



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE
ELCHE**
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Estudio de los complejos transcripcionales
que dirigen la formación del pistilo en
angiospermas mediante la identificación de
sus dianas moleculares y de su conservación
funcional durante la evolución de las
dicotiledóneas.**

Tesis Doctoral

África Gomariz Fernández
JULIO 2017

Directora:
Cristina Ferrándiz Maestre



Dr. Antonio Ferrer Montiel, Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Estudio de los complejos transcripcionales que dirigen la formación del pistilo en angiospermas mediante la identificación de sus dianas moleculares y de su conservación funcional durante la evolución de las dicotiledóneas”, presentada por Dña. África Gomariz Fernández para optar al grado de Doctora, la cual ha sido realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que consten los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche (Alicante), a 25 de Julio de 2017.

Fdo.: Dr. Antonio Ferrer Montiel



Dra. Cristina Ferrándiz Maestre, Doctora en Ciencias Biológicas y Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación que conduce a la obtención del grado de Doctora: “Estudio de los complejos transcripcionales que dirigen la formación del pistilo en angiospermas mediante la identificación de sus dianas moleculares y de su conservación funcional durante la evolución de las dicotiledóneas”, cuya autora es Dña. África Gomariz Fernández, ha sido realizado bajo mi dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que consten los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche (Alicante), a 25 de Julio de 2017.

Fdo.: Dra. Cristina Ferrandiz Maestre



Esta tesis ha sido financiada por la Generalitat Valenciana (Contrato predoctoral ACIF/2013/044).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos los que habéis estado junto a mí en esta etapa, a veces dura, pero sin duda muy gratificante.

A Cristina, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por su dirección, apoyo y comprensión, y por encontrar siempre una solución a los problemas. A Paco, por mostrarse siempre cercano y por su ayuda y tantos buenos consejos. A Bob Franks, por acogerme en su laboratorio como a una más del grupo y hacerme sentir como en casa. A todos los servicios del IBMCP por haber hecho posible el desarrollo de este trabajo.

A los compañeros de laboratorio: Patri, Irene, Vicente, Ana B., Majo, Mariana, Marcos, Carlos, Reyes, Sofía, Chloé, Priscila, Salva, Ludo, Carol y Alfredo, por haberme ayudado y enseñado tantas cosas, y por todo lo que hemos compartido. A Marina, M^a Ángeles, Monica, Vero, Ana A., Pepe, Praena, Miguel, Max, Víctor, Amparo y Ceci, por compartir vuestros conocimientos y “truquitos” conmigo, por ofrecerme siempre vuestro tiempo, por vuestro apoyo y ayuda dentro y fuera del labo, por estar siempre a mi lado, y sobre todo por vuestra amistad. Y también quiero dar las gracias a los amiguetes del otro lado del pasillo: Sandra, Flo, Rim, Ana Cristina, y Gaetano, por estar siempre dispuestos a echar una mano, por todo vuestro apoyo y por alegrarme los días.

A mis compañeros y amigos durante mi estancia en North Carolina: Bob, Miguel, Gonzalo, Bhupinder, Brian, Silvia, Aure, Javi, Adam y Jeonga, por ofrecerme siempre su ayuda, por todos esos cafés, chocolates y dulces, y por hacer que mi estancia allí fuese una experiencia maravillosa. A Yokiko y Miguel por acogerme en su casa, por ser mi familia al otro lado del charco, y por tantos buenos momentos.

Y fuera del ámbito científico, quiero dar las gracias a mi amiga Cristina, quien me ha demostrado que la amistad no conoce la distancia, y con la que llevo compartiendo casi toda mi vida y quisiera compartir también este trabajo. A mis amigos, los “Colegas 2.0”, que me hacen reír y me ayudan a evadirme de los problemas, y a los que espero no decepcionar por no haber creado el “tomaco”. Al “Comando Levante”, que han hecho mucho más llevadero este último año siendo mi válvula de escape. Y a Mónica, mi gemela gallega, que siempre me contagia con su optimismo.

Y por supuesto, a mi familia, pilar sobre el que descansa este trabajo, por creer siempre en mí y celebrar cada pequeño logro, porque sin vuestro apoyo no hubiese sido posible. Gracias a mis hermanos, David y Moisés por cuidar de mí y ser mi referente, a Cibeles y M^a Ángeles por darme fuerzas y animarme a seguir siempre adelante, a mis sobrinos, Marta y Santi, por llenarme la vida de alegría, a mis suegros Cristina y Félix por acogerme como a una hija y darme tanto cariño, a mis primos: Dioni, Joaquín, M^a Elena, Merche, Javier y Jaime, porque a vuestro lado todo es mucho más fácil, a mi tía Consuelo por vivir mis alegrías como propias, y a los abuelos: Dolores, María Rosa y Francisco, por vuestro cariño y por recibirme siempre con una sonrisa.

Y muy especialmente a mis padres, a quienes debo todo lo que soy. A mi padre, que aunque no podrá leer esta dedicatoria, sé que se hubiese sentido muy orgulloso, y a mi madre, mi ejemplo a seguir, la persona más fuerte que conozco, y que me ha enseñado que rendirse no es una opción, por darme tanto sin pedir nunca nada, y a quien dedico completamente este trabajo.

Y por último, pero no menos importante, a mi marido, Fabi; por tanto apoyo técnico y por ser mi informático particular, pero sobre todo gracias por escucharme, por estar a mi lado cada día, por aguantarme en los días torcidos, por hacerme ver siempre el lado positivo de las cosas y transformar los problemas en sonrisas, y por hacer de este largo camino sólo un paseo.

A todos gracias.

RESUMEN

El gineceo es una adquisición evolutiva clave de las angiospermas, que protege a los óvulos en desarrollo y que ha dotado a las plantas con flores de múltiples ventajas evolutivas. Se han propuesto redes reguladoras de genes que dirigen el desarrollo de los tejidos especializados del gineceo basándose en estudios genéticos y moleculares llevados a cabo principalmente en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, los estudios sobre la conservación/diversificación de los elementos y la topología de esta red son todavía escasos. En esta tesis doctoral se ha explorado la validez del modelo que hemos denominado *Carpel Code*, según el cual la identidad de los distintos módulos funcionales del gineceo estaría determinada por la formación de complejos transcripcionales en distintas combinaciones. Además, hipotéticamente, cada complejo tendría un conjunto de dianas moleculares distintas y/o distinta actividad reguladora sobre ellas en función de qué factores de transcripción estuviesen interaccionando. En concreto, para este trabajo, nos hemos centrado en un complejo integrado por los factores NGATHA, STYLISH y CRABS CLAW y que hemos propuesto, en base a estudios previos del laboratorio, que define la identidad del estilo. Para entender los mecanismos moleculares asociados a la especificidad funcional de este complejo, hemos determinado el efecto en el transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a la inducción simultánea de los factores de transcripción NGA1 y STY1 y cómo varía cuando se impide la formación del posible complejo STY-CRC-NGA, observando que el conjunto de dianas moleculares de STY1 y NGA1 en presencia y ausencia de CRC es diferente, así como el efecto regulatorio sobre muchas de las dianas comunes en ambos contextos. Por otro lado, en este trabajo también nos hemos planteado conocer si la formación y función del complejo transcripcional STY-CRC-NGA podría estar conservada en especies evolutivamente distantes y con morfologías del gineceo distintas. Para ello, hemos estudiado la conservación funcional de los factores de transcripción pertenecientes a la familia SHI/STY/SRS en dos especies distantes dentro de las dicotiledóneas, *Eschscholzia californica* y *Nicotiana benthamiana*. Hemos encontrado que los patrones de expresión de los genes *EcSRS-L* y *NbSRS-L* durante el desarrollo floral son similares entre sí y a los reportados para los genes *SHI/STY/SRS* de *Arabidopsis*. También hemos caracterizado los efectos fenotípicos de la inactivación del gen *NbSRS-L* y de su sobreexpresión en *Nicotiana*. Nuestros resultados apoyan el papel ampliamente conservado de los genes

SHI/STY/SRS dirigiendo el desarrollo del estilo y el estigma al menos dentro de las dicotiledóneas auténticas. Además, los resultados obtenidos indican que la formación del complejo proteico STY-CRC-NGA está conservado en *N. benthamiana* y *E. californica*, proporcionando nuevas ideas sobre el posible origen evolutivo del gineceo.



SUMMARY

The gynoecium is a key evolutionary acquisition of angiosperms, which protects the developing ovules and has endowed flowering plants with multiple evolutionary advantages. Gene regulatory networks directing the development and patterning of specialized tissues in the gynoecium have been proposed based on genetic and molecular studies mainly carried out in *Arabidopsis thaliana*. However, studies on the conservation/diversification of these elements and the topology of this network are still scarce. In this work, we have explored the validity of the Carpel Code model, derived from previous work in the laboratory, and which postulates that the identity of the different functional modules of the gynoecium would be determined by the formation of transcriptional complexes in different combinations. The model also proposes that each complex would have a set of distinct molecular targets and/or distinct regulatory activity on them depending on which transcription factors are integrating it. In particular, for this thesis, we have focused on a complex formed by NGATHA, STYLISH and CRABS CLAW factors that, based on previous work from the lab, appears to direct style differentiation. To better understand the molecular mechanisms underlying functional specificity of such complex, we have determined the effect on the transcriptome of *Arabidopsis thaliana* in response to NGA1 and STY1 simultaneous induction and how it is different when formation of the possible STY-CRC-NGA complex is prevented. We have observed that the set of molecular targets of STY1 and NGA1 in the presence and absence of CRC is different, as well as the regulatory effect on many of the common targets in both contexts. In addition, in this work we have also studied if the formation and function of the STY-CRC-NGA transcriptional complex is conserved in evolutionarily distant species with different gynoecium morphologies. For this purpose, we have studied the functional conservation of transcription factors belonging to the SHI/STY/SRS family in two distant species within the eudicots, *Eschscholzia californica* and *Nicotiana benthamiana*. We have found that the expression patterns of *EcSRS-L* and *NbSRS-L* genes during flower development are similar to each other and to those reported for *Arabidopsis SHI/STY/SRS* genes. We have also characterized the phenotypic effects of *NbSRS-L* gene inactivation and overexpression in *Nicotiana*. Our results support a widely conserved role of *SHI/STY/SRS* genes at the top of the regulatory network directing style and stigma development, at least within core eudicots. In addition, these results indicate

that the formation of the STY-CRC-NGA protein complex is conserved in *N. benthamiana* and *E. californica*, providing new insights on the possible evolutionary origin of the gynoeceium.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El gineceo de las angiospermas. Importancia evolutiva.....	3
2. Factores de transcripción que influyen en el desarrollo del gineceo.....	5
3. Factores de transcripción con un papel relevante en la formación del gineceo. Los factores STY, NGA y CRC en la especie modelo <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
4. El complejo transcripcional STY-CRC-NGA y su papel en la morfogénesis de la parte apical del fruto.....	14
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Material biológico.....	25
1.1. Material vegetal.....	25
1.2. Genotipado	27
1.3. Construcciones	27
1.4. Técnicas de biología molecular y celular.....	31
1.5. Técnicas de microscopía.....	35
1.6. Metodología de plantas.....	36
1.7. Estudios de expresión mediante hibridación “ <i>in situ</i> ”	38
1.8. Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)	38
1.9. Ensayo BiFC, para la expresión transitoria en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	39
1.10. Estudio de las dianas directas de factores de transcripción a partir de protoplastos...	40
1.11. Determinación de los niveles de transcrito mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).	42
1.12. Tratamiento de inducción por Dexametasona	43
1.13. Análisis de los perfiles de expresión del complejo STY-CRC-NGA.....	44
RESULTADOS.....	45
CAPITULO 1	47
1. Identificación de las dianas moleculares del complejo STY-CRC-NGA en <i>Arabidopsis</i> ..	47
1.1. Antecedentes.....	47

1.2. Generación del material.....	50
1.3. Realización del ensayo de inducción de las líneas GR previo al análisis de los perfiles moleculares.....	56
1.4. Obtención de los datos del análisis de los perfiles de transcripción.....	58
1.5. Selección de genes candidato.	68
CAPÍTULO 2	75
2. Identificación de factores de transcripción con los que interaccionan los genes <i>NGATHA</i> y estudio de la posible relevancia funcional de dichos complejos.	75
2.1. Identificación de los homólogos de <i>SHI/STY/SRS</i> en <i>Eschscholzia californica</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i>	76
2.1.4. Árbol filogenético.....	84
2.2. Patrones de expresión de <i>SHI/STY/SRS</i> en <i>Eschscholzia californica</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i> . Hibridación “ <i>in situ</i> ”.....	85
2.3. Análisis funcional de los genes de la familia <i>SHI/STY/SRS</i> en las especies <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Eschscholzia californica</i>	89
2.4. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).	97
2.5. Sobreexpresión de los genes <i>NbSHI/STY/SRS</i> en <i>Nicotiana benthamiana</i>	107
2.6. Estudio de la posible formación del complejo proteico STY-CRC-NGA en <i>Nicotiana benthamiana</i> (Nb) y <i>Eschscholzia californica</i> (Ec).....	111
2.7. Puesta a punto de un sistema de determinación de dianas directas de factores de transcripción en especies no modelo difícilmente transformables.	117
DISCUSIÓN	127
1. El conjunto de dianas y la actividad transcripcional de STY1 y NGA1 varía en ausencia de CRC	129
1.1. La inducción de la actividad constitutiva de STY1:GR y GR:NGA1 mediante su traslocación al núcleo en presencia y ausencia de CRC tiene efectos fenotípicos similares a los de las líneas de sobreexpresión y sus combinaciones equivalentes	130
1.2. El conjunto de dianas moleculares de STY1 y NGA1 en presencia y ausencia de CRC es diferente, así como el efecto regulatorio sobre muchas de las dianas comunes en ambos contextos.....	132
1.3. Identificación de posibles dianas del complejo STY-CRC-NGA con un papel en el desarrollo del gineceo.....	134

2. El complejo STY-CRC-NGA podría tener funciones conservadas en especies distantes de angiospermas	140
2.1. La función de <i>SHI/STY/SRS</i> en el desarrollo apical del gineceo está conservada en las Dicotiledóneas Auténticas.....	140
2.2. Conservación de la red genética reguladora del desarrollo del gineceo.....	144
2.3. La formación del complejo transcripcional STY-CRC-NGA está conservada en <i>N. benthamiana</i> y <i>E. californica</i>	145
2.4. Optimización del protocolo de obtención y transfección de protoplastos de la especie no transformable <i>E. californica</i>	147
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA	153
ANEXOS	171
ANEXO I: Genes diana que varían su expresión al inducir conjuntamente STY y NGA en fondo silvestre y fondo <i>crc</i>	173
ANEXO II: Cebadores	187



ABREVIATURAS

%: por ciento

°C: grados centígrados

μM: micromolar

A: adenina

Arabidopsis: *Arabidopsis thaliana*

Amp^r: resistencia a ampicilina

At: *Arabidopsis thaliana*

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

RNA^m: ARN mensajero

Basta: glufosinato de amonio

BiFC: Complementación Fluorescente Bimolecular

C: citosina

cDNA: DNA complementario

Ciclo: cicloheximida

Col-0: ecotipo Columbia

C-terminal: carboxilo terminal

Dexa: dexametasona

dNTP: desoxinucleósido trifosfato

E: escala

Ec: *Eschscholzia californica*

Eschscholzia: *Eschscholzia californica*

EDTA: etilen-diamino-tetraacetato sódico

EMS: etilmetanosulfonato

et al.: y otros

FAE: formaldehído-ácido acético-etanol

FC: *Fold Change*

FDR: *False Discovery Rate*

Fig.: figura

G: guanina

GFP: proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

GO: Gene Ontology

GR: Receptor de Glucocorticoides

His: histidina

Hygro^r: resistencia a higromicina

IAA: ácido indolacético

Kan^r: resistencia a kanamicina

kb: kilobases

lacZ: β-galactosidasa

LB: medio Luria-Bertani

Ler: ecotipo Landsberg, portador de la mutación erecta

Leu: leucina

M: molar

MES: ácido 4-morfolino-etano-sulfónico

min: minutos

mM: milimolar

MS: medio de Murashige y Skoog

Nb: *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana: *Nicotiana benthamiana*

nM: nanomolar

NPA: ácido 1-N-naphtylphtalamico

pág.: página

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (PolimeraseChainReaction)

PEG: polietilen glicol

p/v: peso/volumen

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RFP: proteína rojo fluorescente (RedFluorescentProtein)

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: retrotranscripción seguida de PCR

seg.: segundos

SEM: microscopía electrónica de barrido (ScanningElectronMicroscopy)

T: timidina

TAE: Tris-acético-EDTA

TAIL-PCR: Thermal Asymmetric Interlaced PCR

TBE: Tris-borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

TER: terminador

Trp: triptófano

U: Uracilo

UV: ultravioleta

VIGS: Silenciamiento génico inducido por virus (Virus-induced gene silencing)

WT: silvestre (*Wild Type*)

YFP: Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein)



LISTA DE FIGURAS

Figura I1. Estructura del gineceo de <i>A. thaliana</i>	4
Figura I2. Fenotipos de mutantes y/o sobreexpresores de algunos de los genes implicados en el desarrollo del gineceo.....	9
Figura I3. Fenotipos de las líneas con actividad NGA, STY y CRC alterada.....	13
Figura I4. Representación gráfica del modelo ABCE.....	15
Figura I5. Representación de los complejos transcripcionales propuestos en el <i>Carpel Code</i>	16
Figura C1.1. Fenotipos de frutos y flores en anthesis de las líneas de sobreexpresión de <i>STY1</i> y <i>NGA3</i> tanto en fondo silvestre, como en fondo mutante <i>crc</i>	49
Figura C1.2. Esquema de generación de las líneas <i>STY1:GR/+ GR:NGA1/+</i> en fondo silvestre.....	50
Figura C1.3 Esquema de generación de las líneas <i>STY1:GR/+ GR:NGA1/+</i> en fondo mutante <i>crc</i>	52
Figura C1.4. Fenotipo de las flores de las líneas inducibles tras el tratamiento con dexametasona.....	54
Figura C1.5. Flores en anthesis tratadas con dexametasona. Fotografías tomadas al microscopio electrónico de barrido.	55
Figura C1.6. Diagrama de flujo del ensayo de inducción de las líneas <i>STY1::GR GR-NGA1</i> en fondo silvestre y fondo <i>crc</i> con Dexametasona (Dexa) + Cicloheximida (Ciclo) y Mock + Cicloheximida (Ciclo).	57
Figura C1.7. Genes activados al inducir <i>STY1:GR GR:NGA1</i> en fondo silvestre.....	59
Figura C1.8. Genes reprimidos al inducir <i>STY1:GR GR:NGA1</i> en fondo silvestre.	60
Figura C1.9. Genes activados al inducir <i>STY1:GR GR:NGA1</i> en fondo <i>crc</i>	61
Figura C1.10. Genes reprimidos al inducir <i>STY1:GR GR:NGA1</i> en fondo <i>crc</i>	61
Figura C1.11. Análisis GO que muestra los procesos biológicos enriquecidos para los genes que están activados en fondo <i>STY1:GR GR:NGA1/wt</i> y reprimidos en <i>STY1:GR GR:NGA1/crc</i>	63
Figura C1.12. Análisis GO que muestra los componentes celulares enriquecidos para los genes que están reprimidos en fondo <i>STY1:GR GR:NGA1/wt</i> y activados en <i>STY1:GR GR:NGA1/crc</i>	64

Figura C1.13 Análisis GO que muestran las funciones moleculares enriquecidas para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y activados en STY1:GR GR:NGA1/crc.....	65
Figura C1.14. Análisis GO que muestran los procesos biológicos enriquecidos para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/crc.	66
Figura C1.15. Análisis GO que muestran los componentes celulares enriquecidos para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y que no varían en STY1:GR GR:NGA1/crc.	67
Figura C1.16. Análisis GO que muestran los componentes celulares enriquecidos para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/crc y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt.	68
Figura C2.1. Morfología del gineceo de <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Eschscholzia californica</i>	75
Figura C2.2. Alineamiento de secuencias entre las proteínas de la familia SHI/STY/SRS para las especies (por orden de aparición): <i>Eschscholzia californica</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i>	83
Figura C2.3. Árbol filogenético de las proteínas SHI/STY/SRS para las especies <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Eschscholzia californica</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
Figura C2.4. Patrones de expresión de los genes <i>SHI/STY/SRS</i> en flores silvestres de <i>N. benthamiana</i>	87
Figura C2.5. Patrones de expresión de los genes <i>SHI/STY/SRS</i> en flores silvestres de <i>Eschscholzia californica</i>	88
Figura C2.6. Expresión de <i>STY1</i> en <i>Arabidopsis</i> determinada por hibridación “ <i>in situ</i> ” ..	89
Figura C2.7. Esquema de las construcciones utilizadas para la generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> con la sobreexpresión de los genes <i>NbSRS-L</i> y <i>EcSRS-L</i>	90
Figura C2.8. Fenotipo en frutos de plantas transgénicas <i>NbSRS-L</i> en fondo mutante <i>sty1 sty2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	92
Figura C2.9. Gráfica de frecuencias de las distintas categorías obtenidas tras la complementación de los genes <i>NbSRS-L</i> en fondo <i>sty1 sty2</i>	93
Figura C2.10. Fenotipo de las hojas de roseta de plantas transgénicas 35S:: <i>NbSRS-L</i> en fondo mutante <i>sty1 sty2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	93

