides y auxinas.	62
Capítulo 3. El papel de los genes <i>NGA</i> en la morfogénesis a los largo del eje apical-basal del gineceo.	65
3.1. Interacción de <i>STY</i> y <i>NGA</i> en el desarrollo del estilo.	65

3.2. <i>STY</i> y <i>NGA</i> son necesarios para la activación de <i>YUC4</i> .	76
3.3. <i>NGA</i> y otros genes implicados en la diferenciación del eje apical-basal del gineceo.	80
3.3.1. Interacción genética entre <i>SPT</i> y <i>NGA</i> .	80
3.3.2. Interacción genética entre <i>ETT</i> y <i>NGA</i> .	84
Capítulo 4. El papel de los genes <i>NGA</i> en la regulación de los genes que participan en la morfogénesis a lo largo del eje medio-lateral del gineceo.	89
Discusión.	101
1. Caracterización de los genes <i>NGA</i>.	103
1.1. Los genes <i>NGA</i> codifican proteínas de la superfamilia B3 de <i>Arabidopsis</i> .	103
1.2. Caracterización funcional de los alelos <i>nga1-4</i> y <i>nga2-2</i> .	104
1.3. Redundancia funcional de los genes <i>NGA</i> en el desarrollo de los tejidos apicales del gineceo.	105
1.4. Patrón de expresión de <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	107
1.5. Localización subcelular de las proteínas <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	111
1.6. Efecto de la sobreexpresión de <i>NGA</i> en la morfología del fruto.	112
2. El papel de los genes <i>NGA</i> en las rutas de señalización hormonal.	114
3. El papel de los genes <i>NGA</i> en la morfogénesis a lo largo del eje apical-basal del gineceo.	115
3.1. <i>STY</i> y <i>NGA</i> son necesarios para la especificación del estilo.	115
3.2. <i>NGA</i> y su posible relación con el gen <i>YUC4</i> .	118
3.3. La compleja relación entre <i>SPT</i> y <i>NGA</i> .	119
3.4. La interacción entre <i>ETT</i> y <i>NGA</i> .	120
4. Implicación de los genes de la zona de dehiscencia en la formación del extremo apical del gineceo.	122
5. Posible localización de <i>NGA</i> en las rutas que controlan el desarrollo del gineceo.	124
Conclusiones.	125
Materiales y Métodos.	129
1. Material biológico y condiciones de cultivo.	131
1.1. Material bacteriano.	131
1.1.1. Cepas bacterianas.	131
1.1.2. Medios de cultivo bacteriano.	131
1.1.3. Suplementos de los medios de cultivo bacterianos.	131
1.1.4. Condiciones de cultivo de microorganismos.	132
1.2. Material vegetal.	132
1.2.1 Líneas utilizadas.	132

1.2.2. Condiciones de cultivo en el invernadero.	133
1.2.3. Medios de cultivo de plantas.	134
1.2.4. Suplementos de medio de cultivo de plantas.	134
1.2.5. Condiciones de cultivo “ <i>in vitro</i> ”.	134
1.3. Construcciones.	135
1.3.1. Vectores.	135
1.3.1.1. Vectores de clonaje de productos de PCR.	135
1.3.1.2. Vectores para expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i> .	135
1.3.1.3. Vectores de transformación de plantas.	136
1.3.2. Construcciones realizadas.	137
2. Tratamientos aplicados a plantas.	137
2.1. Aplicación exógena de NPA.	137
2.2. Aplicación exógena de auxinas.	137
3. Metodologías.	137
3.1. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.	137
3.1.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.	137
3.1.1.1. Extracción de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i> .	138
3.1.1.2. Extracción de ARN total de <i>Arabidopsis</i> .	139
3.1.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.	139
3.1.3. Manipulación de ácidos nucleicos.	140
3.1.3.1. Retrotranscripción (síntesis de cDNA).	140
3.1.3.2. Amplificación del DNA mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).	140
3.1.3.3. Análisis “southern blot”.	141
3.1.3.3.1. Extracción y purificación de DNA genómico.	141
3.1.3.3.2. Digestión con enzimas de restricción.	141
3.1.3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa.	141
3.1.3.3.4. Transferencia.	142
3.1.3.3.5. Hibridación, lavados y detección de la señal.	142
3.1.3.4. Determinación de los niveles de transcrito.	143
3.1.3.4.1. PCR semicuantitativa.	143
3.1.3.4.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).	143
3.1.3.5. Manipulación de fragmentos de DNA necesarios para sondas o para generación de construcciones.	144
3.1.3.5.1. Digestión de fragmentos de DNA o de vectores plasmídicos.	144
3.1.3.5.2. Desfosforilación de vectores plasmídicos.	145
3.1.3.5.3. Purificación de fragmentos de DNA o productos de PCR de geles de agarosa.	145
3.1.3.6. Reacción de ligación entre fragmentos y plásmidos.	145
3.1.3.6.1. Clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR.	145
3.1.3.6.2. Clonaje de fragmentos de DNA y plásmidos digeridos.	145
3.1.3.6.3. Clonaje de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway.	146
3.1.3.7. Manipulación de microorganismos para la transformación de productos de ligación y de vectores plasmídicos.	146
3.1.3.7.1. Obtención de células electrocompetentes de <i>E.coli</i> .	146

