

ÍNDICE

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

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

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

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