Figura C2.11. Fenotipo en frutos de plantas transgénicas <i>EcSRS-L</i> en fondo mutante <i>sty1 sty2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	94
Figura C2.12. Fenotipos de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> que sobreexpresan los genes <i>NbSRS-L</i>	96
Figura C2.13. Fenotipo en frutos de plantas transgénicas <i>EcSRS-L</i> en fondo silvestre <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
Figura C2.14. Fenotipos de flores en antesis de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> inoculadas con pTRV2-NbSRS-L1 (E-H), con pTRV2-NbSRS-L2 (I-L), pTRV2-NbSRS-L3 (M-P), pTRV2-NbSRS-L1/pTRV2-NbSRS-L3 (Q-U) y pTRV2-NbSRS-L1/pTRV2-NbSRS-L2/pTRV2-NbSRS-L3 (V-Y).	101
Figura C2.15. Micrografías tomadas al microscopio electrónico de barrido (SEM) de la región apical de pistilos de <i>N. benthamiana</i> en antesis.	102
Figura C2.16. Nivel de expresión de los genes diana <i>NbSRS-L</i> en las líneas de <i>Nicotiana benthamiana</i> inoculadas con TRV2-NbSRS-L1	104
Figura C2.17. Nivel de expresión de los genes diana <i>NbSRS-L</i> en las líneas de <i>Nicotiana benthamiana</i> inoculadas con TRV2-NbSRS-L2.	104
Figura C2.18. Nivel de expresión de los genes diana <i>NbSRS-L</i> en las líneas de <i>Nicotiana benthamiana</i> inoculadas con TRV2-NbSRS-L3.	105
Figura C2.19. Nivel de expresión de los genes diana <i>NbSRS-L</i> en las líneas de <i>Nicotiana benthamiana</i> inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L3.	105
Figura C2.20. Nivel de expresión de los genes diana <i>NbSRS-L</i> en las líneas de <i>Nicotiana benthamiana</i> inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L2/TRV2-NbSRS-L3.	105
Figura C2.21. Fenotipos de gineceos de flores en antesis de plantas de <i>Eschscholzia californica</i> inoculadas con TRV2- <i>EcSRS-L</i>	106
Figura C2.22. Nivel de expresión del gen diana <i>EcSRS-L</i> en las líneas de <i>Eschscholzia californica</i> inoculadas con TRV2- <i>EcSRS-L</i>	107
Figura C2.23. Fenotipos de los pistilos de líneas transgénicas de <i>N. benthamiana</i> que sobreexpresan los genes <i>NbSRS-L1</i> o <i>NbSRS-L2</i>	109
Figura C2.24. Sobreexpresión de los genes <i>NbSRS-L</i> en <i>N. benthamiana</i>	110
Figura C2.25. Controles utilizados en el estudio de la interacción proteína-proteína....	113
Figura C2.26. Estudio de la interacción proteína-proteína entre los factores de transcripción NbCRC, NbNGAa, NGAb, NbSRS-L1, NbSRS-L2 y NbSRS-L3 de la especie <i>Nicotiana benthamiana</i>	114

Figura C2.27. Estudio de la interacción proteína-proteína entre los factores de transcripción EcCRC, EcNGA y EcSRS-L de la especie <i>Eschscholzia californica</i>	116
Figura C2.28. Esquema de la construcción utilizada para la transformación de protoplastos de <i>E. californica</i> con el factor de transcripción EcSRS-L.....	118
Figura C2.29. Protoplastos procedentes de hoja de <i>E. californica</i>	121
Figura C2.30. Protoplastos de hoja de <i>A. thaliana</i> transfectados con pUC19-GFP.....	123
Figura C2.31. Protoplastos de hoja de <i>E. californica</i> transfectados con pUC19-GFP....	123
Figura C2.32. Diagrama de flujo del proceso de producción de protoplastos de hoja de <i>E. californica</i> y su transfección.	125



LISTA DE TABLAS

Tabla M.1: Líneas mutantes utilizadas en esta tesis	25
Tabla M.2: Líneas transgénicas utilizadas en esta tesis	26
Tabla M.3: Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.....	26
Tabla M.4: Condiciones de PCR utilizadas para genotipar las líneas 35S::STY1:GR.....	27
Tabla M.5: Listado de los vectores utilizados para el clonaje de productos de PCR.	27
Tabla M.6: Listado de los vectores utilizados en la transformación de plantas.	28
Tabla M.7: Listado de los vectores utilizados para la expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	28
Tabla M.8: Listado de los vectores utilizados para en VIGS.	29
Tabla M.9: Listado de los vectores utilizados para las transfección de protoplastos	29
Tabla M.10: Listado de plásmidos utilizados en esta tesis.	30
Tabla M.11. Condiciones utilizadas en la transformación de células competentes por electroporación.....	34
Tabla C1.1. Dianas putativas del complejo NGA-CRC-STY.....	70
Tabla C1.2. Dianas putativas del complejo NGA-CRC-STY.....	71
Tabla C2.1. Frecuencias obtenidas tras el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> para cada una de las construcciones utilizadas.	100

INTRODUCCIÓN



1. El gineceo de las angiospermas. Importancia evolutiva.

Las angiospermas son el grupo más grande y diverso de las plantas terrestres, y su forma de proteger las semillas contrasta con las gimnospermas, el grupo más antiguo de plantas con semillas, donde los óvulos se presentan la mayoría de las veces como estructuras desnudas. De hecho, ya los propios términos "angiospermas" y "gimnospermas" describen esta diferencia, ya que se refieren, respectivamente, a semillas cerradas y desnudas (del griego angeion=recipiente, gymnos= desnudo y esperma= semilla) (Ferrándiz et al., 2010).

En las angiospermas, los óvulos están contenidos y protegidos por el gineceo, que es un órgano especializado de la flor que ha supuesto una importante innovación evolutiva para este grupo de plantas, y probablemente es el responsable de gran parte del éxito evolutivo de las plantas con flores (Scutt et al., 2006). El gineceo proporciona una cubierta cerrada que protege a los óvulos durante su desarrollo. En la flor podemos encontrar gineceos formados por un solo carpelo, por varios carpelos sin fusionar o por una estructura sincárpica de carpelos múltiples fusionados. A pesar de la diversidad morfológica de los gineceos a lo largo de las angiospermas, todos comparten un plan de organización básico. En el ápice del carpelo se encuentra el estigma, que es el encargado de capturar el polen y de su germinación, discriminando que sólo lo haga aquel compatible, tanto inter- como intraespecíficamente (mediante mecanismos como la auto-incompatibilidad), con el fin de promover la viabilidad y la variabilidad genética. La conexión entre el estigma y el ovario se da a través del estilo, que es una estructura de tipo tubular que contiene tejidos transmisores encargados de hacer crecer los tubos polínicos y dirigirlos hacia los óvulos. En la parte basal del gineceo se encuentra el ovario, donde están albergados los óvulos. Tras la fecundación, el ovario da lugar al fruto, que en ocasiones puede incorporar otras partes de la flor, y su función es proteger las semillas en desarrollo y asegurar su posterior dispersión (Ferrándiz et al., 2010).

Introducción

El gineceo de *Arabidopsis thaliana* está formado por un pistilo bicarpelar. En antesis, se diferencian claramente los diferentes módulos funcionales. En el eje apical-basal, se encuentra el estigma, un estilo corto, un ovario bilocular y en la posición basal se encuentra un ginóforo corto (Fig. I1, A). Al observar transversalmente el ovario se pueden distinguir 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 (Fig. I1, B). Tras la fertilización, los márgenes de valva se diferencian en las zonas de dehiscencia a ambos lados del replum (Balanzá et al., 2006).

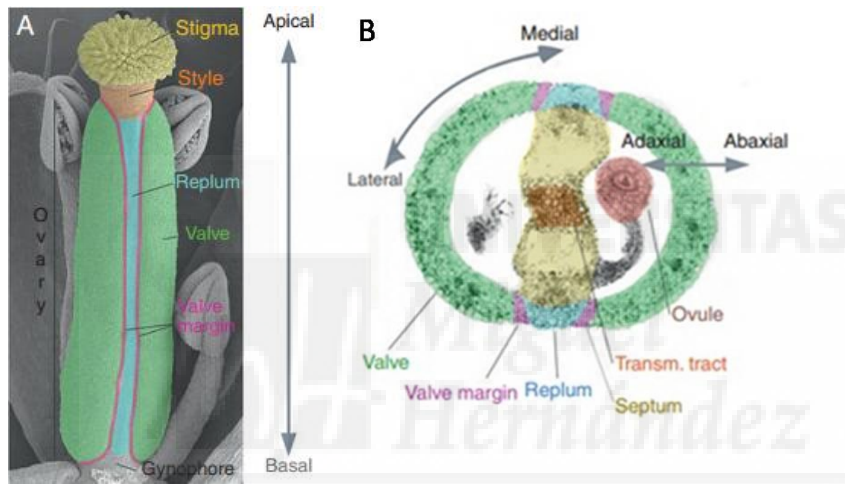


Figura I1. Estructura del gineceo de *A. thaliana*. (A) Micrografía electrónica de barrido del gineceo maduro en antesis, coloreada artificialmente para marcar los diferentes dominios funcionales. (B) Corte transversal del ovario en antesis, coloreado artificialmente para marcar los diferentes dominios funcionales. Fotografía modificada tomada de Ferrándiz et al., (2010).

En *Arabidopsis* se han estudiado extensamente las redes genéticas que regulan el desarrollo de los diferentes tejidos que componen el gineceo. En los últimos años se han identificado varios factores genéticos y hormonales necesarios para la especificación de la identidad del gineceo o para su desarrollo, así como algunas de sus interacciones y jerarquías de regulación. A partir de estos estudios, se han propuesto las redes genéticas que dirigen los diferentes módulos funcionales de los pistilos de *Arabidopsis* y, aunque todavía estamos lejos de completar una red integrada que proporcione una visión global de la morfogénesis espacio-temporal del pistilo, entendemos cada vez mejor cómo se forman los bloques básicos que componen un gineceo funcional (Ballester y Ferrándiz,

2016; Chávez-Montes et al., 2015; Ferrándiz et al., 2010; Marsch-Martínez y de Folter, 2016; Reyes-Olalde et al., 2013). Sin embargo, se dispone de muy poca información en otras especies de Angiospermas sobre el papel de las funciones genéticas en las jerarquías de regulación más básicas que dirigen la morfogénesis y el desarrollo del gineceo (Fourquin y Ferrándiz, 2012).

La importancia evolutiva del gineceo ha inspirado muchos trabajos sobre el estudio de su origen evolutivo y la conservación de las funciones genéticas que especifican su identidad (Bowman et al., 1989; Bradley et al., 1993; Davies et al., 1999; Dreni et al., 2011; Fourquin y Ferrándiz, 2012; Pan et al., 2010; Yellina et al., 2010). Además, la creciente disponibilidad de secuencias de genomas de distintas plantas ha permitido reconstruir filogenias para muchas de las familias de genes implicadas en el desarrollo del gineceo con un buen muestreo taxonómico y, por tanto, proponer hipótesis sobre la posible evolución de las redes genéticas que dirigen el desarrollo del pistilo (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017a y b). No obstante, sería necesario complementar estos trabajos realizando estudios funcionales en especies de diferentes categorías taxonómicas, que aún son escasos. En este contexto, es especialmente interesante explorar la conservación funcional de los elementos que dirigen la formación del estilo y del estigma, ya que estos tejidos sólo se encuentran en las angiospermas y están íntimamente relacionados con el origen evolutivo del gineceo (Gomariz-Fernández et al., 2017).

2. Factores de transcripción que influyen en el desarrollo del gineceo.

La enorme diversidad y potencial de las herramientas genéticas disponibles para *Arabidopsis* ha hecho posible en los últimos años la identificación de varios genes implicados en la correcta diferenciación de los tejidos y estructuras del gineceo, y que, en su mayor parte, codifican factores de transcripción (TFs) (Balanzá et al, 2006; Ferrándiz et al, 2010). El trabajo de varios grupos de investigación, incluido el nuestro, ha hecho posible que se empiecen a comprender las redes genéticas que participan en la diferenciación y la coordinación de los procesos de desarrollo del gineceo. El gen clave

Introducción

que especifica la identidad del carpelo es el gen de tipo MADS-box *AGAMOUS* (*AG*), y su acción parece estar ampliamente conservada en las 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 (Sundberg y Ferrándiz, 2009; Yanofsky et al., 1990). Los factores de transcripción MADS-box *SHATTERPROOF 1* (*SHP1*) y *SHATTERPROOF 2* (*SHP2*) están implicados en la especificación de la identidad del margen de valva y el estigma (Favaro et al., 2003; Liljegren et al., 2000). *SHP1/2* y *AG* pertenecen al mismo clado dentro de la familia de los genes MADS, siendo muy similares a nivel de secuencia. Otros trabajos, como por ejemplo, estudios de complementación funcional, han mostrado que las proteínas *SHP* y *AG* son prácticamente intercambiables y pueden realizar funciones muy similares (Fig. I2, B,C); sin embargo, el que tengan papeles distintos durante el desarrollo del gineceo parece residir en las diferencias en sus patrones de expresión (Pinyopich et al., 2003).

Otros dos factores de transcripción, *CRABS CLAW* (*CRC*), de tipo *YABBY* (*YAB*), y *SPATULA* (*SPT*), de tipo *bHLH*, son necesarios para el desarrollo de los tejidos marginales del gineceo (placentas, estilo, estigma y tracto de transmisión), y parecen actuar por debajo de *AG* y *SHP*. *CRC* se caracteriza por poseer un dominio tipo zinc-finger y un dominio con homología en dos alfa-hélices a proteínas de tipo *HMG* (*High Mobility Group*), y tiene una función clave en el desarrollo del estilo, y en menor medida del estigma (Bowman y Smyth, 1999). *CRC* suprime el crecimiento radial del gineceo en desarrollo pero promueve su crecimiento longitudinal, mientras que la función de *SPT* es principalmente asegurar el desarrollo adecuado del tracto de transmisión y el estigma (Álvarez y Smyth, 1999). *SPT* se expresa en diferentes tipos celulares y órganos a lo largo del desarrollo y tanto en estructuras reproductivas como vegetativas (Heisler et al. 2001), mientras que *CRC* se expresa específicamente en los nectarios y en el carpelo (Bowman y Smyth 1999). El mutante *crc* (Fig. I2, D) se caracteriza por la ausencia de nectarios, y un gineceo más corto y ancho que el silvestre en el que la zona apical aparece sólo parcialmente fusionada y está poco desarrollada (Bowman y Smyth, 1999). En el doble mutante *crc spt* (Fig. I2, E), el gineceo está completamente sin fusionar y exhibe una reducción notable en el número de óvulos y de los tejidos estilar y estigmático (Álvarez y Smyth, 1999). Estos hechos sugieren fuertemente de que *CRC* y *SPT* intervienen en la función de identidad de carpelo junto con *AG* y *SHP* (Álvarez y Smyth, 1999).

Tanto *SHP* como *AG* parecen estar actuando al principio de la ruta de identidad del carpelo, y podrían desde esta posición activar directa o indirectamente a *SPT* y *CRC*. Además, *CRC* ha sido identificado como una diana directa de *AG* (Gomez-Mena et al., 2005). Sin embargo, se conoce menos sobre la cómo se regula *SPT*.

Ya que en el presente trabajo se pretende conocer cómo se organizan los tejidos apicales presentes en el gineceo de las angiospermas, nos centraremos en describir aquellos factores de transcripción que tienen un papel relevante en la diferenciación de la zona apical del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.

SPT, además de tener como función el correcto desarrollo del tracto de transmisión, también actúa junto a los genes *HECATE* (*HEC1*, *HEC2* y *HEC3*), que codifican factores de transcripción de tipo bHLH, dirigiendo la correcta formación del estigma. Los genes *HEC* actúan de forma redundante, y mientras el mutante doble *hec1 hec3* muestra defectos en estilo y estigma muy similares al mutante *spt* (Fig. I2, G), el triple mutante *hec1 hec2 hec3* (Fig. I2, F) presenta defectos de desarrollo más severos que *spt* (Fig. I2, G) y además es completamente estéril. Por otro lado, la sobreexpresión de los genes *HEC* produce tejido estigmático ectópico, además de otras alteraciones severas en la morfología del gineceo, como valvas reducidas y ginóforo elongado. También se ha probado mediante ensayos de doble híbrido de levadura que los factores de transcripción *HEC* forman heterodímeros con *SPT* (Gremski et al. 2007).

SPT también puede interactuar con el factor de transcripción *INDEHISCENT* (*IND*) (Girin et al. 2011), de tipo bHLH y parálogo cercano de los factores *HEC* (Gremski et al. 2007). Inicialmente, *IND* fue caracterizado por su implicación en la especificación del margen de valva, y su papel esencial en la diferenciación de los tipos celulares que formarán la zona de dehiscencia tras la fertilización del gineceo (Liljegren et al., 2004; Sorefan et al., 2009), aunque también se ha descrito su implicación en el desarrollo del estigma (Girin et al., 2011). Los mutantes *ind* (Fig. I2, H), además de tener frutos totalmente indehiscentes, presentan una reducción leve en la longitud de las papilas estigmáticas; sin embargo, el doble mutante *spt ind* (Fig. I2, I) muestra defectos severos en la diferenciación de estos tejidos que recuerdan a los reportados para el triple mutante *hec1 hec2 hec3* (Fig. I2, F), que carece totalmente de estigma (Girin et al., 2011). Además, las líneas de sobreexpresión *35S::IND* (Fig. I2, J) presentan ovarios reducidos con células pequeñas en las valvas, el replum en forma de zig-zag, un estilo más elongado y una sobreproducción de tejido estigmático en los casos donde el

Introducción

fenotipo es más acusado, en muchos aspectos similares a los causados por la sobreexpresión de *HEC* (Girin et al. 2011; Liljegren et al., 2004).

Junto con *IND* actúa otro factor de transcripción de tipo bHLH, *ALCATRAZ* (*ALC*), para dirigir la formación del margen de valva. Los mutantes *alc* tienen un fenotipo menos severo que los *ind*, (Fig. I2, H) ya que sólo presentan defectos en la capa de separación de la zona de dehiscencia, y por tanto mostrando un leve fenotipo indehiscente (Rajani y Sundaresan, 2001). *ALC* y *SPT* están muy relacionados filogenéticamente; además, presentan patrones de expresión solapantes, y ambas proteínas interaccionan entre sí dando lugar a heterodímeros (Groszmann et al., 2008; Groszmann et al., 2011). Groszmann et al., (2011) observaron que el doble mutante *spt alc* (Fig. I2, K) tenía muy afectada la parte apical del gineceo, presentando defectos más severos que los mutantes *spt* (Fig. I2, G), y también mostraba alteraciones más pronunciadas en el margen de valva, lo que producía frutos menos dehiscentes que el mutante simple *alc*. Estas evidencias indicaban que los genes *ALC* y *SPT* regulan el desarrollo del gineceo de forma parcialmente redundante.

Por otro lado, se ha demostrado que la señalización mediada por las auxinas es esencial para establecer la polaridad apical-basal en el pistilo de *Arabidopsis*, para el correcto desarrollo del estilo y estigma y para asegurar el cierre apical (Larsson et al., 2014; Moubayidin y Ostergaard, 2014; Sundberg y Ostergaard, 2009). Además de los factores ya descritos, hay dos familias de factores de transcripción que son esenciales para la formación del estilo y el estigma, y, al menos en parte, ejercen estas funciones mediante la regulación de la síntesis, el transporte y la respuesta de auxinas. Estas dos familias son las conformadas por los cuatro genes *NGATHA* (*NGA*), que pertenecen al clado RAV de la familia de factores de transcripción dominio B3 (Álvarez et al., 2009; Trigueros et al., 2009), y la familia de factores de transcripción tipo zinc-finger SHORT INTERNODES/STYLISH/SHI-RELATED-SEQUENCE (*SHI/STY/SRS*), formada por 10 genes que desempeñan papeles similares a los genes *NGA* en el desarrollo del pistilo de *A. thaliana* (Kuusk et al., 2002, 2006). Sobre estos genes se hablará de forma más extensa en el siguiente apartado.

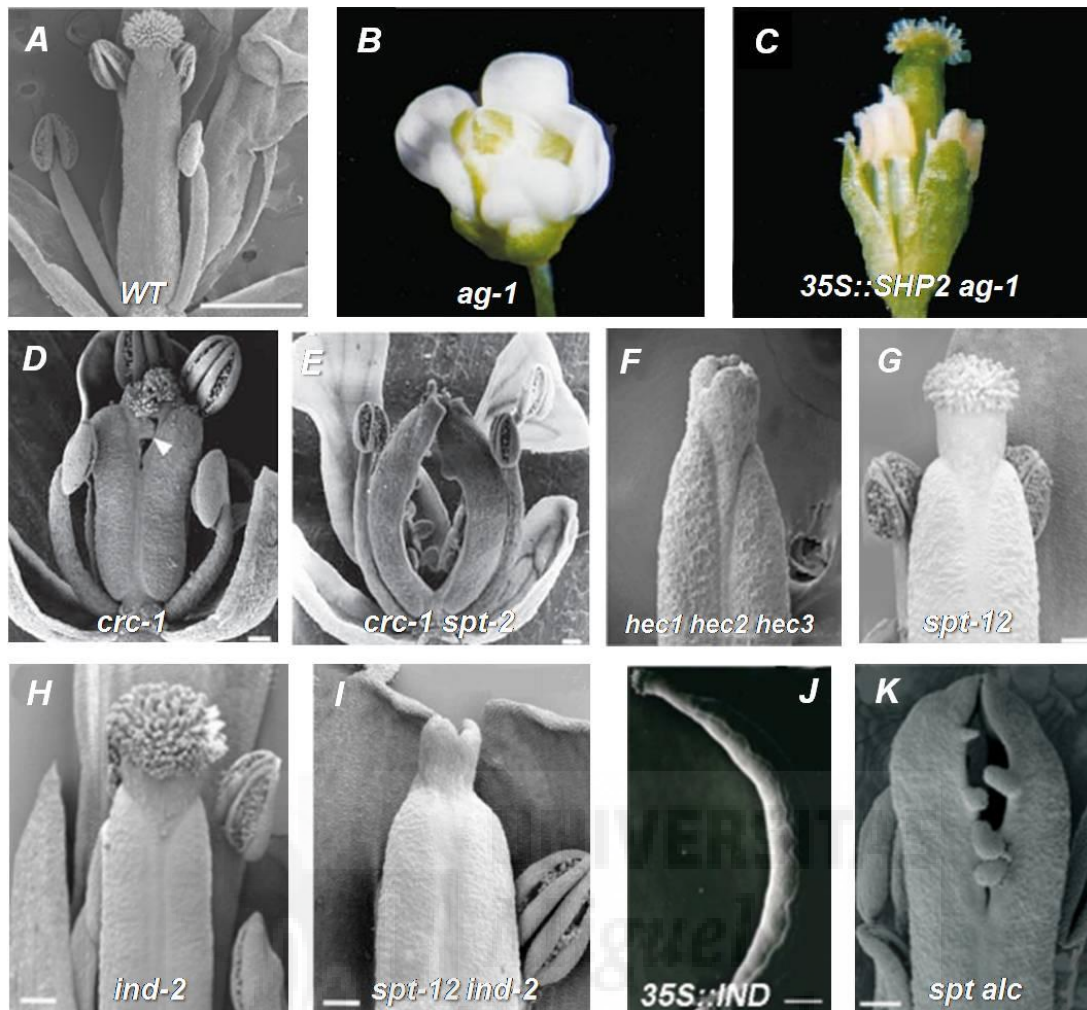


Figura 12. Fenotipos de mutantes y/o sobreexpresores de algunos de los genes implicados en el desarrollo del gineceo. (A) Fotografía al microscopio de barrido (SEM) de una flor silvestre de *Arabidopsis* (Escala 200µm), (B) fotografía a bajo aumento de una flor del mutante *ag-1* (tomada de Pinyopich et al., 2003), (C) fotografía a bajo aumento de la sobreexpresión de *SHP2* en fondo mutante *ag-1* (tomada de Pinyopich et al., 2003), (D-K) fotografías al microscopio de barrido (SEM), (D) flor mutante *crc-1* (E=100µm) (tomada de Álvarez y Smyth, 1999), (E) flor del doble mutante *crc-1 spt-2* (E=100µm) (tomada de Álvarez y Smyth, 1999), (F) gineceo del triple mutante *hec1 hec2 hec3* (tomada de Schuster et al., 2015), (G) gineceo mutante *spt-1 2* (E=100µm) (tomada de Girin et al., 2011), (H) gineceo mutante *ind-2* (E=100µm) (tomada de Girin et al., 2011), (I) gineceo del doble mutante *spt-1 2ind-2* (E=100µm) (tomada de Girin et al., 2011), (J) gineceo de una línea de sobreexpresión de *IND* (E=500µm) (tomada de Liljegren et al., 2004), (K) gineceo del doble mutante *spt alc* (E=100µm) (tomada de Groszmann et al., 2011).