3.1.3.7.2. Obtención de células electrocompetentes de <i>A.tumefaciens</i> .	146
3.1.3.7.3. Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> por electroporación.	147
3.1.3.7.4. Transformación de células competentes de <i>Agro</i> por electroporación.	147
3.1.3.8. Purificación de plásmidos bacterianos.	148
3.1.3.8.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E.coli</i> .	148
3.1.3.8.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Agro</i> .	148
3.1.3.9. Secuenciación de productos de PCR y vectores plasmídicos.	148
3.1.4. Diseño del microRNA artificial (Schwab <i>et al.</i> , 2006).	148
3.1.5. Estudios de expresión mediante hibridación “ <i>in situ</i> ”.	150
3.1.5.1. Fijación.	151
3.1.5.2. Imbibición y moldeado de bloques.	151
3.1.5.3. Preparación de la sonda.	151
3.1.5.4. Cuantificación de la sonda.	152
3.1.5.5. Prehibridación.	152
3.1.5.6. Hibridación y lavados.	153
3.1.5.7. Inmunodetección.	153
3.1.5.8. Observación de los resultados.	153
3.2. Metodología de plantas.	154
3.2.1. Fertilización cruzada.	154
3.2.2. Esterilizado de semillas.	155
3.2.3. Obtención de plantas transgénicas.	155
3.2.4. Selección de semillas transgénicas.	156
3.2.5. Análisis molecular de plantas mutantes.	156
3.2.5.1. Comprobación de genotipados por PCR.	156
3.2.5.1.1. Mutantes <i>nga</i> .	156
3.2.5.1.2. Otros mutantes.	157
3.2.6. Análisis fenotípico de plantas mutantes y líneas transgénicas.	159
3.2.6.1. Fotografía a bajo aumento.	159
3.2.6.2. Técnicas microscópicas.	159
3.2.6.2.1. Microscopía óptica.	159
3.2.6.2.2. Microscopía electrónica de barrido.	159
3.2.6.2.3. Microscopía confocal.	160
3.2.7. Técnicas de histología vegetal.	160
3.2.7.1. Obtención de cortes histológicos.	160
3.2.7.2. Tinciones.	160
3.2.7.2.1. Tinción con floroglucinol.	160
3.2.7.2.2. Aclarado con Hidrato de cloral para la observación de los haces vasculares.	160
3.2.7.2.3. Detección de la actividad β -glucuronidasa mediante tinción histoquímica.	161
4. Expresión transitoria en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>.	162
4.1. Ensayo BiFC.	162
4.2. Detección de actividad Luciferasa.	163
5. Experimentos relacionados con auxinas.	164
5.1. Estudio de dominancia apical.	164

5.2. Estudio del número de raíces laterales.	164
5.3. Estudio de gravitropismo.	164
Bibliografía.	165
Anexos.	177
Anexo I: Cebadores.	179
Anexo II: Construcciones.	183
Anexo III: Publicaciones.	201

Índice de tablas y figuras.

Páginas

Introducción.

