

RESUMEN

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

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

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

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

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

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