3. Factores de transcripción con un papel relevante en la formación del gineceo. Los factores *STY*, *NGA* y *CRC* en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

Como ya se ha mencionado, los genes de la familia *SHI/STY/SRS* juegan un papel fundamental en el desarrollo de los tejidos del dominio apical del gineceo de *Arabidopsis*. Pertenecen a una familia de 10 genes que codifican factores de transcripción tipo zinc-finger que regulan el desarrollo del estilo y el estigma actuando de forma redundante. *STYLISH 1* (*STY1*) es el único de estos factores de transcripción que presenta fenotipo como mutante sencillo, observándose defectos sutiles en el desarrollo del estilo en los mutantes *sty1-1* (Fig. I3, B) (Kuusk et al., 2002). Estos defectos se van volviendo más acusados a medida que se van añadiendo mutaciones en los miembros de esta familia. De esta manera, los mutantes múltiples de la familia *SHI/STY/SRS* muestran defectos severos en el desarrollo del gineceo (Fig. I3, C,D), como reducción pronunciada de tejido estigmático y estilar, un septum que no se desarrolla correctamente y una zona apical del gineceo que no se cierra completamente, de modo que en los mutantes cuádruples o de mayor orden, el gineceo termina apicalmente como un tubo abierto con numerosas protrusiones cilíndricas que no desarrollan células de estilo o estigma (Kuusk et al., 2006). La sobreexpresión de *STY1* (Fig. I3, H) produce frutos aberrantes que muestran estilos cortos y compactos compuestos por células de tamaño y forma irregular, y sobre la superficie de las valvas se forman parches de células de estilo ectópicas (Kuusk et al., 2002). La actividad de *STY1* ha sido ligada a las auxinas, debido a que *STY1* activa de forma directa a *YUCCA4* (*YUC4*), un gen que codifica una enzima que participa en la biosíntesis de auxinas, y a otros genes implicados en la respuesta a esta hormona (Eklund et al., 2010; Sohlberg et al., 2006). Por otro lado, los genes *SHI/STY/SRS* no sólo tienen función en el desarrollo del gineceo, sino que participan en el desarrollo de otros órganos florales y también de la hoja, como muestran los mutantes múltiples de esta familia, que tienen órganos florales anómalos e incluso con transformaciones homeóticas, defectos en el desarrollo vascular de las hojas, y hojas ensanchadas con el borde aserrado (Kuusk et al., 2006).

Otros factores de transcripción con un papel relevante en el desarrollo del dominio apical de gineceo son los pertenecientes a la familia *NGATHA* (*NGA*),

formada por cuatro miembros, y que contienen un dominio B3 de unión a DNA. Los factores *NGA* también actúan de forma redundante en la especificación de la identidad de estilo y estigma (Álvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009), para la que son esenciales. En los mutantes simples en los genes *NGA* no se observan defectos en la zona apical del gineceo o éstos son muy débiles, mientras que sus combinaciones triples (Fig. I3, E,F) o el cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4* (Fig. I3, G) carecen completamente de estilo y estigma, y la parte apical del gineceo no se fusiona, formando protrusiones cilíndricas indiferenciadas, de modo muy similar a lo reportado para los mutantes múltiples de la familia *SHI/STY/SRS* (Trigueros et al., 2009). Las líneas de sobreexpresión de *NGA* (Fig. I3, I) presentan defectos en la distribución de los tejidos a lo largo del eje apical-basal, como son una parte apical engrosada, ovarios pequeños, acortamiento de las valvas, ensanchamiento del replum, cuyas células se disponen en zig-zag, y ginóforos más largos (Trigueros et al., 2009).

Los factores de transcripción *NGA* y los pertenecientes a la familia *SHI/STY/SRS* comparten patrones de expresión similares, así como dianas comunes (por ejemplo, *YUC4*) (Martínez-Fernández et al., 2014; Sohlberg et al., 2006; Ståldal et al., 2012; Trigueros et al., 2009), y además parecen funcionar de modo muy similar como reguladores necesarios para dirigir el desarrollo del estilo y estigma (Kuusk et al., 2002, 2006; Trigueros et al., 2009). De hecho, la sobreexpresión simultánea de *NGA3* y *STY1* en *Arabidopsis* (Fig. I3, J, J') es suficiente para dirigir la formación de tejido de estilo ectópico a toda la superficie del ovario (Trigueros et al., 2009). Por otro lado, los genes *NGA* y *SHI/STY/SRS* no parecen regularse significativamente unos a otros, y la sobreexpresión de unos no es capaz de revertir los defectos en el gineceo causados por la mutación de los otros y viceversa (Trigueros et al., 2009), lo cual sugiere que podrían actuar conjuntamente y al mismo nivel dentro de la jerarquía regulatoria. Sin embargo, mientras que, partiendo de esta idea, podría plantearse la hipótesis de que lo hicieran formando parte de un complejo transcripcional, experimentalmente no ha podido determinarse que los factores *NGA* y *SHI/STY/SRS* puedan interactuar directamente (Trigueros et al., 2009; Navarrete-Gómez., 2011).

Un elemento que parece ser clave para explicar los efectos observados es el factor de transcripción *CRC*. Como ya se ha mencionado anteriormente, *CRC* es necesario para el correcto desarrollo del estilo (Bowman y Smyth 1999). *CRC* no se expresa sólo en las regiones apicales del gineceo, sino también en la epidermis de las valvas, que es el

Introducción

dominio que se presenta más afectado adquiriendo identidad de estilo cuando se sobreexpresan conjuntamente los genes *STY1* y *NGA3* (Navarrete-Gómez., 2011; Trigueros et al., 2009). También se ha demostrado mediante ensayos de Bi/TriFC que la proteína CRC es capaz de interactuar con las proteínas STY1 y NGA3 (Navarrete-Gómez 2011). Además, al sobreexpresar conjuntamente los genes *NGA3* y *STY1* en un fondo *crc* (Fig. I3, K) se revierte completamente la formación del tejido ectópico en la valva que se observaba en las líneas *35S::STY1 35S::NGA3*, apareciendo frutos con el tejido estigmático muy reducido y que sólo ocasionalmente desarrollan células estilares, que en caso de aparecer, se presentan como agrupaciones aisladas asociadas a las papilas estigmáticas. Estas evidencias parecen indicar que se necesita de la presencia de miembros de los tres tipos de factores de transcripción, SHI/STY/SRS, NGA y CRC, para la correcta formación del estilo, y si alguno de ellos no se expresa correctamente, se producen defectos en el extremo apical del gineceo. Por tanto, estos tres factores podrían estar formando un complejo proteico con funciones específicas (Navarrete-Gómez, 2011).



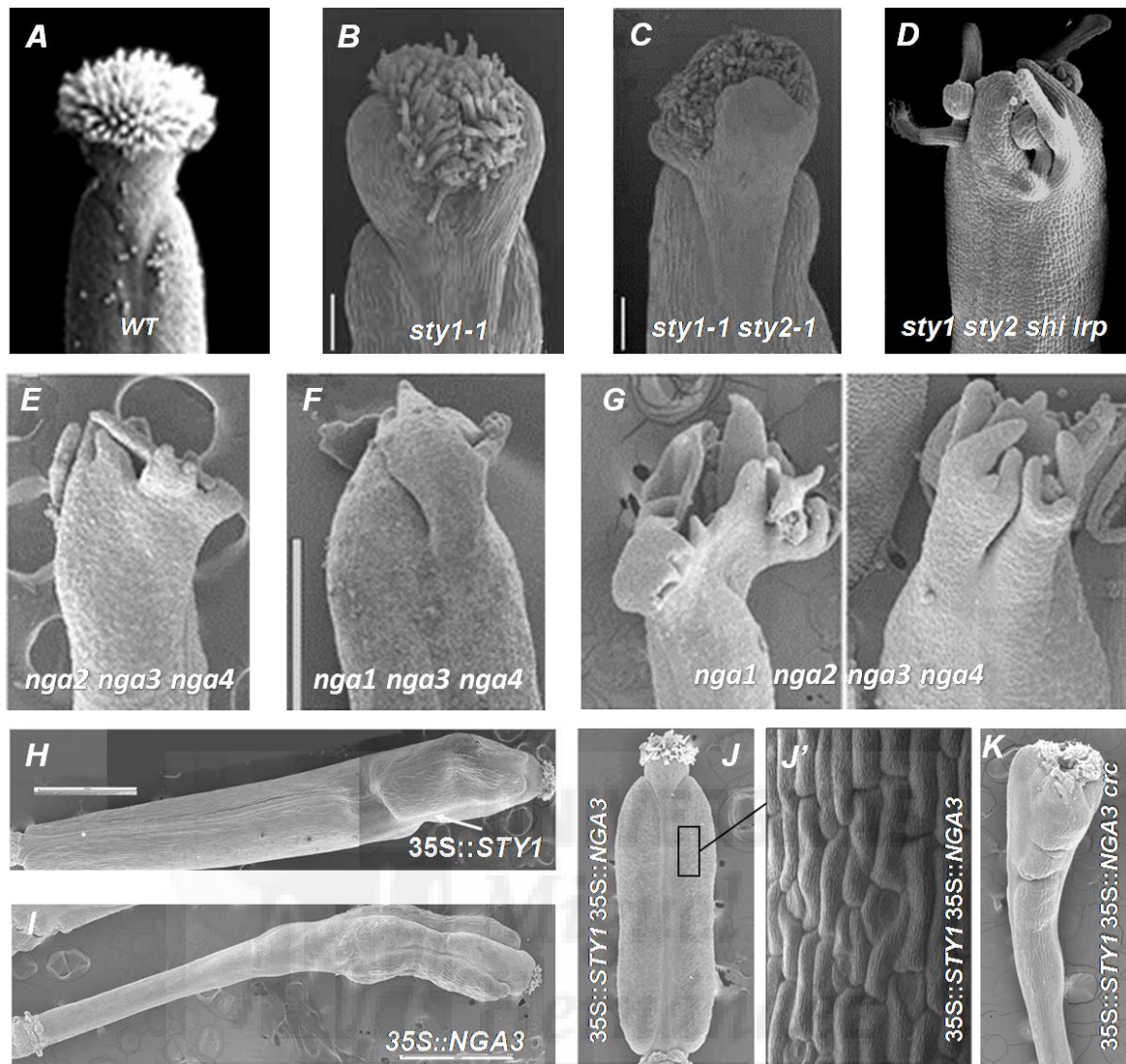


Figura I3. Fenotipos de las líneas con actividad NGA, STY y CRC alterada.

Fotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) de gineceos de (A) *Arabidopsis silvestre*, (B) mutante simple *sty1-1*, (E=100µm) (tomada de Kuusk et al 2002), (C) mutante doble *sty1-1 sty2-1* (E=100µm) (tomada de Kuusk et al 2002), (D) mutante cuádruple *sty1 sty2 shi lrp* (tomada de Kuusk et al 2006), (E) triple mutante *nga2 nga3 nga4* (tomada de Trigueros et al 2009), (F) triple mutante *nga1 nga3 nga4* (E=500µm) (tomada de Trigueros et al 2009), (G) cuádruple mutante *nga1nga2 nga3 nga4* (tomada de Trigueros et al 2009), (H) silicua de 35S::STY1 (E= 1 mm) (tomada de Trigueros et al 2009), (I) silicua de 35S::NGA3 (E=1 mm) (tomada de Trigueros et al 2009), (J) gineceo de 35S::STY1 35S::NGA3, presenta el mismo aspecto que un gineceo silvestre pero su tamaño es más reducido y las células de las valvas son células de estilo (tomada de Trigueros et al 2009), (J') detalle de las valvas de 35S::STY1 35S::NGA3, se puede observar como en las valvas encontramos células de estilo (tomada de Trigueros et al 2009), (K) gineceo 35S::STY1 35S::NGA3 en fondo *crc* (Navarrete-Gómez, 2011).

4. El complejo transcripcional STY-CRC-NGA y su papel en la morfogénesis de la parte apical del fruto.

Los factores de transcripción suelen ensamblarse en forma de complejos multiméricos para regular la transcripción de sus dianas. En la literatura pueden encontrarse multitud de ejemplos referentes al modo de acción de estos complejos, de cómo su composición afecta a su actividad, al reconocimiento de sus dianas, etc. (Gómez-Mena et al., 2005; Kauffmann et al., 2010; Marsch-Martínez et al., 2014). En este contexto, y aunque hay algunos ejemplos ya descritos (Girin et al. 2011; Groszmann et al., 2010), no se han definido con precisión qué complejos transcripcionales participan de un modo relevante en la morfogénesis del carpelo. Entre otras evidencias, los resultados descritos anteriormente para la acción cooperativa de STY, CRC y NGA, o la falta de una estructura jerárquica clara en las redes genéticas que regulan el desarrollo de los pistilos descritas hasta el momento, sugieren un modelo combinatorial, en el que los diferentes factores de transcripción que participan en este proceso podrían estar formando parte de complejos en combinaciones diferentes, de modo que podrían definir la identidad y la distribución de los distintos módulos funcionales del gineceo en función de las distintas interacciones que establecen entre sí al formar complejos multiméricos, siendo la composición particular de cada complejo en un dominio espacial concreto la que aportaría especificidad funcional.

En plantas, el modelo combinatorial por excelencia es el propuesto para la especificación de los órganos florales, el llamado modelo ABCE o modelo del cuarteto, según el cual los factores de transcripción tipo MADS, que se expresan en dominios solapantes del meristemo floral, forman tetrámeros de composición diferente en cada verticilo. La composición de estos tetrámeros determina la identidad de los órganos florales, aunque no se conocen completamente los mecanismos en los que se basa su selectividad. Este modelo ha sido ampliamente validado genética y molecularmente, y hoy en día constituye un paradigma de la Biología de Plantas (Bowman et al., 1991; Coen y Meyerowitz, 1991; Krizek y Fletcher, 2005; Theissen y Melzer, 2007; Weigel y Meyerowitz, 1994). Según este modelo, existen cuatro tipos de funciones: A, B, C y E. Cada una de ellas estaría asociada a distintos tipos de factores de transcripción, en concreto: APETALA 1 (AP1) y APETALA 2 (AP2) de tipo A; de tipo B, PISTILLATA (PI) y APETALA 3 (AP3); de tipo C, AGAMOUS (AG) y de tipo E, SEPALLATA

(SEP), y las distintas funciones/ factores se combinarían formando complejos proteicos en diferentes dominios de expresión. Cada combinación de estos factores daría lugar al desarrollo de los diferentes órganos florales (Coen y Meyerowitz, 1991; Theissen y Saedler, 2001); de esta manera las funciones A+E darían lugar a los sépalos; las funciones A+B+E especificarían los pétalos; la combinación B+C+E daría especificidad a los estambres y C+E formaría los carpelos (Chanderbali et al., 2010; Pelaz et al., 2001; Robles y Pelaz, 2005; Theissen, 2001) (Fig. I4). En este contexto, y basado en diversas evidencias genéticas y moleculares obtenidas en nuestro laboratorio en trabajos anteriores (Ballester, 2016; Navarrete-Gómez, 2011), hemos propuesto un modelo, que denominamos *Carpel Code*, según el cual la identidad del estilo y del estigma (al menos) dependería de la formación de dos tipos de complejos: STY-CRC-NGA en el dominio en el que se formaría el estilo, y NGA-HEC-IND-SPT en el que se formaría el estigma (Fig. I5). Dentro de este esquema general, uno de los objetivos de este trabajo ha sido aportar evidencias sobre los posibles mecanismos moleculares que explicarían que el complejo STY-CRC-NGA defina la identidad del estilo, determinando sus dianas transcripcionales específicas.

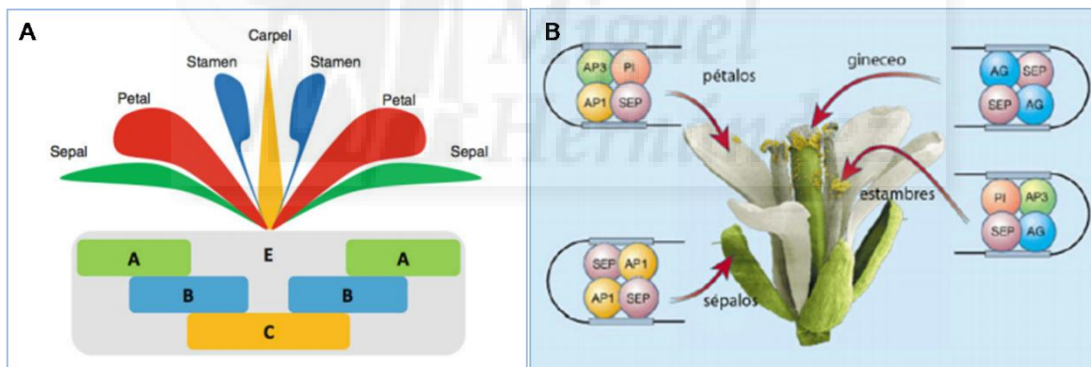


Figura I4. Representación gráfica del modelo ABCDE. (A) La expresión de los genes A y E determina la formación de los sépalos; si se expresan conjuntamente con los genes B darán lugar a los pétalos; la expresión de los genes B, C y E determina la formación de los estambres; y cuando únicamente se expresan los genes C y E se formará el carpelo (tomada de Chanderbali et al. 2010). (B) Representación de las distintas combinaciones de los genes homeóticos A, B, C o E que da identidad a cada uno de los órganos florales (Pelaz et al., 2001) (modificada de (Soltis et al., 2007)).

Por otro lado, distintos estudios han determinado que la evolución de la morfología floral está relacionada con la variación en la formación de los cuartetos

Introducción

propuestos por el modelo ABCE en diferentes especies. Esto sugiere que, si los complejos transcripcionales particulares propuestos por *Carpel Code* son importantes para la morfogénesis del gineceo, el estudio de sus variaciones puede aportar pistas para entender la evolución de estos órganos.

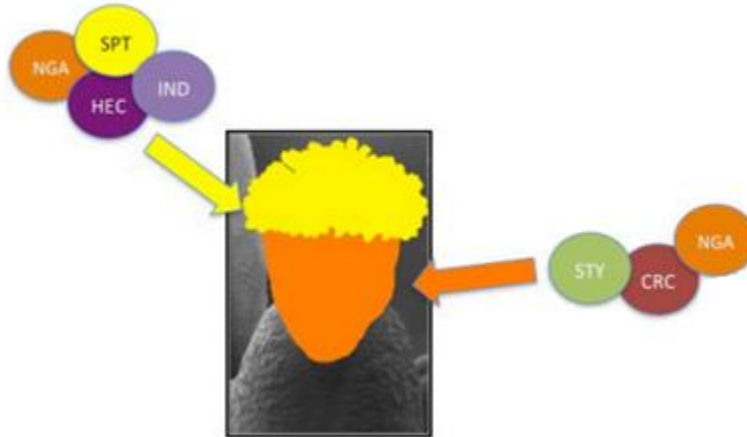


Figura I5. Representación de los complejos transcripcionales propuestos en el *Carpel Code*. Se muestran los posibles complejos que darían lugar al estigma y al estilo de *Arabidopsis thaliana*. El estigma vendría especificado por el complejo formado por (al menos) los factores SPT, IND, NGA y HEC, y el complejo responsable de la formación del estilo estaría formado por los factores STY, CRC y NGA (tomada de Ballester, 2016).