Figura 1. Flor de <i>Arabidopsis</i> .	3
Figura 2. Estadios del desarrollo del gineceo y del fruto de <i>Arabidopsis</i> .	4-6
Figura 3. Estructura del gineceo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	7
Figura 4. Modelo ABCE.	9
Figura 5. Comparación entre las relaciones genéticas que controlan la identidad del SAM y la organización medio-lateral del gineceo de <i>Arabidopsis</i> .	12
Figura 6. Modelo de las interacciones genéticas que dirigen la especificación de las valvas, el margen de valva y el replum.	14
Figura 7. Modelo de la organización apical-basal del gineceo basado en la hipótesis del gradiente de auxinas.	16
Figura 8. Interacciones genéticas implicadas en la diferenciación de la zona apical del gineceo.	18
Figura 9. Esquema del gineceo de <i>Arabidopsis</i> .	18
Figura 10. Árbol filogenético de la superfamilia B3 de <i>Arabidopsis</i> .	20

Resultados.

Figura 11. Fotografías del microscopio electrónico de barrido.	29
Figura 12. Mutante de inserción de T-DNA para <i>NGA1</i> .	30
Figura 13. Localización de la inserción de T-DNA en el gen <i>NGA1</i> .	31
Figura 14. Esquema de la posición donde cortan las enzimas de restricción utilizadas en el “southern” para <i>NGA1</i> .	31
Figura 15. “Southern blot” para el mutante <i>nga1</i> .	32
Figura 16. Mutante de inserción de T-DNA para <i>NGA1</i> .	33
Figura 17. Análisis por RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR de los niveles de transcrito del gen <i>NGA1</i> en inflorescencias de <i>Columbia</i> y del mutante <i>nga1-4</i> .	34
Figura 18. Mutante de inserción de elemento transponible tipo <i>dSpm</i> para <i>NGA2</i> .	34
Figura 19. Mutante de inserción de elemento transponible tipo <i>dSpm</i> para <i>NGA2</i> .	35
Figura 20. Análisis por RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR de los niveles de transcrito del gen <i>NGA2</i> en inflorescencias de <i>Columbia</i> y mutante <i>nga2-2</i> .	36
Figura 21. Alineamiento de la proteína completa de <i>NGA2</i> y la posible proteína truncada codificada por el alelo mutante <i>nga2-2</i> .	36
Figura 22. Caracterización fenotípica de los mutantes <i>nga1-4</i> y <i>nga2-2</i> .	37
Figura 23. Niveles de expresión de los diferentes genes que componen la familia <i>NGA</i> en diferentes tejidos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	38
Figura 24. Patrón de expresión de los genes <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> en inflorescencias silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	39
Figura 25. Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar el patrón de expresión de <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	40
Figura 26. Expresión de <i>NGA1:GUS</i> en plántulas.	40
Figura 27. Expresión de <i>NGA1:GUS</i> en inflorescencias.	41
Figura 28. Expresión de <i>NGA2:GUS</i> en plántulas.	41
Figura 29. Expresión de <i>NGA2:GUS</i> en inflorescencias.	42
Figura 30. Esquema de las construcciones utilizadas en el experimento de expresión transitoria.	42