Existe muy poca información disponible sobre la morfogénesis del estilo y estigma en especies distintas a *Arabidopsis*, aunque a través de estudios comparativos sobre especies distantes de angiospermas se está alcanzando un cierto conocimiento de las diferentes rutas moleculares involucradas en el desarrollo apical del gineceo. Hasta el momento se han identificado homólogos a los genes *STY*, *CRC* y *NGA* en muchas especies de angiospermas (Fourquin y Ferrándiz, 2014; Orashakova et al., 2009, Pfannebecker et al, 2017a y b). Sobre los ortólogos de *NGA*, se ha reportado que su papel en el desarrollo del gineceo está fuertemente conservado en especies lejanas evolutivamente como la dicotiledónea basal *Eschscholzia californica* y la astérida *Nicotiana benthamiana*, donde la inactivación de la *NGA* conduce a la ausencia de estilo y de la diferenciación del estigma (Fourquin y Ferrándiz, 2014). También se han publicado estudios funcionales en estas especies sobre el efecto de la inactivación de *CRC* tanto en *Eschscholzia californica* como en *Nicotiana benthamiana*. Estos estudios muestran que en *E. californica*, las plantas que silencian *EcCRC* mediante VIGS

producen flores con pérdida de la determinación del meristemo floral, frecuentemente dando lugar a la duplicación del cuarto verticilo floral, resultando en un gineceo que rodea a un segundo gineceo interno, e incluso ocasionalmente a más verticilos internos. Sin embargo, el patrón apical-basal de los frutos o el desarrollo de estilo y estigma no se ven afectados y la fusión del carpelo se produce de forma completa (Orashakova et al., 2009). Por otro lado, el silenciamiento de *CRC* en *N. benthamiana* mediante VIGS resulta en fenotipos más severos, como la pérdida de los nectarios, la pérdida de fusión del carpelo y una reducción en la determinación del meristemo floral (Lee et al., 2005). Además de estos estudios, también se ha reportado que los patrones de expresión de *CRC* están muy conservados en especies distantes como *Lepidium africanum*, *Cleome sparsifolia*, *Capparis flexuosa*, *Petunia hybrida*, *Aquilegia Formosa* (Lee et al., 2005) o *Amborella trichopoda* (Fourquin et al., 2005). Además, estudios de complementación heteróloga realizados con el ortólogo de *CRC* de especies distantes como *Gossypium hirsutum* (*GhCRC*), *Oryza sativa* (*DL*) o *Amborella thricopoda* (*AmCRC*) han mostrado que los ortólogos de *CRC* en estas especies son capaces de rescatar completa (*GhCRC* y *DL*) o parcialmente (*AmCRC*) los defectos fenotípicos de los mutantes *crc-1* cuando se expresan bajo el control del promotor *CRC* de *Arabidopsis* (Fourquin et al., 2007; Lee et al., 2005). En cuanto a la conservación funcional de los genes de la familia *SHI/STY/SRS*, se ha reportado que la relación de éstos con la señalización de auxinas parece estar muy conservada no sólo en angiospermas, sino ampliamente en las plantas terrestres, así como su papel general en el control de la arquitectura de la planta y, posiblemente, otras vías hormonales (Eklund et al., 2010a; Islam et al., 2013; Youssef et al., 2017). Sin embargo, el papel de los genes *SHI/STY/SRS* en el desarrollo del gineceo no ha sido explorado en detalle fuera de las Brasicáceas, aunque se ha descrito que los mutantes del gen *Lks2* en cebada, que es un miembro de la familia *SHI/STY/SRS*, presenta estigmas defectuosos (Yuo et al., 2012).

Así, un segundo objetivo general de esta tesis ha sido el comenzar a explorar si el complejo STY-CRC-NGA podría estar ligado a la evolución del estilo y el estigma, que, como ya se ha mencionado, son tejidos específicos de los gineceos de las plantas con flores. Para ello, hemos realizado una caracterización funcional de genes de la familia *SHI/STY/SRS* en dos especies de dicotiledóneas distantes filogenéticamente de *Arabidopsis*, como son *Eschscholzia californica* y *Nicotiana benthamiana*, para

Introducción

completar estudios previos sobre la función de *NGA* y *CRC* en estas especies, y hemos evaluado si los ortólogos en estas especies también son capaces de formar complejos proteicos equivalentes.



OBJETIVOS



Como se ha descrito en la introducción, basándonos en evidencias moleculares y genéticas obtenidas a partir de trabajos anteriores realizados en nuestro grupo, se ha propuesto un modelo, que denominamos *Carpel Code*, según el cual la identidad de los distintos módulos funcionales del gineceo estaría determinada por la formación de complejos transcripcionales en distintas combinaciones. Entre los complejos ya definidos, hemos propuesto que la identidad del estilo dependería del complejo proteico STY-CRC-NGA en el dominio en el que éste se estaría formando. A partir de estos antecedentes, nos planteamos dos objetivos principales:

1. Conocer los mecanismos moleculares que subyacen a la actividad del complejo transcripcional NGA-CRC-STY y que expliquen su papel en conferir la identidad del estilo en *Arabidopsis thaliana*.

Este objetivo principal se ha abordado mediante la búsqueda de dianas transcripcionales específicas del complejo.

2. Analizar si la formación del complejo STY-CRC-NGA estaría ligado a la evolución del estilo y el estigma.

Para llevar a cabo este segundo objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización funcional de genes de la familia *SHI/STY/SRS* en *Eschscholzia californica* y *Nicotiana benthamiana*, dos especies de dicotiledóneas distantes evolutivamente a *Arabidopsis*.
- Estudiar si los ortólogos de los genes *SHI/STY/SRS*, *NGA* y *CRC* en estas especies forman complejos transcripcionales equivalentes.
- Estudio de las dianas de *SHI/STY/SRS* en la especie no transformable *E. californica*.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Material biológico.

1.1. Material vegetal.

1.1.1. Ecotipos silvestres.

E. californica y *N. benthamiana* se cultivaron 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 n°1, suplementada con oligoelementos (Hewit, 1966). El germoplasma de *E. californica* utilizado en este estudio (número de identificación PI 599252) se obtuvo del Programa Nacional de Recursos Genéticos (Estados Unidos).

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se cultivaron en fitotrones 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%. El fitotrón se ilumina mediante tubos fluorescentes que proporcionan luz blanca fría, con una intensidad de 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ (Sylvania standard F58W/133-T8). El ecotipo silvestre utilizado pertenece al genotipo Col-0, con código NASC: N1092 (Redeí, 1962).

1.1.2. Líneas mutantes

Tabla M.1: Líneas mutantes utilizadas en esta tesis

GENOTIPO	ECOTIPO	MUTÁGENO	REFERENCIA
<i>sty1-1 sty2-1</i>	Col-0	Transposón dSpm	Kuusk et al., (2002)
<i>crc-1</i>	Ler	EMS	Álvarez y Smyth, (1999)

1.1.3. Líneas transgénicas

Tabla M.2: Líneas transgénicas utilizadas en esta tesis

LÍNEA	ECOTIPO	REFERENCIA
35S:: <i>STY1</i>	Col-0	Kuusk et al., (2002)
35S::GR:NGA1	Col-0	Ballester, (2016)
35S:: <i>STY1:GR</i>	Col-0	Kuusk et al., (2006)
35S::NbSRS-L1	Col-0	Este trabajo
35S::NbSRS-L2	Col-0	Este trabajo
35S::NbSRS-L3	Col-0	Este trabajo
35S::EcSRS-L	Col-0	Este trabajo

1.1.4. Microorganismos

Tabla M.3: Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis

CEPAS	USO	REFERENCIAS
Supercharge EZ10 (<i>Escherichia coli</i>)	Clonaje de vectores.	Clontech
C58 pMP90 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	Clonaje de vectores binarios utilizados para la transformación de plantas.	Koncz y Schell(1986)

1.2. Genotipado

1.2.1. Líneas transgénicas 35S::STY1:GR.

La tabla 5 recoge las condiciones de PCR utilizadas para genotipar las líneas transgénicas 35S::STY1:GR, así como los tamaños de las bandas esperadas en el gel.

Tabla M.4: Condiciones de PCR utilizadas para genotipar las líneas 35S::STY1:GR.

LÍNEA	PROGRAMA DE PCR	CEBADORES	BANDA
35S::STY1:GR	95°C 2 min 95°C 30 seg 57°C 30 seg 72°C 50 seg 72°C 5 min	35x oSTY-GR F oSTY-GR R	743pb

1.3. Construcciones

1.3.1. Vectores para clonar productos de PCR

Tabla M.5: Listado de los vectores utilizados para clonar productos de PCR.

VECTOR	CARACTERÍSTICAS
pCR8/GW/TOPO	Vector intermediario utilizado para clonar fragmentos amplificados mediante PCR teniendo como objetivo introducirlos posteriormente en plásmidos de destino mediante la reacción Gateway. Confiere resistencia a Espectinomicina.
pGem-T easy	Vector utilizado para clonar fragmentos de PCR, contiene elementos de unión de las RNA polimerasas T7 y SP6 para realizar transcripciones in vitro. Confiere resistencia a Ampicilina.

1.3.2. Vectores de transformación de plantas

Tabla M.6: Listado de los vectores utilizados en la transformación de plantas.

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. Confiere resistencia a Kanamicina.

1.3.3. Vectores para expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Tabla M.7: Listado de los vectores utilizados para la expresión transitoria en *N. benthamiana*.

VECTOR	CARACTERÍSTICAS
PYFC43 pYFN43	Vectores utilizados para la expresión de proteínas fusionadas a la mitad C-terminal y N-terminal de la proteína fluorescente amarilla. La expresión está bajo control del promotor constitutivo 35S. Confieren resistencia a Kanamicina. http://ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php

1.3.4. Vectores utilizados para el Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)

Tabla M.8: Listado de los vectores utilizados para en VIGS.

VECTOR	CARACTERÍSTICAS
pTRV1	Vector bipartito, sentido positivo del virus de RNA. TRV1 puede replicarse y moverse sistémicamente sin TRV2. Se utiliza junto con pTRV2 para silenciar genes. Actúa bajo el control del promotor constitutivo 2x35S. Confiere resistencia a Kanamicina.
pTRV2	Vector bipartito, sentido positivo del virus de RNA. En este vector se clona el inserto de cDNA entre el promotor 2x35S y un terminador de nopalina sintasa (NOST). Se utiliza junto con pTRV1 para silenciar genes. Confiere resistencia a Kanamicina.

1.3.5. Vectores utilizados para la transfección de protoplastos

Tabla M.9: Listado de los vectores utilizados para las transfección de protoplastos

VECTOR	CARACTERÍSTICAS
pBeaconRFP_GR	Vector de recombinación Gateway que contiene un casete de selección positiva de proteína fluorescente roja (RFP) y un receptor de glucocorticoides (GR). Se utiliza para transfectar soluciones de protoplastos. Confiere resistencia a Ampicilina.
pUC19-GFP	Vector utilizado para transfectar soluciones de protoplastos. Contiene un casete de selección positiva de proteína fluorescente verde (GFP). Confiere resistencia a Ampicilina.

1.3.6. Listado de vectores utilizados

Tabla M.10: Listado de plásmidos utilizados en esta tesis.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
pCR8/GW/TOPO	Spec ^r , sitios de unión para los cebadores M13D, M13R, GW1 y GW2.	Invitrogen
pGem-T easy	Amp ^r , lacZ, sitios de unión para los cebadores T7, SP6, M13D y M13R.	Promega
pMDC32	Kan ^r (bacterias) e Hygro ^r (plantas).	Invitrogen
pYFC43	Kan ^r .	pMDC43
pYFN43	Kan ^r .	pMDC43
pTRV1	Kan ^r	Amy Litt y Natalia Pabón-Mora (NYBG, USA)
pTRV2	Kan ^r , sitios de unión Xba1 en 5' y BamH1 en 3'.	Amy Litt y Natalia Pabón-Mora (NYBG, USA)
pBeaconRFP_GR	Amp ^r , sitios de unión para los cebadores GW1 y GW2.	Invitrogen
pUC19-GFP	Amp ^r	Javier Brumos (Laboratorio de Alonso-Stepanova, NCSU, USA)

1.4. Técnicas de biología molecular y celular.

1.4.1. Aislamiento DNA plasmídico de *E coli* y *A tumefaciens*.

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema Fast Plasmid Mini Kit de Eppendorf siguiéndose las recomendaciones suministradas por la casa comercial.

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* se utilizó el mismo método que para *E. coli*. La pureza y el rendimiento de la preparación de DNA obtenida por este procedimiento no eran suficientemente altos para realizar análisis de restricción del plásmido. Para solventar este problema, una alícuota de 1 μ L de esta preparación de DNA se utilizaba para transformar *E coli*; de uno de los clones transformantes de *E coli* obtenidos de ese modo, se hacía una nueva preparación de DNA plasmídico que se utilizaba para los análisis pertinentes.

1.4.2. Extracción y purificación de RNA total para síntesis de cDNA.

Para la extracción de RNA total de las plantas *E. californica* y *N. benthamiana*, que posteriormente se utilizó para la obtención de cDNA, se utilizó el sistema RNeasy Plant Minikit (Qiagen) 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 0.1-5 μ g de RNA total para sintetizar el cDNA utilizando el Kit First Strand cDNA synthesis (Amersham Biosciences).

1.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los diferentes cDNAs 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 retrotranscripción realizada sobre RNA total obtenido de plantas silvestres y las condiciones generales seguidas fueron:

Materiales y Métodos

Se añadieron a cada tubo: 1-1.25 μ M de cada primer (tabla 5); 1.25 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; 0.5 U Taq Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs); Tampón de PCR 1X (New England Biolabs) y 200 ng de DNA molde.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador “PTC-150” (“MJ Research”) con una incubación inicial de 98°C 30 seg; seguida de 30 ciclos de 98°C 10 seg, $T_{\text{anillamiento}}$ 30 seg y 72°C $t_{\text{extensión}}$; con una incubación final de 72°C 5 min. (tabla M4).

Nota: La temperatura de anillamiento ($T_{\text{anillamiento}}$) se estimó en función de la temperatura de fusión aproximada (T_m) de los cebadores 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 30 seg por kb.

La polimerasa utilizada (Phusion High-Fidelity) posee una tasa de error mínima, y actividad exonucleasa 3'-5'.

1.4.4. 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 μ g/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).

1.4.5. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, según se describe en el apartado anterior. Los fragmentos de interés se recortaron del gel con ayuda de una cuchilla y el DNA se purificó con el sistema

“QIAquick Gel Extraction Kit” de “QIAGEN”, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema permite la purificación de fragmentos de DNA de 70pb a 10Kb, aunque fragmentos ligeramente más grandes también pueden ser purificados eficientemente. La elución del DNA se llevó a cabo en agua para biología molecular de “Sigma-Aldrich” (www.sigmaaldrich.com).

1.4.6. Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Para cada enzima se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las reacciones se llevaron a cabo con 5-10 unidades de enzima por μg de DNA, durante 1-2 horas a la temperatura óptima en cada caso. A continuación, se analizó el resultado de las diferentes reacciones mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa.

1.4.7. Clonaje de los fragmentos amplificados por PCR en el vector intermediario.

Los cDNAs obtenidos mediante PCR se clonaron, o bien en el plásmido intermedio pCR8/TOPO/GW, que permitían su posterior secuenciación, y su rápida clonación en otros vectores mediante el sistema de recombinación Gateway; o bien en el plásmido pGEM-T easy hasta estar seguros de que se amplificaba el gen buscado. Los vectores obtenidos se comprobaron por digestión con enzimas de restricción específicos, y posteriormente por secuenciación.

1.4.8. Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias obtenidas.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular y Celular de Planta (UPV-CSIC, Valencia) con el sistema “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” de “Applied Biosystems”. La reacción de secuenciación se realizó en termocicladores “ABI GeneAmp PCR System 9700” y la resolución y análisis de los productos se realizó en

Materiales y Métodos

un secuenciador capilar “ABI 3100” de “Applied Biosystems”. Las muestras de DNA se prepararon según se indica en www.ibmcp.upv.es.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el software de análisis de secuencias MacVector 12.0 (MacVector.com). Para identificar las secuencias se hizo un análisis con BLAST (tBLASTn) y para realizar los alineamientos de secuencias se utilizó la herramienta ClustalW del paquete.

1.4.9. Transformación de células competentes de *E.coli* y *A. tumefaciens* por electroporación.

En primer lugar se descongela en hielo una alícuota de células competentes. A continuación se añade 1µL de DNA y se homogeniza. La mezcla se introduce en una cubeta de 0,1cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo y se somete a un pulso eléctrico. Para ello se utiliza el aparato GenePulse TM (BioRad), con las condiciones que se muestran en la tabla M6.

Tabla M.11. Condiciones utilizadas en la transformación de células competentes por electroporación.

Células	Ω	µF	kV
<i>E.coli</i>	200	25	1.8
<i>A.tumefaciens</i>	400	25	1.8

Tras el pulso eléctrico se añade a la cubeta 1 ml de LB sin antibióticos y las células se transfieren a un tubo eppendor f limpio y se incuban durante 1 hora a 37°C para *E.coli* y 3h a 28°C para *A.tumefaciens*. Transcurrido ese tiempo, se siembra 50 µl de la suspensión por un lado y el resto de la suspensión concentrada por otro lado en placas con el antibiótico correspondiente. Las bacterias se seleccionan mediante digestión del DNA plasmídico.

1.5. Técnicas de microscopía.

1.5.1. 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.

1.5.2. Microscopía óptica

Las muestras montadas en portaobjetos fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Nikon Eclipse E-600 acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon DigitalSight (DS-Ri1) y un ordenador con el software de análisis de imagen NIS-Elements F3.0. Las muestras fueron observadas con iluminación de campo claro.

1.5.3. Microscopía confocal

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

1.5.4. Microscopía electrónica de barrido

Previamente a la visualización, se llevó a cabo la fijación del material vegetal en FAE (etanol 50%, ácido acético glacial 5%, formaldehído 3.7%), inmediatamente después de su recolección. El material se mantuvo en FAE toda la noche a 4°C y al día siguiente se sustituyó por etanol 70%. En este punto las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente a 4°C hasta el momento en el que vayan a ser analizadas al microscopio.

Al día siguiente se incubaron las muestras durante 30 min en etanol al 80%, 30 min en etanol al 90%, y finalmente 1 hora en etanol absoluto, este último paso se repitió al menos 3 veces, la última vez antes de someterlas al punto crítico.

El punto crítico consiste en la sustitución del etanol de la muestra por 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 atmósfera 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.

1.6. Metodología de plantas

1.6.1. Fertilización cruzada

En el primer capítulo de este trabajo ha sido necesaria la fertilización cruzada de plantas de *Arabidopsis* para la obtención de las líneas: 35S::GR:NGA 35S::STY:GR y 35S::GR:NGA 35S::STY:GR *crc*. El procedimiento para cruzar plantas de *Arabidopsis* consiste en emasculación de la flor madre eliminando los estambres cuando aún son inmaduros. La flor padre se cogió en anthesis, cuando el polen estaba maduro, y se eliminaron pétalos y gineceo para hacer más fácil la manipulación. El polen se aplicó sobre el estigma de la flor madre hasta que quedaba totalmente impregnado.

1.6.2. Generación de plantas transgénicas

Para transformar plantas silvestres y los correspondientes mutantes de *Arabidopsis* se siguió el protocolo de infiltración por vacío descrito en Bechtold et al., (1993) con algunas modificaciones introducidas en Clough y Bent, (1998).

Las semillas de mutantes y plantas silvestres de *Arabidopsis* 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 la resistencia del vector. 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 1L que contenía 600 ml de medio LB con antibióticos. 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 y se les aplicó un pulso de vacío de 1 min. A continuación, se secaron ligeramente las plantas con papel absorbente, se cubrieron con bolsas de plástico y se continuaron cultivando en condiciones de día largo. Durante los días siguientes se agujerearon las bolsas de plástico, permitiendo que las plantas se aclimataran gradualmente, hasta eliminar la bolsa. Las plantas se cultivaron en el invernadero hasta que se obtuvieron las semillas maduras.

1.7. Estudios de expresión mediante hibridación “*in situ*”

Se siguió el protocolo descrito por Ferrándiz et al., (2000). Este protocolo se utilizó para analizar la expresión de los genes *STY/SHI/SRS* en *Nicotiana benthamiana* y *Eschscholzia californica* en inflorescencias de plantas silvestres.

La hibridación *in situ* de RNA con sondas marcadas con digoxigenina se realizó en secciones de parafina de 8µm de los botones florales de *E. californica* y *N. benthamiana* en diferentes estadios de crecimiento, como se describe por Ferrándiz et al., (2000). Las sondas antisentido y sentido de RNA se generaron a partir de un fragmento de 294pb del cDNA de EcSRS-L (posiciones 1-294), de un fragmento de 438pb del cDNA de NbSRS-L1 (posiciones 607-1045), de un fragmento de 407pb del cDNA de NbSRS-L2 (posiciones 1-407) y de un fragmento de 536pb del cDNA de NbSRS-L3 (posiciones 1-536). Cada fragmento se clonó en el vector pGemT-Easy (Promega), y se sintetizaron sondas de sentido y antisentido utilizando las correspondientes polimerasas SP6 o T7.

Los resultados se observaron al microscopio óptico y en aquellos casos en los que había mucho fondo o mucha señal se deshidrató el tejido en series de EtOH crecientes de forma rápida (2 minutos cada una), para eliminar precipitados inespecíficos. Posteriormente se colocó el cubre objetos y se procedió a su observación.

1.8. Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)

Este ensayo se llevó a cabo para silenciar los genes *STY/SHI/SRS* en *Nicotiana benthamiana* y *Eschscholzia californica* y estudiar los fenotipos de pérdida de expresión de estos genes.

El ensayo de VIGS se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Dinesh-Kumar et al., (2003). Las mismas regiones de las secuencias codificantes de EcSRS-L, NbSRS-L1 y NbSRS-L3 utilizadas para hibridación “*in situ*” se usaron para los experimentos VIGS, mientras que para NbSRS-L2 se usó un fragmento de 537pb

(posiciones 1-537). Se añadió un sitio de restricción Xba1 al extremo 50 del fragmento de PCR y se añadió un sitio de restricción BamH1 al extremo 30. El amplicón se digirió por Xba 1 y Bam H1 y se clonó en un vector pTRV2 digerido de forma similar. Los plásmidos resultantes se confirmaron por digestión y secuenciación, antes de ser introducidos en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. La agroinoculación de plántulas de *E. californica* se realizó como se describe en Pabón-Mora et al., (2012). La agroinoculación de hojas de *N. benthamiana* se realizó como se ha descrito por Dinesh-Kumar et al., (2003).

1.9. Ensayo BiFC, para la expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Con el ensayo BiFC nuestro objetivo es comprobar si dos proteínas de interés interaccionan. Para ello, se utilizaron dos plásmidos de Gateway que poseen cada uno de ellos una mitad de la proteína YFP (Yellow Fluorescent Protein), de ahí sus nombres YFC, contiene la mitad C-terminal de la proteína; e YFN, contiene la mitad N-terminal de la proteína; y un nexo de unión flexible entre el gen de la YFP y el gen de interés que permitiría la flexibilidad de la proteína de fusión. Para más información: <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.

Se clonó la región codificante de los genes de interés a continuación de la mitad correspondiente de la YFP. Una vez obtenidas estas construcciones e introducidas en la cepa de *A. tumefaciens* C58, se inocularon cultivos con los antibióticos apropiados y se creció o/n a 28°C. Al día siguiente, se transfirió el cultivo a 50ml de medio LB con los correspondientes antibióticos en un matraz de 250 ml y se creció o/n a 28°C. Al día siguiente, se centrifugaron las células durante 30 min a 3000 rpm. El sedimento se resuspendió en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 y acetosiringona 200µM) y se ajustó la absorbancia a 1.0 (medida a una longitud de onda de 600nm). A continuación, los cultivos se incubaron con agitación suave (50rpm) 3 horas en oscuridad. Después, se realizaron las mezclas correspondientes de los cultivos (en el caso de co-transformación) y se infiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* por el

envés de la misma. Se eligieron hojas jóvenes, normalmente la 3ª o la 4ª hoja. Las hojas se observaron al microscopio confocal transcurridos 2-3 días.

1.10. Estudio de las dianas directas de factores de transcripción a partir de protoplastos

Las plantas de *E. californica* utilizadas para este estudio fueron crecidas en condiciones de día largo en cabinas con temperatura y humedad controlada, utilizadas exclusivamente para el cultivo de esta especie.

1.10.1. Obtención de protoplastos a partir de flores de *E. californica*

Para la obtención de protoplastos de flores de *E. californica* se siguió el protocolo descrito por Reddy, (2014), con algunas modificaciones. Para cada ensayo se recolectaron 20 botones florales correspondientes a los estadíos 8-9 (Becker et al., 2005) que posteriormente se desmenuzaron apoyados en una placa Petri que contenía una solución de enzimas celulasa, macerozima y hemicelulasa a temperatura ambiente, los cortes se realizaron con ayuda de una cuchilla de afeitar de filo muy fino durante aproximadamente cinco minutos. Pasado este tiempo se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad la mezcla de fragmentos de flor junto con la solución de enzimas en tubos de rosca de fondo plano de 50 ml de volumen. La digestión se dejó durante un periodo comprendido entre 1 y 3 horas, evitando los movimientos bruscos en este paso y en los sucesivos, con el fin de preservar la integridad de los protoplastos resultantes.

Una vez finalizada la digestión se paró la reacción con una solución tampón que contenía KCl, MgCl₂, MES y Manitol y se centrifugó suavemente, eliminando el sobrenadante y limpiando el pelet con la misma solución tampón. La suspensión de protoplastos se hizo pasar por filtros de 70 µm en primer lugar y de 50 µm posteriormente, repitiendo el paso de centrifugado y lavado entre cada filtrado.

Los mejores resultados se alcanzaron al cortar los gineceos en fragmentos más grandes y al reducir el tiempo de digestión a una hora.

1.10.2. Obtención de protoplastos a partir de hojas de *E. californica*

Para obtener protoplastos de hojas de *E. californica* se utilizó la técnica descrita por Yoo et al., (2007), con algunas modificaciones. En primer lugar, se retiró la cutícula del envés de las hojas para favorecer la entrada de la solución de enzimas en el mesófilo.

Para efectuar la digestión se colocaron las hojas en una placa Petri que contenía una solución con las enzimas celulasa y macerozima, poniendo en contacto el envés de la hoja con la solución de enzimas. Se dejó actuar a las enzimas durante 3 horas, a temperatura ambiente, en oscuridad y sin agitación. Transcurrido este tiempo se diluyó la solución enzimas/protoplastos y se hizo pasar por un filtro de 70 μm . Posteriormente se precipitaron los protoplastos por medio de una centrifugación suave (100g) y se eliminó el sobrenadante. Una vez retirado el sobrenadante, la solución de protoplastos resultante estaría lista para comprobar al microscopio la integridad de los protoplastos, así como la presencia o ausencia de restos indeseables procedentes de la digestión de la hoja. Con ayuda de un hemocitómetro se puede calcular la concentración de protoplastos y ajustarla hasta tener una concentración de $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, que es la concentración que utilizaremos para la transfección.

1.10.3. Transfección de protoplastos de *E. californica*

Los protoplastos de hojas de *E. californica* fueron transfectados siguiendo el protocolo descrito por Yoo et al., (2007).

Se utiliza una solución de Polietilenglicol (PEG)-calcio para inducir la desorganización de las membranas celulares y permitir así la entrada del DNA que contiene la construcción deseada. Se necesita utilizar entre 10 y 20 μg de DNA plasmídico de alta pureza en cada reacción, siendo esa cantidad la necesaria para plásmidos de un tamaño comprendido entre 5 y 10 kilobases (kb). Las condiciones óptimas para la transfección se dieron tras una incubación de 5 minutos con una solución de PEG-calcio al 20% (masa/volumen).

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

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

En primer lugar, se realizaron pruebas para cada pareja de cebadores modificando la concentración de éstos (300, 600 ó 900 nM) con el fin de encontrar la combinación más óptima. Al final de cada PCR, se realizó una cinética de T^a m (curva de disociación) aplicando un gradiente de temperaturas creciente para analizar la especificidad del producto y la presencia de dímeros de los cebadores. Además, se añadieron en cada experimento los controles pertinentes de contaminación de DNA genómico y controles negativos de la reacción. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen final de 20 μ L empleando 10 μ L de SYBR® Premix Ex Taq (2 \times) (Tli RNaseH Plus), Bulk (CAT #RR420L, Takara), 0,4 μ L del fluoróforo ROX (50X) que permite ajustar las posibles variaciones entre las muestras debidas a errores en el pipeteo, 0,25 μ L de cada uno de los dos cebadores a una concentración de 20 μ M para dejarlos a una concentración final de 0,25 μ M y 4 μ L de cDNA. La mezcla de reacción de SYBR® Premix Ex Taq (2 \times) (Tli RNaseH Plus) incluye el compuesto fluoróforo SYBR® Green I que emite fluorescencia cuando se intercala en las moléculas de DNA de doble cadena y permite por tanto cuantificar la cantidad de producto a lo largo de los ciclos de amplificación, la enzima TaKaRa Ex Taq HS, el tampón de la reacción Tli RNaseH Plus que degrada el RNAm residual que pueda encontrarse en el cDNA, minimizando de este modo la inhibición de las qRT-PCR como resultado de la presencia de ese RNAm residual, los dNTPs y el Mg^{2+} .

Para cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas empleando placas MicroAmp® Fast Optical 96-well reaction plate with barcode (Applied Biosystems) y se llevaron a cabo en el aparato 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), se trata de un termociclador con cámara CDD que registra fluorescencia, acoplado al

programa informático 7500 System Software (Applied Biosystems). Se utilizó el programa de amplificación recomendado por la casa comercial para los oligos diseñados con Primer Express (2 min. 50 °C, 10 min. 95 °C, 40 ciclos de 15 s 95 °C, 1min., 60 °C). Los valores de expresión génica se calcularon mediante la cuantificación de la fluorescencia en un punto de la fase exponencial de la reacción de amplificación (umbral) asociado a un número de ciclos concreto para cada gen (Ct). A partir del parámetro Ct se calcularon para cada experimento los valores de expresión relativa de los genes de interés en las distintas muestras respecto a la muestra control, normalizados con el nivel de expresión obtenido para el gen constitutivo en las mismas muestras, según la fórmula:

$$2^{- \left(\frac{Ct_{\text{gen A}} - Ct_{\text{gen constitutivo}}}{\text{(muestra problema)}} - \frac{Ct_{\text{gen A}} - Ct_{\text{gen constitutivo}}}{\text{(muestra control)}} \right)}$$

1.12. Tratamiento de inducción por Dexametasona

Para estudiar las dianas directas del complejo STY-CRC-NGA en Arabidopsis se indujeron mediante dexametasona + cicloheximida las líneas 35S::STY1:GR 35S::GR:NGA1 y 35S::STY:GR 35S::GR:NGA *crc*. Para ello se utilizó una solución acuosa que contenía dexametasona 10 µM, cicloheximida 10µM y Silwet al 0,01%.

El tratamiento se hizo por inmersión de las inflorescencias del tallo principal y de los tallos secundarios en esta solución, recogiendo las muestras de inflorescencia pasadas 6 horas del tratamiento. Como control negativo se realizó, de igual modo, un tratamiento con una solución de mock + cicloheximida, a una concentración de cicloheximida de 10 µM y Silwet al 0,01%.

1.13. Análisis de los perfiles de expresión del complejo STY-CRC-NGA

1.13.1. Búsqueda de las dianas del complejo mediante Microarrays

Para conocer las dianas del complejo proteico STY-CRC-NGA se realizó un ensayo de microarrays sobre muestras de RNA procedente de inflorescencias de las líneas 35S::STY1:GR 35S::GR:NGA1 y 35S::STY:GR 35S::GR:NGA *crc*, tras su inducción con dexametasona. Las muestras fueron hibridadas en microarrays de Agilent de dos canales en el servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid), utilizando para cada microarray una pareja Dexa/mock, de modo que se analizaron cuatro parejas de muestras procedentes de las líneas 35S::STY1:GR 35S::GR:NGA1 en fondo silvestre y cuatro en fondo *crc*.

1.13.2. Presentación de resultados y selección de dianas putativas del complejo

El análisis bioinformático se realizó mediante la aplicación de los algoritmos estadísticos más apropiados (LIMMA) y los resultados se suministraron mediante una carpeta del visualizador FIESTA desarrollado en el Centro Nacional de Biotecnología (<http://bioinfogp.cnb.csic.es>).

Estos datos fueron convertidos a formato Excel y se seleccionaron sólo aquellos genes que tenían una tasa de cambio o *fold change* entre los dos canales, mayor de 1,5 y menor de -1,5. También se tuvo en cuenta que el filtro estadístico *false discovery rate* (FDR) fuese $\leq 0,05$.

Con estos genes se realizó un análisis de enriquecimiento de categorías funcionales, conocido como Gene Ontology (GO), para conocer las funciones biológicas y moleculares que están enriquecidas para cada grupo de genes regulados en las mismas condiciones, así como dónde se localizan. Este análisis se llevó a cabo utilizando la herramienta agriGO v 2.0 (Du et al., 2010; Tian et al., 2017).

RESULTADOS



CAPITULO 1

1. Identificación de las dianas moleculares del complejo STY-CRC-NGA en Arabidopsis

1.1. Antecedentes

En este capítulo pretendemos desarrollar la idea de que la morfogénesis del gineceo está dirigida por un sistema complejo de regulación transcripcional que podría estar basado en un modelo combinatorial de complejos transcripcionales. Nuestra hipótesis es que los factores de transcripción que dirigen la morfogénesis del gineceo definen la identidad de los distintos módulos en función de las distintas interacciones que establecen entre sí al formar complejos multiméricos, y que es la composición particular de cada complejo en un dominio espacial concreto la que aporta especificidad funcional, de manera análoga al modelo ABC de desarrollo floral descrito por Coen y Meyerowitz, (1991).

Estudios preliminares realizados por nuestro grupo en Arabidopsis muestran que los fenotipos de pérdida de función de los genes *SHI/STY/SRS* (Fig. C1.1, F) (Kuusket al., 2006) son muy similares a los reportados para las mutaciones en los miembros de la familia *NGA* (Fig. C1.1, E), lo cual sugiere que los genes *NGA* y *SHI/STY/SRS* podrían estar actuando en la misma ruta genética (Navarrete-Gómez, 2011; Trigueros et al.2009). También se ha descrito que los genes *NGA* y *SHI/STY/SRS* se expresan en dominios altamente solapantes, pero que, sin embargo, los genes *SHI/STY/SRS* no parecen ser necesarios para regular a los genes *NGA* y viceversa. Además, cuando se expresan *STY1* y *NGA3* bajo el control de un promotor constitutivo, los fenotipos resultantes son fuertemente sinérgicos y muy diferentes a los fenotipos de expresión de cada uno de estos genes por separado (Fig. C1.1, A, B) (Trigueros et al., 2009). Estos datos podrían indicar que los factores *SHI/STY/SRS* y *NGA* podrían actuar cooperativamente y formar un complejo transcripcional que regulase dianas comunes con un papel relevante en la especificación del estilo; sin embargo, no se ha podido detectar la interacción física directa entre estos dos factores de transcripción (Navarrete-Gómez 2011; Trigueros et al., 2009). Nuestra hipótesis es que la interacción

Resultados

entre STY y NGA podría estar mediada por un tercer factor. Un posible candidato podría ser CRABS CLAW (CRC), factor de tipo YABBY, ya que éste es necesario para el correcto desarrollo del estilo y en menor medida del estigma (Bowman and Smyth 1999). Se ha descrito que *CRC* se expresa en la epidermis de las valvas y en las regiones apicales del gineceo, siendo éste es el dominio más afectado en los frutos donde se sobreexpresan simultáneamente *STY1* y *NGA3* (Fig. C1.1, H). Además, cuando se sobreexpresan conjuntamente *STY1* y *NGA3* en fondo mutante *crc*, se revierte la formación de tejido estilar ectópico en las valvas, se reduce notablemente el tejido estigmático, y rara vez se produce la formación de células de estilo, que, de hacerlo, aparecen como grupos aislados asociados generalmente a las papilas estigmáticas (Navarrete-Gómez 2011), lo cual indica que *CRC* es necesario para la función de *STY1* y *NGA3* en la especificación de estos tejidos.

Por otro lado, se ha reportado mediante ensayos de Bi/TriFC que *CRC* interacciona simultáneamente con *STY1* y *NGA3*, y todo esto sugiere que se estaría formando un complejo transcripcional entre los factores *NGA*, *STY* y *CRC*, que estaría dirigiendo la formación del estilo (Navarrete-Gómez 2011).

A partir de estos resultados previos, es posible suponer que, si este complejo *STY1-CRC-NGA* se está formando *in vivo*, sus dianas moleculares y por tanto el conjunto de genes que regulan debería ser distinto a las dianas de *STY* y de *NGA* cuando participan en otros procesos en los que no actúa *CRC*. De esta manera, para explicar cómo se traduce esto a nivel molecular, nos proponemos determinar el efecto sobre el transcriptoma de la inducción de *STY+NGA* en presencia o ausencia de *CRC*.

Para ello, diseñamos una estrategia para realizar análisis transcriptómicos mediante hibridación de microarrays con muestras de RNA procedentes de líneas en las que pudiéramos inducir la actividad de *STY1* y *NGA1*, tanto en presencia como en ausencia de *CRC*.

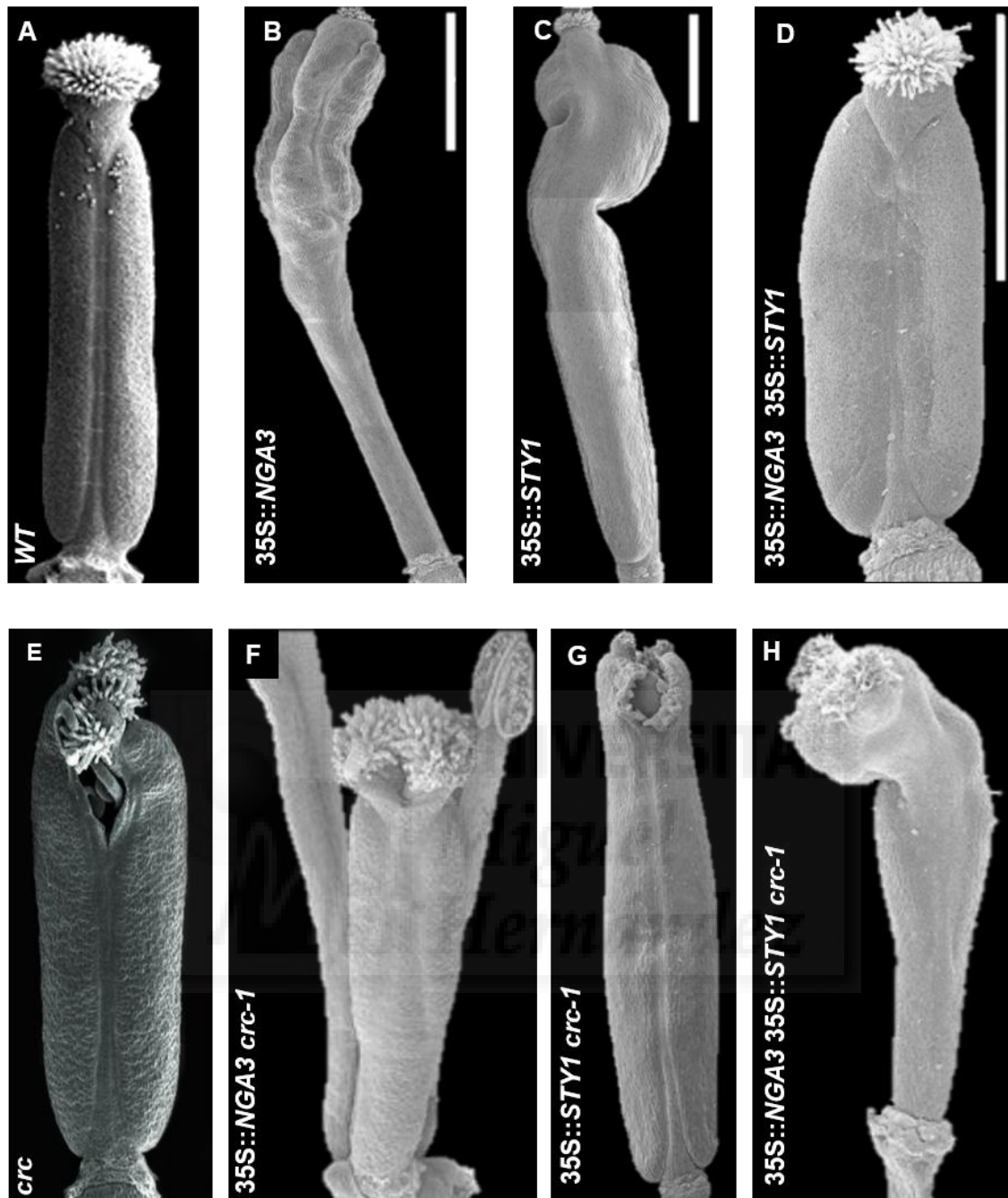


Figura C1.1. Fenotipos de frutos y flores en antesis de las líneas de sobreexpresión de *STY1* y *NGA3* tanto en fondo silvestre, como en fondo mutante *crc*. Fotos tomadas al microscopio electrónico de barrido. (A) Gineceo silvestre de *Arabidopsis thaliana*, (B) fruto de una línea que sobreexpresa *NGA3* (Trigueros, 2008), (C) fruto de una línea que sobreexpresa *STY1* (Kuusk et al., 2002), (D) gineceo de una línea que sobreexpresa conjuntamente *STY1* y *NGA3* en fondo silvestre (Navarrete-Gómez 2011), (E) gineceo del mutante de pérdida de función *crc* (Bowman y Smyth, 1999), (F) gineceo de una línea que sobreexpresa *NGA3* en fondo mutante *crc* (Navarrete-Gómez 2011), (G) fruto de una línea que sobreexpresa *STY1* en fondo mutante *crc* (Navarrete-Gómez 2011), (H) fruto de una línea que sobreexpresa conjuntamente *STY1* y *NGA3* en fondo mutante *crc* (Navarrete-Gómez 2011). (E=1mm) (Fotos tomadas de Navarrete-Gómez,2011).

1.2. Generación del material

Previamente se habían generado en el laboratorio líneas transgénicas 35S::GR:NGA1 (Ballester, 2016) y se habían obtenido las líneas 35S::STY:GR ya publicadas (Kuusk et al., 2006). A partir de aquí, la primera tarea fue generar todos los fondos necesarios para realizar el ensayo de transcriptómica. Los dos fondos que pretendíamos comparar eran: STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre y STY1:GR GR:NGA1 en fondo mutante *crc*.

Para la obtención de las líneas STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre, lo primero que se hizo fue cruzar las líneas transgénicas 35S::GR:NGA1 con las 35S::STY:GR (Fig. C1.2), seleccionando en esta F1 líneas portadoras de ambos transgenes. Como los parentales 35S::GR:NGA1 no estaban en homocigosis, la selección de estas líneas se hizo sembrando las semillas F1 en presencia del herbicida Basta, al cual las líneas 35S::GR:NGA1 son resistentes, y del antibiótico kanamicina, al cual confieren resistencia las líneas 35S::STY:GR.

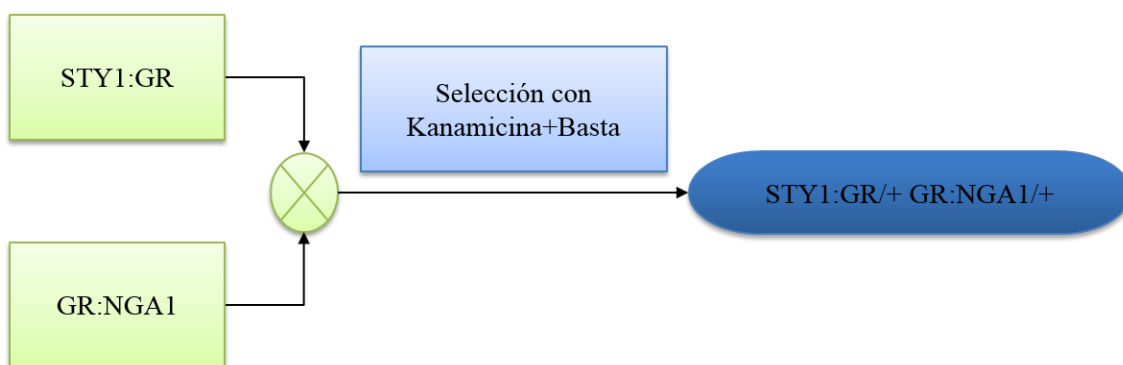


Figura C1.2. Esquema de generación de las líneas STY1:GR/+ GR:NGA1/+ en fondo silvestre. Estas líneas transgénicas se generaron mediante cruces de las líneas GR:NGA1 y STY1:GR.

Por otro lado, las líneas STY1:GR GR:NGA1 en fondo mutante *crc*, se obtuvieron mediante cruzamientos según el esquema que se describe a continuación (Fig. C1.3).

En primer lugar se cruzaron plantas STY1:GR y plantas GR:NGA1 con mutantes *crc* para obtener plantas heterocigotas para la mutación *crc* y portadoras del transgén en hemicingosis. Para el caso de la selección de las líneas GR:NGA1/+ *crc*/+, se sembraron las semillas F1 en placas Petri en presencia del herbicida Basta, y se escogieron aquellas plantas que eran resistentes al mismo como parentales para el siguiente cruce.

No fue necesario seleccionar las líneas que tenían integrado el transgen STY1:GR en las semillas procedentes del cruce STY1:GR x *crc* porque se esperaba que todas fuesen heterocigotas tanto para STY1:GR como para *crc*, ya que los parentales estaban en homocigosis para ambos casos. A continuación, se cruzaron las líneas seleccionadas para GR:NGA1/+ *crc*/+ con las líneas STY1:GR/+ *crc*/+.