Figura 31. Localización subcelular de NGA1 y NGA2.	43
Figura 32. Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar el patrón de expresión de <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	43
Figura 33. Expresión de <i>NGA1:GFP</i> y <i>NGA2:GFP</i> en plántulas.	44
Figura 34. Expresión de <i>NGA1:GFP</i> y <i>NGA2:GFP</i> en inflorescencias.	44
Figura 35. Comparación de la morfología de los diez primeros frutos de los distintos mutantes <i>nga</i> y sus combinaciones con respecto a las plantas silvestres.	46
Figura 36. Caracterización fenotípica de la zona apical del fruto en los distintos mutantes <i>nga</i> y sus combinaciones con respecto a plantas silvestres.	47
Figura 37. Comparación de la morfología de la hoja.	49
Figura 38. Diseño del amiR- <i>NGA</i> .	50
Figura 39. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).	51
Figura 40. Comparación de la morfología de la hoja.	51
Figura 41. Caracterización fenotípica de la inflorescencia de las líneas amiR- <i>NGA</i> con respecto a la planta silvestre y al cuádruple mutante <i>nga</i> .	52
Figura 42. Caracterización fenotípica del fruto de las líneas amiR- <i>NGA</i> con respecto a la planta silvestre y al cuádruple mutante <i>nga</i> .	53
Figura 43. Comparación de los fenotipos causados por la expresión ectópica de <i>NGA1</i> y <i>NGA3</i> .	55
Figura 44. Fenotipo causado por la expresión ectópica de <i>NGA1</i> .	55
Figura 45. Fenotipo causado por la expresión ectópica de <i>NGA1</i> .	56
Figura 46. Número de primordios de raíces laterales en plantas silvestres y en diferentes líneas mutantes <i>nga</i> .	57
Figura 47. Estudio de gravitropismo en plantas silvestres y en diferentes líneas mutantes <i>nga</i> .	58
Figura 48. Dominancia apical.	58
Figura 49. Distribución de los haces vasculares en gineceos en antesis de plantas silvestres y diferentes combinaciones de mutantes <i>nga</i> .	59
Figura 50. Frutos tratados con NPA.	60
Figura 51. Efecto de la reducción de los niveles de auxinas en el dominio de expresión de <i>NGA3</i> en el fruto.	61
Figura 52. Efecto de la aplicación exógena de auxinas en la región apical del gineceo de líneas amiR- <i>NGA</i> .	61
Figura 53. Efecto de la reducción de la actividad de <i>NGA</i> en la expresión de <i>YUC2</i> y <i>YUC4</i> en el estilo.	62
Figura 54. Estudio de interacción proteína-proteína entre <i>BRX</i> y <i>NGA1</i> .	64
Figura 55. Caracterización fenotípica de los mutantes <i>nga1-4 sty1-1</i> y <i>nga1-4 sty1-1sty2-1</i> .	66
Figura 56. Patrón de expresión de <i>STY1</i> en fondo amiR- <i>NGA</i> y 35S:: <i>NGA3</i> .	67
Figura 57. Morfología de la roseta de la línea 35S:: <i>NGA3</i> en fondo <i>sty1-1 sty2-1</i> .	67
Figura 58. Fenotipo de la línea de sobreexpresión 35S:: <i>NGA3</i> en fondo <i>sty1-1 sty2-1</i> .	68
Figura 59. Fenotipo de la línea de sobreexpresión 35S:: <i>STY1</i> en fondo amiR- <i>NGA</i> .	69
Figura 60. Caracterización fenotípica de la línea 35S:: <i>STY1</i> 35S:: <i>NGA3</i> .	70
Figura 61. Caracterización fenotípica del fruto de la línea 35S:: <i>STY1</i> 35S:: <i>NGA3</i> .	70
Figura 62. Estudio de interacción proteína-proteína entre <i>STY1</i> y <i>NGA1</i> .	71
Figura 63. Estudio de interacción proteína-proteína entre <i>STY1</i> y <i>CRC</i> y entre <i>NGA1</i> y <i>CRC</i> .	72
Figura 64. Estudio de interacción proteína-proteína entre <i>STY1</i> y <i>NGA1</i> .	73
Figura 65. Fenotipos del doble mutante <i>nga1-4 crv-1</i> y de la línea amiR- <i>NGA crv-1</i> .	74