Las semillas de las plantas resultantes de estos cruces se sembraron en placa en presencia de Basta para la selección de las plantas GR:NGA1, y las plantas resistentes se genotiparon para STY1:GR. Cuando las plantas resultantes que contenían los transgenes GR:NGA1 y STY1:GR comenzaron a florecer, se observaron algunas de sus flores en preantesis a la lupa para seleccionar aquellas plantas que además también tuviesen fenotipo *crc*, y éstas fueron las plantas utilizadas para el análisis de transcriptómica.

Resultados

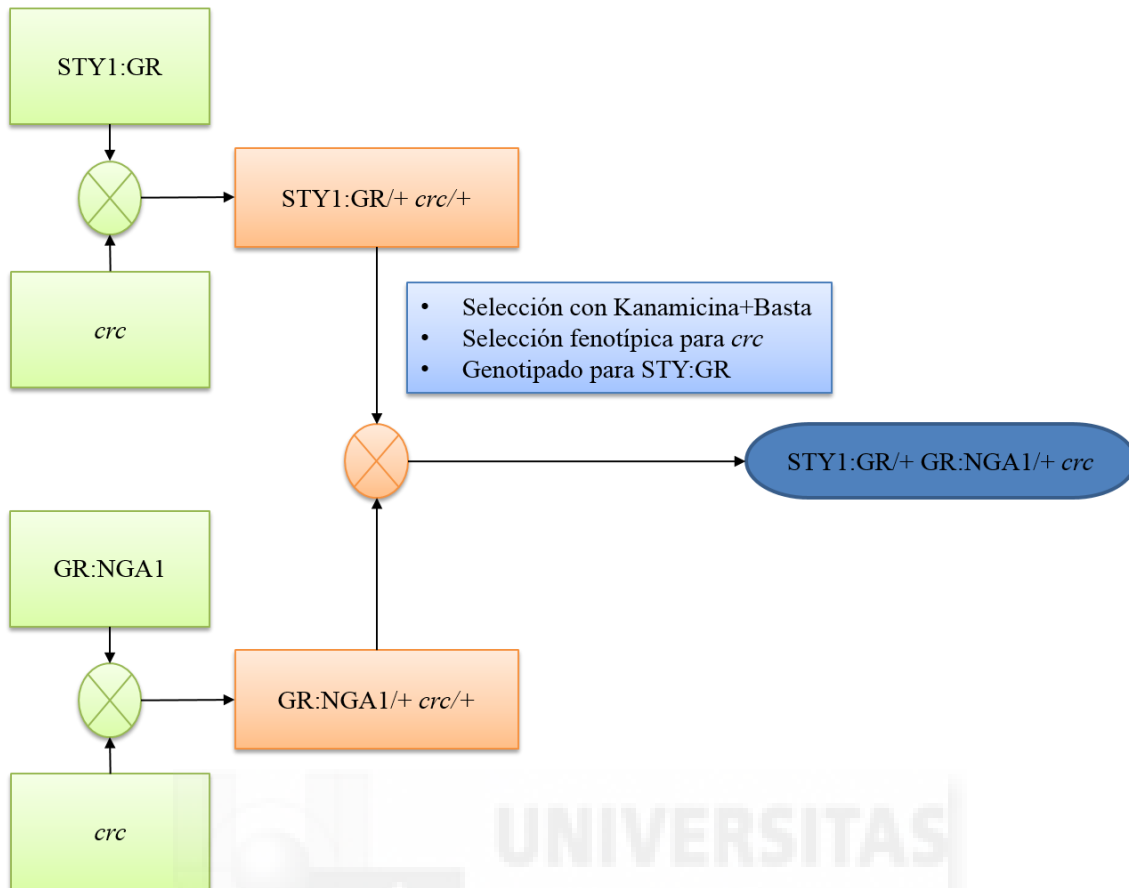


Figura C1.3 Esquema de generación de las líneas STY1:GR/+ GR:NGA1/+ en fondo mutante *crc*. Para la obtención de estas líneas transgénicas se realizaron primero cruces de las líneas GR:NGA1 y STY1:GR con plantas mutantes *crc* y posteriormente se cruzaron los productos de esos cruces iniciales, es decir, las líneas GR:NGA1/+ *crc*/+ y STY1:GR/+ *crc*/+.

Paralelamente, y con el fin de comprobar que las líneas generadas: STY1:GR GR:NGA1 tanto en fondo silvestre como en fondo mutante *crc*, eran válidas para utilizarlas en el ensayo de transcriptómica, se realizó un estudio fenotípico de estas líneas tras el tratamiento con dexametasona para inducir la actividad constitutiva de los factores STY1 y NGA1 en estas plantas. De esta manera, esperaríamos obtener fenotipos muy similares a los reportados en las líneas transgénicas de sobreexpresión 35S::*STY1* y 35S::*NGA3* (Fig. C1.1)

Las plantas STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre y STY1:GR GR:NGA1 en fondo *crc* que habían sido generadas y seleccionadas, después de tomar las muestras necesarias para el ensayo de transcriptómica, se trataron durante tres semanas con dexametasona. Además, también previamente se sembraron las líneas STY1:GR/*wt*,

STY1:GR/+ *crc*/+, GR:NGA1/*wt* y GR:NGA/+ *crc*/+ y se trataron de igual manera con dexametasona durante tres semanas.

Las flores y frutos resultantes se observaron a la lupa (Fig. C1.4) y al Microscopio Electrónico de Barrido (Fig. C1.5). Se observa cómo tras el tratamiento con dexametasona, las líneas STY1:GR/*wt* (Fig. C1.4, C) muestran un fenotipo muy similar al reportado para las plantas 35S::*STY1* (Fig. C1.1, A) y de forma análoga, ocurre lo mismo con las líneas GR:NGA1 (Fig. C1.4, E), cuyo fenotipo recuerda al reportado para 35S::*NGA3*: parte apical del gineceo engrosada, ovarios de pequeño tamaño y valvas reducidas, replum ensanchado y ginóforos alargados (Fig. C1.1, B). En las fotos tomadas al microscopio electrónico de barrido, se ve como en los gineceos STY1:GR no se diferencia el margen de valvas (Fig. C1.5, A y B), mientras que en los gineceos GR:NGA1 se aprecian las células del réplum en zig-zag (Fig. C1.3, C y D). Las líneas STY1:GR GR:NGA1 /*wt* (Fig. C1.4, G) muestran flores en las que el gineceo se desarrolla con una morfología tubular compacta, donde destaca la ausencia de un estilo y un réplum diferenciados, fenotipo más severo al observado para 35S::*STY1* 35S::*NGA3* en fondo silvestre (Fig. C1.1, H), donde se obtenían gineceos donde se distinguían valvas, replum y estilo, pero de tamaño muy reducido. Además, al observar los gineceos STY:GR GR:NGA1/*wt* al microscopio electrónico de barrido se podía comprobar que todas las células del pistilo parecían células de estilo (Fig. C1.5, I y J), un fenotipo similar, aunque más severo, al de las líneas 35S::*STY1* 35S::*NGA3*, en las que sólo las células de la epidermis de la valva adoptan la morfología típica de las del estilo. Por otro lado, el efecto de la inducción de STY1 o NGA1 en fondo *crc* produjo efectos fenotípicos mucho menos pronunciados. En los pistilos STY1:GR/+ *crc* (Fig. C1.4, D) apenas se apreciaban diferencias respecto a los del mutante *crc* (Fig. C1.1, G; Fig. C1.5, E y F), lo cual recordaba al fenotipo de 35S::*STY1/crc*, donde tampoco parecía revertirse el fenotipo mutante (Fig. C1.1, C). Algo similar se observaba tanto en GR:NGA1/+ *crc* (Fig. C1.4, F; Fig. C1.5, G y H) como en STY1:GR/+ GR:NGA1/+ *crc* (Fig. C1.4 H; Fig. C1.5, K y L) tratados con dexametasona, donde apenas se revertía el fenotipo mutante *crc*. Estos fenotipos, sin embargo, eran diferentes a los de las líneas 35S::*NGA3 crc* o 35S::*STY1 35S::NGA3 crc* previamente descritos (Fig 1 F, H), puesto que en estas líneas, la sobreexpresión conjunta de *STY1* y *NGA3* o la de sólo *NGA3* sí modificaban el fenotipo *crc*, aunque de un modo diferente a lo que lo hacían en fondo

Resultados

silvestre, quizá por el carácter transitorio de la expresión de *NGAI* o a posibles diferencias funcionales entre *NGAI* y *NGA3*.



Figura C1.4. Fenotipo de las flores de las líneas inducibles tras el tratamiento con dexametasona. Fotos a la lupa de flores en antesis. (A) Col-o, **(B)** mutante *crc*, **(C)** *STY1:GR/wt* donde se observa la parte apical engrosada y el estilo corto y compacto, **(D)** *STY1:GR/+ crc* no parece presentar diferencias significativas respecto al mutante *crc*, **(E)** *GR:NGA1/wt* presenta un engrosamiento del estilo, valvas reducidas y ginóforo elongado, **(F)** en *GR:NGA1/+ crc* se observa cómo se revierte parcialmente el fenotipo *crc*, con un leve engrosamiento de la parte apical, **(G)** *STY1:GR GR:NGA1/wt* presenta flores con la parte apical engrosada, no se diferencia ni el estilo ni el réplum y todo el pistilo aparece compacto y homogéneo, **(H)** en *STY1:GR/+ GR:NGA1/+ crc* se revierte parcialmente el fenotipo *crc*, con un ligero aumento del tejido estigmático, pero no se aprecian los efectos de la inducción de *STY1* y *NGA1* en la morfología del gineceo que se observaban en el fondo silvestre. (E=1cm).

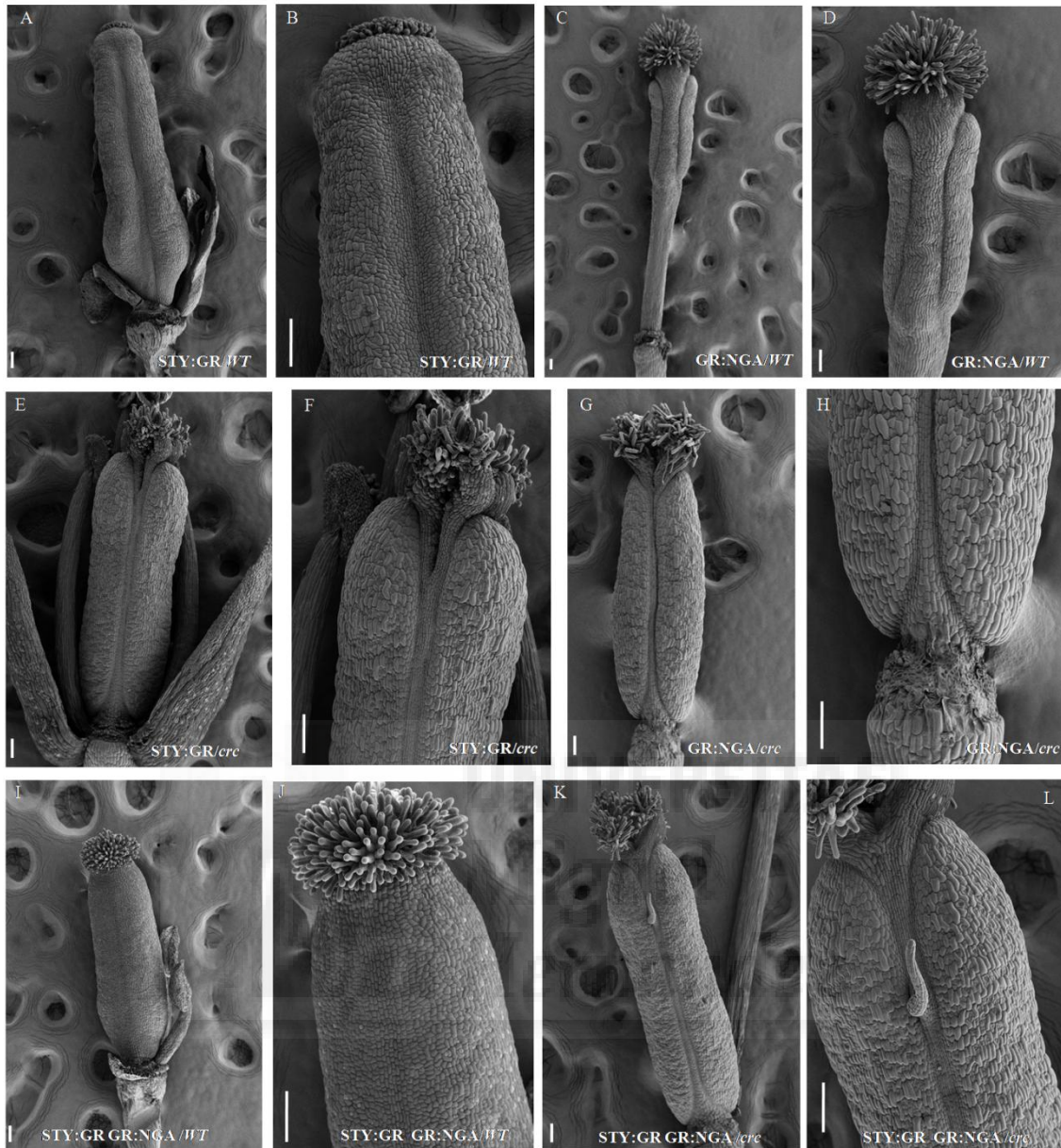


Figura C1.5. Flores en antesis tratadas con dexametasona. Fotografías tomadas al microscopio electrónico de barrido. **(A)** STY1::GR en fondo silvestre(Kuusk et al., 2006), **(B)** detalle del estilo de STY1:GR, **(C)** GR:NGA1 en fondo silvestre, **(D)** detalle de las valvas, réplum, estilo y estigma de GR:NGA1, **(E)** STY1:GR en fondo *crc*, **(F)** detalle de la parte apical de STY1:GR en fondo *crc*, **(G)** GR:NGA1 en fondo *crc*, **(H)** detalle del ginóforo de GR:NGA1 en fondo *crc*, **(I)** STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre, **(J)** detalle de la parte apical de STY1:GR GR:NGA1, **(K)** STY1:GR GR:NGA1 en fondo *crc*, donde la inducción de STY1 y NGA1 no modifica de modo evidente la morfología del pistilo típica de los mutantes *crc* **(L)** detalle del estilo, réplum y valvas de STY1::GR GR:NGA1 en fondo *crc* (E= 100µm).

1.3. Realización del ensayo de inducción de las líneas GR previo al análisis de los perfiles moleculares.

Gracias al estudio fenotípico de las líneas STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre y STY1:GR GR:NGA1 en fondo *crc* descrito en el apartado anterior, se pudo establecer que estas líneas eran aptas para realizar el análisis de los perfiles transcriptómicos planeados. A pesar de la discrepancia en los fenotipos de las líneas STY1:GR GR:NGA1 *crc* inducidas y de las 35S::*STY1* 35S::*NGA3* *crc* previamente obtenidas, se asumió que estas líneas eran válidas para llevar a cabo el ensayo por las diferencias evidentes del efecto de la inducción en fondo silvestre o en fondo *crc*.

En este ensayo se querían comparar las dianas moleculares de NGA1 y STY1 tanto en presencia como en ausencia de CRC, asumiendo que en primer caso se podría estar formando un complejo STY1-CRC-NGA1 en el dominio de expresión de CRC, pero no en el fondo mutante *crc*. Este experimento se realizó mediante el tratamiento con dexametasona + cicloheximida, utilizando solución control (mock) + cicloheximida como control negativo del experimento. Ya que la cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas, este ensayo nos permitiría conocer sólo las dianas directas del complejo.

El tratamiento se hizo por inmersión de las inflorescencias, tanto las pertenecientes al tallo principal como las de los tallos secundarios, en una solución que contenía dexametasona + cicloheximida. Paralelamente se hizo de igual manera un tratamiento por inmersión en una solución de mock + cicloheximida, como control negativo del experimento. Ambos tratamientos se efectuaron tanto en las líneas STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre como en las STY1:GR GR:NGA1 en fondo *crc*.

Pasadas 6 horas desde el tratamiento, se recogieron muestras de inflorescencias, tomando para cada genotipo y tratamiento aproximadamente 6 inflorescencias por muestra. La toma de muestras se realizó de forma aleatoria entre todas las plantas de un mismo fondo, de tal manera que cada muestra contuviese inflorescencias de diferentes plantas, con el fin de minimizar los posibles errores derivados de factores biológicos ajenos al experimento. Se tomaron seis réplicas biológicas para cada fondo y cada tratamiento.

Posteriormente se extrajo el RNA de las 24 muestras totales y se comprobó su integridad y concentración. Las cuatro mejores muestras de cada fondo y tratamiento se enviaron para la hibridación de los microarrays. Se analizaron un total de 16 muestras.

En la figura C1.6 se muestra de forma esquemática todo este proceso.

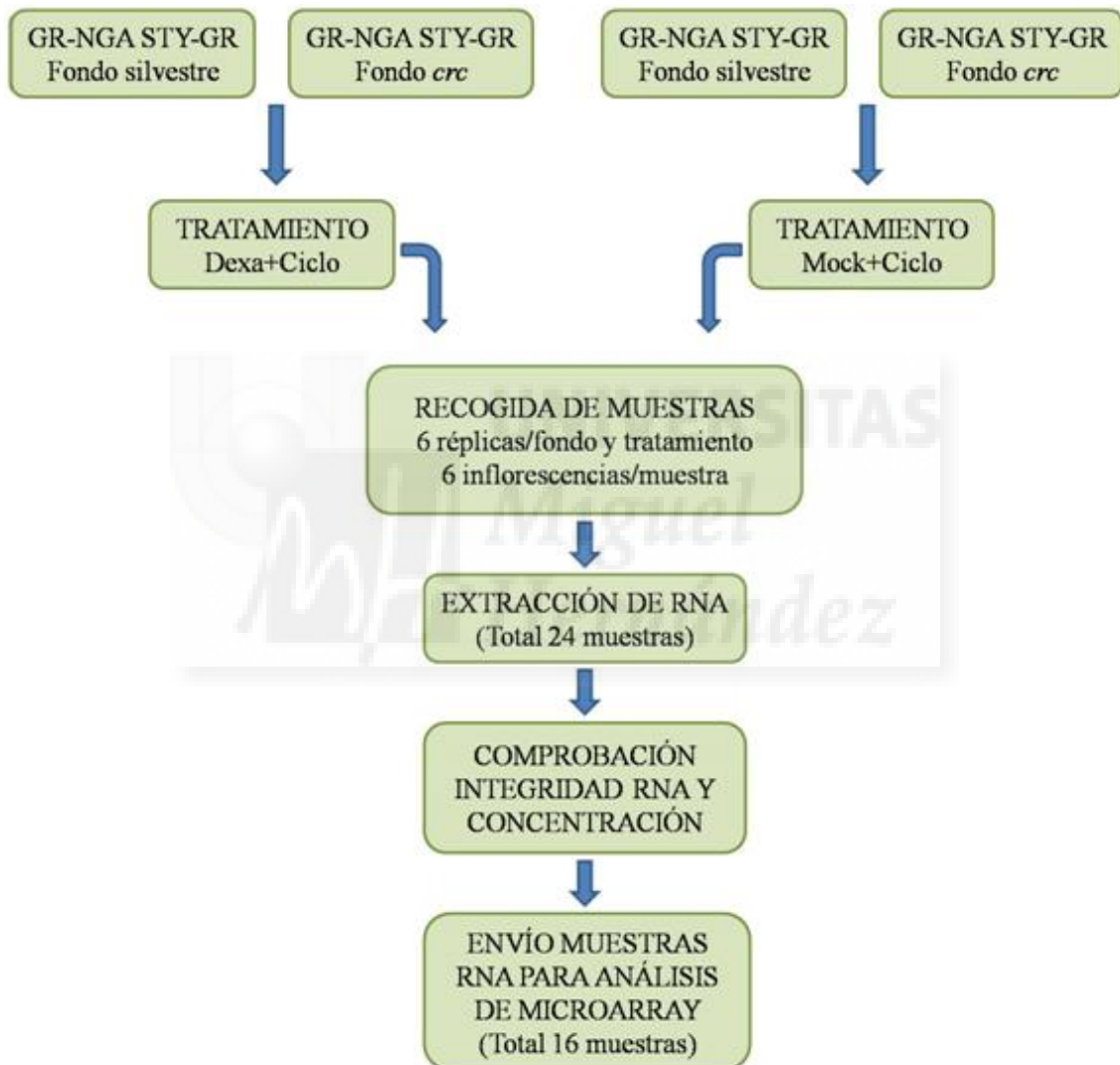


Figura C1.6. Diagrama de flujo del ensayo de inducción de las líneas STY1::GR GR-NGA1 en fondo silvestre y fondo *crc* con Dexametasona (Dexa) + Cicloheximida (Ciclo) y Mock + Cicloheximida (Ciclo).

Resultados

Por otro lado, y antes de que se realizase este experimento de inducción de las líneas STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre y fondo *crc*, se habían hecho otros experimentos análogos a éste y con propósitos similares, pero usando un material genético diferente.

Para estos experimentos se habían desarrollado líneas transgénicas basadas en un sistema también inducible por dexametasona, el sistema de LhG4:GR (vector pOpON) desarrollado por Ian Moore (Craft et al. 2005). Este sistema utiliza un factor transcripcional artificial, LhG4, fusionado tradicionalmente al dominio GR y bajo el control del promotor CaMV35S, mientras que el gen cuya expresión se quiere poder inducir se clona bajo el control de un promotor que contiene las secuencias de unión del factor LhG4 (promotor Op). Ambas unidades transcripcionales (35S::LhG4:GR y Op::GenDeInterés) se combinan para generar plantas transgénicas (abreviadas como 35S>>GenDeInterés^{INDUCIBLE}) que las expresan simultáneamente, de modo que el tratamiento con dexametasona provoca la traslocación al núcleo del factor LhG4:GR y la consiguiente inducción de la transcripción del gen de interés. En el laboratorio se habían generado previamente plantas 35SS>>STY1^{IND}, 35S>>NGA1^{IND} y 35SS>>STY1^{IND} 35S>>NGA1^{IND}, tanto en fondo silvestre como *crc*. Estas plantas se utilizaron para un análisis de perfiles transcriptómicos en respuesta a la inducción de STY1, NGA1 y STY1+NGA1 en ambos fondos, realizado de un modo similar al descrito previamente. Sin embargo, lamentablemente, comprobamos tras el análisis de los resultados de la hibridación de los microarrays que la inducción de NGA no se había producido, de modo que solo pudimos obtener de estos experimentos los resultados correspondientes a la respuesta a la inducción de STY1 en fondo silvestre y en fondo *crc*. Por este motivo, los resultados que se obtuvieron mediante el sistema pOpON no se presentan en este trabajo, pero sí serán tenidos en cuenta como una posible validación en un experimento y sistema independiente de los resultados de los experimentos que describimos a continuación.

1.4. Obtención de los datos del análisis de los perfiles de transcripción

Las muestras de RNA donde se había inducido STY1:GR GR:NGA1, tanto en presencia como en ausencia de CRC, fueron hibridadas en microarrays de Agilent de

dos canales en el servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid), utilizando para cada microarray una pareja Dexa/mock, de modo que se analizaron cuatro parejas de muestras procedentes de las líneas STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre y cuatro en fondo *crc*.

Para seleccionar la lista de genes diferencialmente expresados se consideraron sólo aquellos que presentaban una tasa de cambio o *fold change* entre los dos canales mayor de 1,5 o menor de -1,5; para asegurarnos de que los cambios fuesen significativos, también se utilizó otro filtro estadístico seleccionando sólo los genes cuya probabilidad de ser un falso positivo o *false discovery rate* (FDR) fuese $\leq 0,05$. La lista de todos los genes que cumplían estas dos condiciones para cada fondo se presenta en el anexo 1.

Puesto que nuestra hipótesis se basaba en que la respuesta a la inducción de STY1 y NGA1 en presencia y en ausencia de CRC debía ser diferente, comparamos la respuesta del transcriptoma en ambos casos.

Como se puede ver en la figura C1.7, cuando se inducían STY1:GR y GR:NGA1 en fondo silvestre, se obtenían 112 genes activados para esta condición. Si contrastábamos cómo aparecían estos genes en fondo *crc*, veíamos que 62 estaban reprimidos y 50 de ellos no variaban su expresión. No había coincidencia de ningún gen que estuviera activado en ambos fondos.



Figura C1.7. Genes activados al inducir STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre.

Resultados

Por otro lado, se encontraron 434 genes que estaban reprimidos en fondo silvestre cuando se inducía la actividad de STY1 y NGA1 simultáneamente. Al comprobar la respuesta de estos 434 genes a la inducción de STY1 y NGA1 en fondo *crc*, se vió que 57 de ellos estaban activados, 38 reprimidos y 339 no variaban su expresión (Fig. C1.8).



Figura C1.8. Genes reprimidos al inducir STY1:GR GR:NGA1 en fondo silvestre.

Para el caso de las muestras en las que se indujo STY1:GR y GR:NGA1 en fondo *crc*, resultó que 62 genes aparecían activados. De ellos, 57 estaban reprimidos en fondo silvestre y sólo 5 genes no variaban su expresión. No se encontró ningún gen que estuviese activado tanto en fondo *crc* como en fondo silvestre (Fig. C1.9).



Figura C1.9. Genes activados al inducir STY1:GR GR:NGA1 en fondo *crc*.

Por último, como se muestra en la figura C1.10, se identificaron 94 genes que se mostraban reprimidos tras la inducción conjunta de *STY* y *NGA* en fondo *crc*. De estos 94 genes la mayoría aparecían activados en fondo silvestre, concretamente 62 genes. 14 genes estaban también reprimidos en fondo silvestre y los restantes 18 genes del total no variaban su expresión en fondo silvestre.



Figura C1.10. Genes reprimidos al inducir STY1:GR GR:NGA1 en fondo *crc*.

Resultados

De todas estas posibles dianas del complejo STY-CRC-NGA que se obtuvieron mediante este análisis, nos interesaban sólo aquellas que presentasen un comportamiento diferente cuando se inducían conjuntamente los genes *STY* y *NGA* en los distintos fondos, es decir, en presencia o ausencia de *CRC*.

Por tanto no consideramos aquellos genes que aparecían activados o reprimidos tanto en fondo silvestre como en fondo *crc*, o que no variasen su expresión en ninguno de estos fondos.

Atendiendo a estas condiciones de selección, se obtuvieron 531 genes diferentes que presentaban diferencias en su expresión dependiendo de en qué fondo se indujeran los genes *STY* y *NGA* (Anexo 1).

Con estos genes seleccionados, se realizó un análisis de enriquecimiento de categorías funcionales, conocido como Gene Ontology (GO), con el fin de conocer qué funciones biológicas y moleculares están enriquecidas para cada grupo de genes regulados en las mismas condiciones, así como dónde se localizan. Este análisis se elaboró separadamente para cada grupo de genes que se encontrase en cada una de las siguientes condiciones:

1. Dianas activadas en fondo STY1:GR GR:NGA1/*wt* y reprimidas en STY1:GR GR:NGA1/*crc*
2. Dianas reprimidas en fondo STY1:GR GR:NGA1/*wt* y activadas en STY1:GR GR:NGA1/*crc*
3. Dianas activadas en fondo STY1:GR GR:NGA1/*wt* y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/*crc*
4. Dianas reprimidas en fondo STY1:GR GR:NGA1/*wt* y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/*crc*
5. Dianas activadas en fondo STY1:GR GR:NGA1/*crc* y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/*wt*
6. Dianas reprimidas en fondo STY1:GR GR:NGA1/*crc* y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/*wt*

Dentro del grupo que cumplía la primera condición, los genes que aparecían activados en fondo silvestre, y reprimidos en fondo *crc* (62), estaba muy enriquecida la función de respuesta a estrés abiótico, sobre todo la respuesta a estímulos causados por calor, radiación y estímulos químicos (Fig. C1.11).

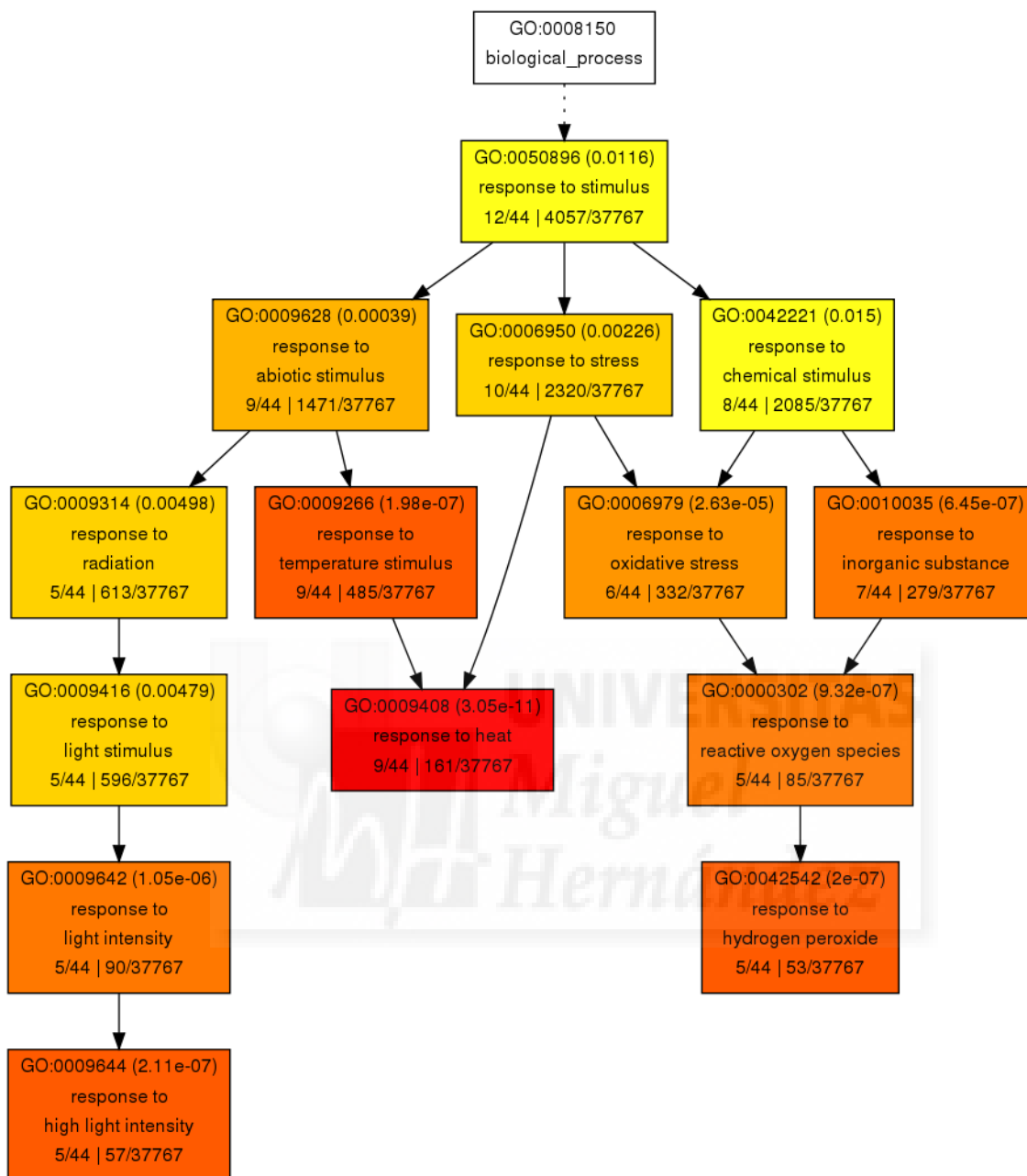


Figura C1.11. Análisis GO que muestra los procesos biológicos enriquecidos para los genes que están activados en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y reprimidos en STY1:GR GR:NGA1/crc.

Por otro lado, entre las dianas que estaban reprimidas en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y activadas en fondo STY1:GR GR:NGA1/crc (57), aparecía enriquecida la categoría de proteínas pertenecientes al sistema de endomembranas (Fig. C1.12). Además, estos genes presentaban muy enriquecida la función molecular de transporte de

Resultados

electrones, y en menor medida la actividad oxidorreductasa, la unión a cationes y la actividad catalítica (Fig. C1.13).

Para el caso de los genes activados en fondo STY1::GR GR:NGA1/*wt* y que no varían en fondo STY1::GR GR:NGA1/*crc* (50), no se encontraron procesos biológicos, funciones moleculares ni componentes celulares significativamente representados.

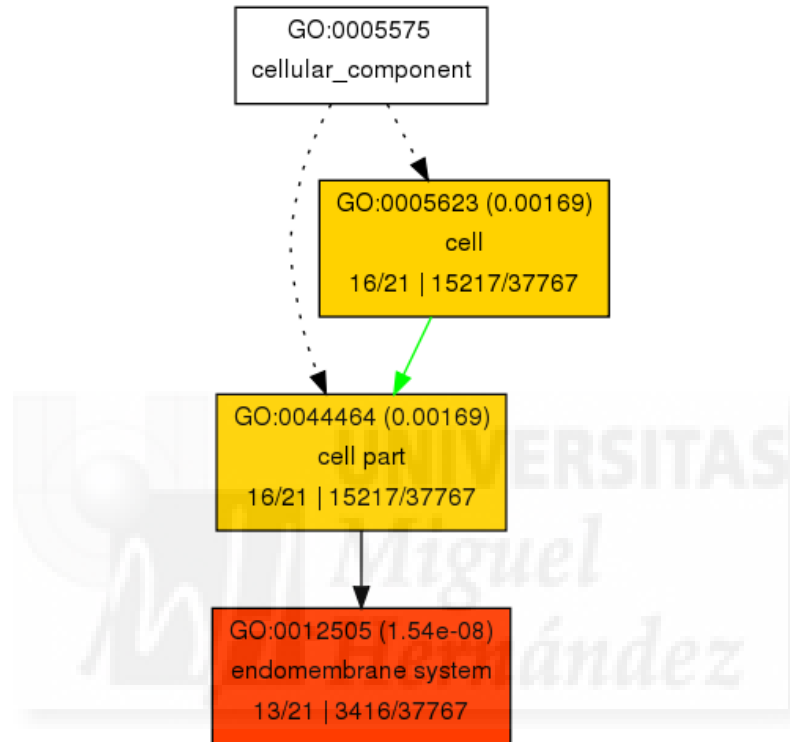


Figura C1.12. Análisis GO que muestra los componentes celulares enriquecidos para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/*wt* y activados en STY1:GR GR:NGA1/*crc*.

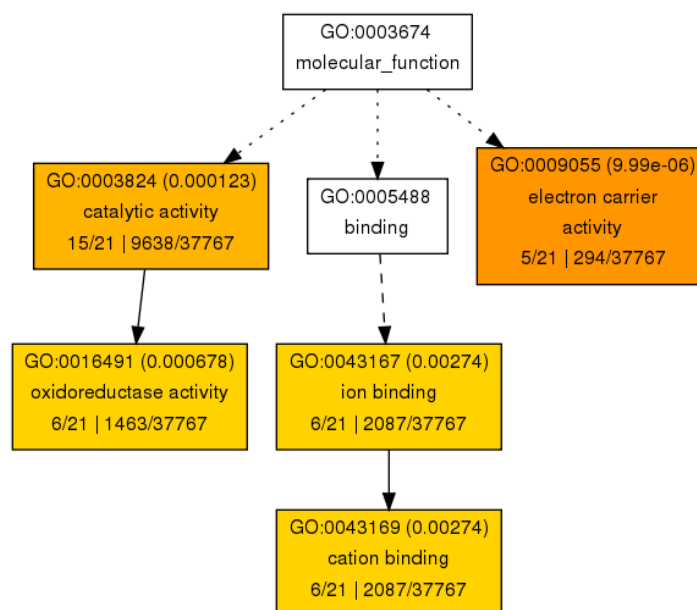


Figura C1.13 Análisis GO que muestra las funciones moleculares enriquecidas para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y activados en STY1:GR GR:NGA1/crc.

Respecto a la cuarta condición, la relativa a las dianas reprimidas en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y que no variaban en fondo STY1:GR GR:NGA1/crc (339), la más numerosa, se encontró que estos genes estaban involucrados en diferentes procesos biológicos, como respuesta a estrés, procesos metabólicos, procesos homeostáticos, biosíntesis celular, y regulación de la transcripción (Fig. C1.14). Además, estos genes presentan enriquecida la categoría de genes pertenecientes al sistema de endomembranas y de pared celular (Fig. C1.15).

En relación a los genes activados en fondo STY1:GR GR:NGA1/crc y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt, sólo se encontraron 5 genes que cumplieran esta condición (condición número 5), y este número era insuficiente para realizar un análisis GO, por lo que no fue posible aportar datos sobre el enriquecimiento de los procesos biológicos, funciones moleculares, ni componentes celulares para este grupo de genes.

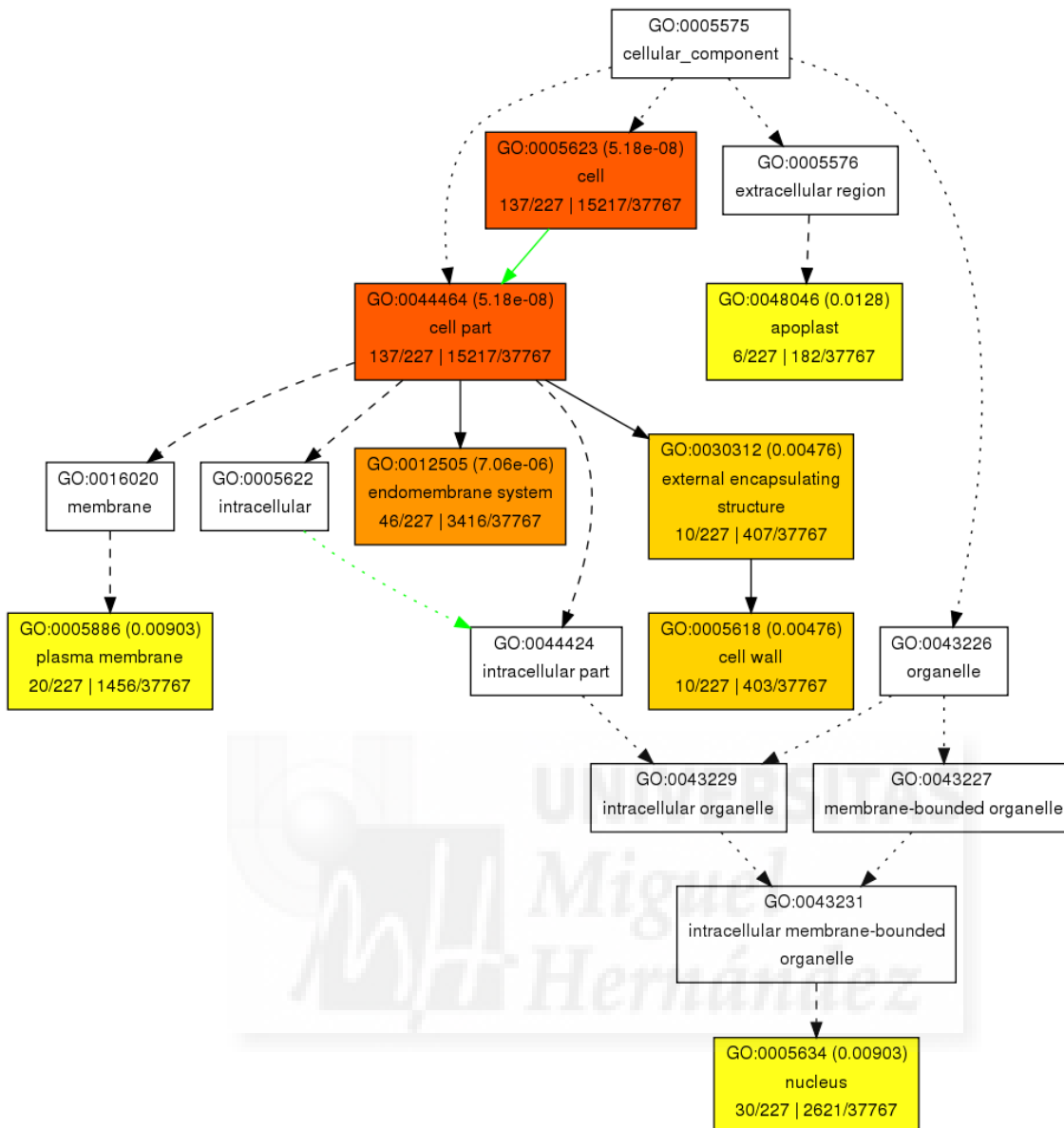


Figura C1.15. Análisis GO que muestra los componentes celulares enriquecidos para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt y que no varían en STY1:GR GR:NGA1/crc.

Por último, en el grupo de genes que se presentaban reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/crc y que no variaban en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt (18), correspondientes a la condición número 6, estaba enriquecida la categoría de genes pertenecientes al sistema de endomembranas (Fig. C1.16). Ningún proceso biológico ni función molecular aparecía representada para estos genes.

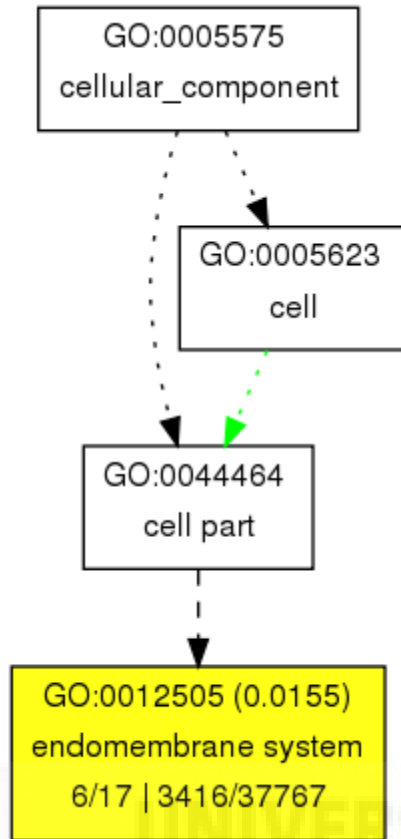


Figura C1.16. Análisis GO que muestra los componentes celulares enriquecidos para los genes que están reprimidos en fondo STY1:GR GR:NGA1/*crc* y que no varían en fondo STY1:GR GR:NGA1/wt.

1.5. Selección de genes candidato.

Como el número de genes seleccionados en base a las seis condiciones expuestas en el apartado anterior era demasiado grande para realizar estudios funcionales que aportaran luz sobre las funciones específicas del posible complejo STY1-CRC-NGA1, decidimos hacer una selección de estos genes en base a una serie de criterios que consideramos que debían cumplir las dianas putativas del complejo STY-CRC-NGA.

Puesto que CRC se expresa específicamente en el gineceo y los nectarios (Bowman and Smyth 1999), el primer criterio de selección fue que presentaran una expresión fuerte o moderada en el gineceo y/o que se haya descrito que estén

involucrados en alguna función relacionada con el desarrollo del mismo. Además, esperábamos que si el cambio en la expresión del gen en cuestión no se debiera a artefactos experimentales, su comportamiento debía ser similar o compatible con los resultados del experimento realizado con el sistema pOpON, al menos en el caso de la inducción de STY1 en fondo silvestre/*crc*. Por último, incluimos como criterio adicional que su función molecular fuera potencialmente interesante desde el punto de vista del proceso de desarrollo del gineceo, como por ejemplo, que estuviera implicado en regulación transcripcional o vías de señalización.

Sólo cuatro genes cumplían todas estas condiciones (Tabla C1.1), por lo que también se hizo otra selección con todos los genes que cumplieren al menos dos de los requisitos propuestos (Tabla C1.2), de esta manera se obtuvieron 18 posibles dianas adicionales del complejo con potencial interés para estudios posteriores. En total se escogieron 22 genes candidatos.



Tabla C1.1. Dianas putativas del complejo STY-CRC-NGA. Estos genes fueron seleccionados porque cumplían los cuatro filtros propuestos: expresión fuerte o moderada en el gineceo, involucrados en el desarrollo del gineceo, perfiles de expresión similares con el sistema pOpON y función molecular interesante desde el punto de vista del desarrollo del gineceo.*Valores normalizados del nivel de expresión tomados de travadb.org, donde 0 sería el valor mínimo y 1 el valor de expresión en el órgano analizado donde éste es máximo. Sombreado verde: activado, sombreado naranja: reprimido, sombreado gris: no varía.