Figura 66. Caracterización fenotípica de la línea 35S:: <i>NGA3 crc-1</i> y 35S:: <i>STY1 crc-1</i> .	75
Figura 67. Caracterización fenotípica de la línea 35S:: <i>NGA3</i> 35S:: <i>STY1 crc-1</i> .	76
Figura 68. Efecto de la sobreexpresión de <i>NGA</i> y <i>STY1</i> en la expresión de <i>YUC4</i> en el estilo.	77
Figura 69. Efecto de la sobreexpresión conjunta de <i>NGA</i> y <i>STY1</i> en la expresión de <i>YUC4</i> en el estilo.	77
Figura 70. Esquema de las construcciones empleadas para estudiar si <i>STY1</i> y <i>NGA1</i> actuaban conjuntamente en la activación de <i>YUC4</i> .	78
Figura 71. Activación transitoria del promotor de <i>YUC4</i> por la proteína <i>STY1</i> .	78
Figura 72. Activación transitoria del promotor de <i>YUC4</i> por la proteína <i>NGA1</i> .	79
Figura 73. Estudio de la activación transitoria del promotor de <i>YUC4</i> por diferentes combinaciones de proteínas.	79
Figura 74. Estudio de interacción proteína-proteína entre <i>SPT</i> y <i>NGA1</i> .	81
Figura 75. Caracterización fenotípica del mutante <i>nga1-4 spt-2</i> .	85
Figura 76. Fenotipos asociados a la línea de sobreexpresión 35S:: <i>NGA3</i> en fondo <i>spt-2</i> .	82
Figura 77. Morfología de la roseta de la línea 35S:: <i>NGA3</i> 35S:: <i>SPT</i> .	83
Figura 78. Caracterización fenotípica de los frutos de la línea 35S:: <i>NGA3</i> 35S:: <i>SPT</i> .	83
Figura 79. Estudio del patrón de expresión de <i>SPT</i> en diferentes fondos <i>NGA</i> .	84
Figura 80. Patrón de expresión de <i>ETT</i> en fondo 35S:: <i>NGA3</i> .	85
Figura 81. Estudio de interacción proteína-proteína entre <i>ETT</i> y <i>NGA1</i> y <i>NGA4</i> .	86
Figura 82. Caracterización fenotípica de la línea 35S:: <i>ETT</i> 35S:: <i>NGA3</i> .	86
Figura 83. Desarrollo del margen de la valva.	90
Figura 84. Lignificación de la zona de dehiscencia.	90
Figura 85. Hipótesis sobre la posible relación entre los genes <i>NGA</i> y los genes implicados en el establecimiento del eje medio-lateral.	91
Figura 86. Patrón de expresión de <i>FUL</i> en fondo 35S:: <i>NGA3</i> y en el cuádruple mutante <i>nga</i> .	92
Figura 87. Patrón de expresión de <i>IND</i> en fondo 35S:: <i>NGA3</i> .	93
Figura 88. Patrón de expresión de <i>SHP1</i> en fondo 35S:: <i>NGA3</i> .	94
Figura 89. Patrón de expresión de <i>SHP2</i> en fondo 35S:: <i>NGA3</i> .	95
Figura 90. Patrón de expresión de <i>ALC</i> en fondo 35S:: <i>NGA3</i> .	96
Figura 91. Caracterización fenotípica de la línea 35S:: <i>NGA3 ind-2</i> .	97
Figura 92. Caracterización fenotípica de la línea 35S:: <i>NGA3 shp1 shp2</i> .	98
Figura 93. Caracterización fenotípica de la línea 35S:: <i>NGA3 yab3</i> .	99
Discusión.	101
Figura 94. Alineamiento de la región 3' genómica de los genes <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	104
Figura 95. Comparación de fenotipos de los mutantes <i>nga1-1</i> y <i>nga1-4</i> .	105
Figura 96. Comparación fenotípica de distintas combinaciones de mutantes <i>nga</i> en función de los alelos utilizados.	106
Figura 97. Comparación entre los sitios de máxima producción de auxina libre y de expresión de los genes <i>NGA</i> durante el desarrollo floral.	109
Figura 98. Comparación entre los sitios de máxima producción de auxina libre y de expresión de los genes <i>NGA</i> durante el desarrollo foliar.	111
Figura 99. Esquema de las proteínas <i>NGA1</i> y <i>NGA2</i> .	111
Figura 100. Fenotipo del fruto causado por la sobreexpresión de los genes <i>NGA</i> .	113
Figura 101. Secuencias de los promotores de los genes <i>YUC2</i> y <i>YUC4</i> .	118
Figura 102. Hipótesis sobre la posible relación entre los genes <i>NGA</i> y los genes	

implicados en el establecimiento del eje medio-lateral.	122
Figura 103. Modelo del papel de los genes <i>NGA</i> en el desarrollo del gineceo.	124
Materiales y Métodos.	129
Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas.	131
Tabla 2: Suplementos utilizados en el trabajo con bacterias.	131-132
Tabla 3: Suplementos utilizados en el trabajo con plantas.	134
Tabla 4. Plásmidos utilizados en esta tesis.	136-137
Tabla 5. Programa de PCR utilizado en la RT-PCR	143
Figura 104. Sustitución del miR319a del plásmido RS300 por el microRNA específico para los genes <i>NGA</i> .	149
Figura 105. Esquema de la horquilla del microRNA.	150
Figura 106. Cuantificación simultánea de varias ribosondas.	152
Tabla 6. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes <i>nga</i> .	156-157
Tabla 7. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes.	157-158
Tabla 8. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes por dCAPS.	158
Figura 107. Esquema de las construcciones utilizadas para el ensayo de interacción proteína-proteína <i>in vivo</i> .	162
Figura 108. Diagrama de la distribución de las semillas en una placa de MSS.	164