LOCUS	NOMBRE	DESCRIPCIÓN	EXPRESIÓN EN CARPELO*	FUNCIÓN EN DESARROLLO DEL CARPELO	LITERATURA DESAR. CARPELO	STY1:GR GR:NGA1 (FC)		pOpON	
						WT	crc	WT	crc
AT3G01530	MYB57	Factor de transcripción de la familia R2R3. Interacciona con las proteínas JAZ y tiene funciones redundantes con MYB21 y MYB24 en el desarrollo del estambre.	Carpelo: 0,21 Estigma: 1	Interviene en la regulación de la síntesis del néctar	Bender et al., 2013	-1,58	2,2	STY1+NGA1	STY+NGA
AT5G11320	YUC4	Pertenece a la familia proteica YUCCA (flavinamonooxigenasa), implicada en la biosíntesis de auxinas.	Carpelo: 0,24 Estigma: 1	Dirige la síntesis de auxinas a la parte apical del gineceo Diana directa de STY1	Cheng et al., 2006 Sohlberg et al., 2006	2,04	-1,07	STY	STY+NGA
AT3G53232	DVL20	Perteneciente a la familia de los DEVIL, que consta de 21 miembros de pequeños polipéptidos involucrados en la diferenciación, el crecimiento y el desarrollo celular.	Carpelo: 0,46 Estigma: 0,13	Su sobreexpresión altera notablemente la morfología del fruto	Wen et al., 2004	-5,33	-1,01	STY+ NGA	STY+NGA
AT5G15160	BNQ2	Factor de transcripción perteneciente a la familia bHLH. Requerido para la correcta regulación del tiempo de floración.	Estigma: 0,23	Un gen homólogo a <i>BNQ2</i> en <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Style2.1</i> , controla la longitud del estilo	Chen et al., 2007	2,14	-1,19	STY	STY+NGA

Tabla C1.2. Dianas putativas del complejo NGA-CRC-STY. Estos genes fueron seleccionados porque cumplían al menos dos de los cuatro filtros propuestos: expresión fuerte o moderada en el gineceo, involucrados en el desarrollo del gineceo, perfiles de expresión similares con el sistema pOpON y función molecular interesante desde el punto de vista del desarrollo del gineceo.*Valores normalizados del nivel de expresión tomados de travadb.org, donde 0 sería el valor mínimo y 1 el valor máximo. Sombreado verde: activado, sombreado naranja: reprimido, sombreado gris: no varía.

LOCUS	NOMBRE	DESCRIPCIÓN	EXPRESIÓN	FUNCIÓN EN DESARROLLO DEL CARPELO	LITERATURA DESAR. CARPELO	STY1:GR GR:NGA1 (FC)		pOpON	
						WT	crc	WT	crc
AT3G48520	CYP94B3	Jasmonoyl-isoleucina-12-hidroxilasa, involucrada en el desarrollo del estigma. Componente integral de la membrana celular.	---	Desarrollo del estigma	Bruckhoff et al., 2016	-2,5	2,1	STY+NGA	STY+NGA
AT1G04250	AXR3	Regulador de la transcripción que actúa como represor de la expresión génica inducible por auxinas. Localizado en el núcleo.	Carpelo: 0,45 Estigma: 0,78	---	---	-2,21	1,61	STY+NGA	STY+NGA
AT1G20190	EXPA11	Miembro de la familia Alpha-Expansin. Involucrado en la modificación de la pared celular en el crecimiento celular multidimensional.	---	Desarrollo floral mediado por GAs	Cao et al., 2006	-1,64	1,89	STY+NGA	STY+NGA
AT1G69690	TCP15	Factor de transcripción de la familia TEOSINTE BRANCHED1-CYCLOIDEAPCF (TCP). Involucrado en el desarrollo del gineceo.	Carpelo: 0,57 Estigma: 0,23	Involucrado en la correcta fusión del carpelo y en el desarrollo de las papilas estigmáticas.	Lucero et al., 2015	2,15	1,14	---	---
AT4G08150	KNAT1	Factor de transcripción la familia de genes homeobox class I knotted1-like. Involucrado en el desarrollo del réplum.	Carpelo: 0,06 Estigma: 0,30	Da especificidad al réplum	Marsch-Martínez et al., 2014	2,07	1,04	---	---

AT4G17460	JAB	Factor de transcripción de la clase II HD-ZIP, necesario para la correcta formación del gineceo en las diferentes etapas.	Carpelo: 1	Desarrollo del gineceo y formación del fruto. Relación funcional con CRC	Zúñiga-Mayo et al., 2012	-2,02	-1,05	---	---
AT3G49110	PRXCA	Peroxidasa de clase III. Involucrada en la elongación celular.	Carpelo: 0,08 Estigma: 0,72	---	---	-2,09	1,52	STY+NGA	STY+NGA
AT3G22540	---	---	Carpelo: 0,18 Estigma: 1	---	---	3,42	1,15	STY+NGA	STY+NGA
AT2G22680	WAVH1	Proteína de la familia Zinc Finger. Actividad ubiquitina-proteína transferasa.	Carpelo: 0,28 Estigma: 0,10	---	---	2,98	-1,01	STY+NGA	STY+NGA
AT1G68780	---	Proteína de la súper familia RNI-like. Localizada en la membrana plasmática. Unión a proteína.	Carpelo: 0,30 Estigma: 0,12	---	---	2,17	1,21	STY+NGA	STY+NGA
AT4G13540	---	---	Carpelo: 0,61 Estigma: 1	---	---	2,46	1,08	STY+NGA	STY+NGA
AT3G54390	---	Actividad de factor de transcripción. Localizado en el núcleo.	Carpelo: 0,53 Estigma: 0,33	---	---	2,35	1,15	STY+NGA	STY+NGA
AT1G43910	---	Involucrado en la respuesta al Ácido abscísico. Actividad ATPasa y de unión a nucleótidos.	Carpelo: 0,44 Estigma: 0,11	---	---	-2,09	-1	STY+NGA	STY+NGA
AT2G28510	---	Factor de transcripción de la familia Zinc Finger. Involucrado en la regulación de la transcripción.	Carpelo: 0,56	---	---	-3,66	-1,07	STY+NGA	STY+NGA

AT1G05420	OFP12	---	Carpelo: 1	---	---	-2,02	-1,13	STY+NGA	STY+NGA
AT4G35165	---	---	Carpelo: 0,49	---	---	-2,23	1,15	STY+NGA	STY+NGA
AT1G44830	ERF014	Factor de transcripción de familia ERF/AP2, subfamilia DREB A-5, DE 15 miembros. Contiene un dominio AP2. Involucrado en la regulación de la transcripción.	Carpelo: 0,07 Estigma: 0,68	---	---	-2,68	1,05	---	---
AT4G18170	WRKY28	Factor de transcripción de la familia WRKY. Participa en la activación de los genes de la biosíntesis del ácido salicílico ICS1 y PBS3.	Carpelo: 0,04 Estigma: 0,46	---	---	-2,93	1,07	STY+NGA	STY+NGA

Resultados

En el presente trabajo no se ha continuado estudiando el papel de estas posibles dianas del complejo STY-CRC-NGA, aunque en futuros trabajos se realizarán una serie de experimentos que nos permitan validar su relación con los factores estudiados. Entre otros estudios (como su caracterización funcional, el estudio de interacciones genéticas, etc), se analizarán las regiones promotoras de estos genes para intentar identificar los posibles sitios de unión del complejo, complementando estos experimentos con ensayos de unión de los factores STY1/CRC/NGA1, solos o en combinación, a estas regiones promotoras, para así aportar evidencias sobre la base molecular de la actividad de estos posibles complejos..

En cualquier caso, los resultados obtenidos, donde un gran número de genes responden de manera diferente a la inducción de STY1 y NGA1 en presencia o ausencia de CRC, avalan los presupuestos de nuestra hipótesis y es de esperar que nos conduzcan al desarrollo de esta idea.



CAPÍTULO 2

2. Identificación de factores de transcripción con los que interaccionan los genes *NGATHA* y estudio de la posible relevancia funcional de dichos complejos.

El trabajo de esta tesis pretende aportar evidencias que apoyen nuestra hipótesis de que la morfogénesis del gineceo podría estar regulada por la formación de complejos transcripcionales cuya composición particular definiría la identidad de los distintos módulos funcionales. Resultados obtenidos en *Arabidopsis thaliana* nos han llevado a proponer que el complejo STY-CRC-NGA sería necesario para definir la identidad del estilo. Puesto que los gineceos en las angiospermas tienen una estructura modular bastante conservada, sería de esperar que también podría darse en otras especies de angiospermas. Este estudio se ha realizado en las especies *Nicotiana benthamiana* y *Eschscholzia californica*, pertenecientes a la familia de Solanaceae y Papaveraceae, respectivamente. Hemos elegido estas dos especies porque pertenecen a familias evolutivamente distantes entre sí y respecto a la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, de la familia Brassicaceae, y de esta manera podremos realizar un estudio comparativo para tener un mayor conocimiento de las rutas moleculares involucradas en el desarrollo apical del carpelo. Además, la morfología del gineceo es notablemente diferente en estas tres especies (figura C2.1), cualidad que hace más atractiva su selección como sujetos de estudio.

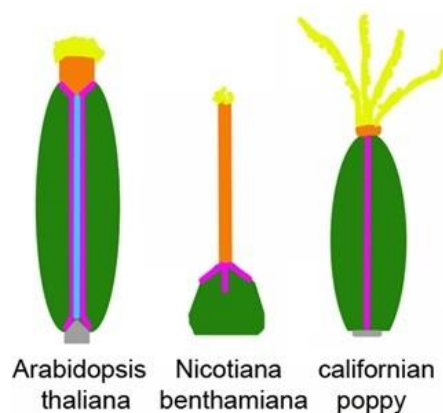


Figura C2.1. Morfología del gineceo de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* y *Eschscholzia californica*. Se pueden observar las marcadas diferencias en la morfología de la parte apical del gineceo.

2.1. Identificación de los homólogos de *SHI/STY/SRS* en *Eschscholzia californica* y *Nicotiana benthamiana*

2.1.1. Identificación en *Nicotiana benthamiana*

La familia de genes *SHI/STY/SRS* en *Arabidopsis* comprende 10 miembros. Las filogenias publicadas muestran que pertenecen a una familia específica de plantas, donde ya se encuentran homólogos en el musgo *Physcomitrella patens* o en el licofito *Selaginella mollendorffii* (Eklund et al., 2010b, Pfannebecker et al., 2017a).

Para identificar los homólogos de la familia *SHI/STY/SRS* de *Nicotiana benthamiana* se realizó un análisis BLAST (tBLASTn) utilizando como referencia la región codificante del gen *STY1* de *Arabidopsis* (At3g51060), restringida al dominio ZnFn-IGGH (fig.2).

En el momento en el que se inició este trabajo, se disponía de la versión v.0.4 del genoma de *Nicotiana benthamiana*, y el análisis BLAST se realizó sólo en la base de datos que la contenía y el transcriptoma disponible en ese momento (solgenomics.net; Bombarely et al, 2012). Se obtuvieron 3 secuencias genómicas distintas con homología a *AtSTY1*, en concreto: Niben.v.0.4.2.Scf 15388, Niben.v.0.4.2.Scf 18253 y Niben.v.0.4.2.Scf 35852.

A partir de estas secuencias se identificaron las posibles secuencias codificantes (exones) y las no codificantes (intrones) y se determinó tanto el posible inicio de la traducción como el final.

A partir de estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos para amplificar las secuencias codificantes (CDS) a partir de cDNA. De esta forma se obtuvieron tres fragmentos que correspondían a las secuencias genómicas Niben.v.0.4.2.Scf 15388, Niben.v.0.4.2.Scf 18253 y Niben.v.0.4.2.Scf 35852 y que denominamos: *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2*, y *NbSRS-L3*.

Las secuencias codificantes para cada uno de los tres genes *SHI/STY/SRS* identificados en *Nicotiana benthamiana* son las siguientes:

NbSRS-L1

ATG TCT GGT TTT TTT ACA CTA GGT GGT GGA GGT GGA GGT GGA GGA AAT AAA GAA CAA CAA
 M S G F F T L G G G G G G G G N K E Q Q>

100

GAA CAA GAA CAA GAT CAA TTA GCT ACG AAT AGT TTT CTT TTA TTC AAG AAC GAA GAG ATC
 E Q E Q D Q L A T N S F L L F K N E E I>

TAC AAC AAG GGT TTT GAA TTA TGG CAA CAG TAC TAT CAG TTG CAT CAA CAA AGA GCA CAA
 Y N K G F E L W Q Q Y Y Q L H Q Q R A Q>

200

ACC CCA CAA CAT CAA GTG CAA GAG ATG GAT TTC TCA TTT GGA GTG GGA CCC AGT AAC AAC
 T P Q H Q V Q E M D F S F G V G P S N N>

300

AGA AGA ATT ATC AGT GGT AGT AGT AGT AGT GGA AAT AAC AAT ATT GTC GGT GAT GAT AAT
 R R I I S G S S S S G N N N I V G D D N>

AAT CAT AAT TAT AGT AAT TCT TTT AGG GTA ATG AGA CCA ACA GGG GGA AGT AGT AGT AGT
 N H N Y S N S F R V M R P T G G S S S S>

400

GGT GGG GGT ATG AAT TGT CAA GAT TGT GGT AAT CAA GCT AAG AAA GAT TGT CCA CAT TTG
 G G G M N C Q D C G N Q A K K D C P H L>

AGA TGT CGA ACT TGT TGT AAG AGC AGA GGA TTT CAG TGC CAA ACT CAC GTT AAA AGT ACT
 R C R T C C K S R G F Q C Q T H V K S T>

500

TGG GTT CCT GCT GCT AAA AGA CGT GAA AGA CAA CAA CAA CTT GCT GCT TTG CAA CAA CAA
 W V P A A K R R E R Q Q Q L A A L Q Q Q>

600

CAA CAA ACT CAA CAG TTG AGT TTG AGA GCT GAT TCT AAT ATT ATT CCC AAA AGG CCA AGA
 Q Q T Q Q L S L R A D S N I I P K R P R>

GAG AAC CCC AGC TCC TCT CTT GCT TGT ACT CGT TTG CCC GCC ATC TCG TCA GGG TTA GAG
 E N P S S S L A C T R L P A I S S G L E>

700

GTA GGT GGT CAT TTT CCA GCA GAA GTG AGT TCT CAA GCA GTA TTT CGC TGC GTA AAA GTT
 V G G H F P A E V S S Q A V F R C V K V>

AGT GCA ATT GAC GAT GCA GAA GAT CAA TTT GCT TAT CAA ACG GCA GTT AAT ATT GGA GGC
 S A I D D A E D Q F A Y Q T A V N I G G>

800

CAT TTA TTC AAA GGA ATT TTA TAT GAT CAA GGG CCA GAG GGT CGA TAT GGT GGT GGT GGT
 H L F K G I L Y D Q G P E G R Y G G G G>

900

GGT GGT GGA GAG AGT TCA TCA GGT AGT GGC GCA GCA CAA CAG GCG CTG AAT TTT ATC ACC
 G G G E S S S G S G A A Q Q A L N F I T>

GGC GCC ACC ACT TCC ACC ACC ACA GCT GCC GCC ACA ACT CAC CAG CAA CAA CAT GGT ACA
 G A T T S T T T A A A T T H Q Q Q Q H G T>

ATG TTC GAT CCT TCG GTA TAT CCA ACT CCT ATT AA
 M F D P S V Y P T P I>

Resultados

NbSRS-L2

ATG GCT GGG TTC TTT TCA CTA GGA GGA AGA GAT ACA AGT CAA GAA CAA CAT CAT CAA GAA
M A G F F S L G G R D T S Q E Q H H Q E>

100

ACC ATT AAT CAT CAC AAT CCA GAG AGC AAC TGG TTC TTG TAC AGA AAC CAT GAT CAA GAT
T I N H H N P E S N W F L Y R N H D Q D>

CAA TTA CCC ACA TAC AAA GGG TTC GAA CTA TGG CAA CAA CAA CAA CAA GAA GAC GAG CAG
Q L P T Y K G F E L W Q Q Q Q Q E D E Q>

200

CAA AAT CAC CAA ATC CGG AAC CCG ATT ATT AAT CCA TTA CAA GAT CTT TAT CCC ACT TCA
Q N H Q I R N P I I N P L Q D L Y P T S>

300

GCT ATT GGA TTA GGT GTT GGT CCT ATC GCA ACA GAT CAT GGG GCG TCA AGA TCT GTC GCT
A I G L G V G P I A T D H G A S R S V A>

TTT GTA ATG ATG AGA AGT AGT GGG GGT GGA ATT AGT TGT CAA GAT TGT GGC AAC CAA GCT
F V M M R S S G G G I S C Q D C G N Q A>

400

AAG AAA GAT TGT CAA CAT ATG AGA TGT AGG ACT TGT TGT AAG AGC AGA AGT TTG CAG TGT
K K D C Q H M R C R T C C K S R S L Q C>

CAA ACA CAT GTG AGA AGT ACT TGG GTT CCA GCA GCT AAA AGA AGA GAA AAA CAA CAA CAA
Q T H V R S T W V P A A K R R E K Q Q Q>

500

ATT GCT TCT TTG CAA CAA CAA GAA CAT AGA GGG ATA GAA GTG GGA AAT TTT CCA TCT AAA
I A S L Q Q Q E H R G I E V G N F P S K>

600

GTA ACT TCA ACG GCT GTA TTT CAC CGT GTT AGA ATG AGC TCG ATT GAA GAA ACT GAA GAC
V T S T A V F H R V R M S S I E E T E D>

CAA ATA GCA TAT CAG ACT GCA GTT AAT ATT GGT GGA CAT ATT TTC AAG GGA ATT TTA TAT
Q I A Y Q T A V N I G G H I F K G I L Y>

700

GAT CAA GGT CTT GAG AGT CAG TAC AAT AAT ATG AAT GCT ACT ACC GGT GAC AGC TCA TTT
D Q G L E S Q Y N N M N A T T G D S S F>

GGT GGT ACT GAA CCA GTA GTG CCA CAT CAG CAT AAT CTT ATC GGC ACC GCC ACA TCA GCG
G G T E P V V P H Q H N L I G T A T S A>

800

GCC ACG TCC AAT ACG GCC GCT AGT GGC GGT GGT ACT GCT GCG GAG GCT GAA GGG TTA CAT
A T S N T A A S G G G T A A E A E G L H>

900

TTA CTA GAA CAT TCT ATA TAC TCT GCT CCT CTA ATT AAC ACT TTC ATG GCA GCT GGT ACG
L L E H S I Y S A P L I N T F M A A G T>

CAA TTC TTT CCA CAT CCT GCA AGA TTT TGA
Q F F P H P A R F *>

NbSRS-L3

ATG GCT GGG TTC TTT TCA CTA GGA GGA GGA GGA AGA GAA ACA AGT CAA GAA CAA CAT CAT
 M A G F F S L G G G G R E T S Q E Q H H>

100

CAA GAA ACC ACT AAT CAT CAC AAC CCA GAG AAC AAT TGG TTC TTG TAC AGA AAT CAT GAT
 Q E T T N H H N P E N N W F L Y R N H D>

CAA GAA TTA CCC GTA TAC AAA GGG TTC GAA CTA TGG CAA CAA CAA CAA CAA GAC GAG CAA
 Q E L P V Y K G F E L W Q Q Q Q Q D E Q>

200

CAA AAT TAT CAA ATC CGA AAC CCA ATT GTT AAT CCA TTA CAA GAT CCT TAT CCC ACT TCA
 Q N Y Q I R N P I V N P L Q D P Y P T S>

300

GCT ATT GGA ATA GGT GTC GGG CCG GCT GCA ACA GAT CAT GGG GCG TCA AAA TCT GCT GCT
 A I G I G V G P A A T D H G A S K S A A>

TTC GTA ATG ATG AGA AGT AGT GGA GGT GGA ATT AGT TGT CAA GAT TGT GGC AAC CAA GCT
 F V M M R S S G G G I S C Q D C G N Q A>

400

AAG AAA GAT TGT CAA CAT ATG AGA TGT AGG ACT TGT TGT AAG AGC AGA GGT TTA CAG TGT
 K K D C Q H M R C R T C C K S R G L Q C>

CAA ACA CAT GTG AGA AGT ACT TGG GTT CCA GCA GCT AAA AGA AGA GAA AAA CAA CAA CAA
 Q T H V R S T W V P A A K R R E K Q Q Q>

500

GAA CAT AGA GAT AAT AAT AAC CCC AAA AGG CTA AAA GAT GAT CCA AGT GGT TCT TCT CTT
 E H R D N N N P K R L K D D P S G S S L>

600

GTT TGC ACT CGT TTA CCT TCT AAT ACT GCT GGG TTA GAA GTT GGA AAT TAT CCA TCA AAA
 V C T R L P S N T A G L E V G N Y P S K>

GTA AAC TCA ACG GCT GTA TTT CAC CGT GTT CGA ATG AGC TCG CTT GAA GAA ACT GAA GAT
 V N S T A V F H R V R M S S L E E T E D>

700

CAA ATA GCA TAT CAG ACA GCA GTT AAT ATT GGT GGA AAT ATT TTC AAG GGA ATT TTA TAT
 Q I A Y Q T A V N I G G N I F K G I L Y>

GAT CAA GGT CTT GAG AGT CCG TAC AAT AAT ATG AAT GCT ACT GCT GGT GAC AGC TCG TCT
 D Q G L E S P Y N N M N A T A G D S S S>

800

GGT GGT GAA CCA GTA GTG CCA TAT CAG CAT AAC CTT ATA GGC ACC GCC ATG TCA GCG GCC
 G G E P V V P Y Q H N L I G T A M S A A>

900

ACG TCC AAC GCG GCC GCA AGT GGC GGT GGT GCT GCT GCG GCG GCT GAA GGG TCA CAT TTT
 T S N A A A S G G G A A A A A E G S H F>

CTA GAA CAT TCT CTA TAC TCT GCT CCC CTA ATT AAC ACT TTC ATG GCA GCT GGT ACG CAA
 L E H S L Y S A P L I N T F M A A G T Q>

TTC TTT CCA CCT CCT GCA AGA TCT TGA
 F F P P P A R S *>

2.1.2. Identificación en *Eschscholzia californica*

Cuando iniciamos este trabajo, no se disponía de ningún borrador del genoma de *E. californica*, sino tan solo de transcriptomas relativamente completos en los que, sin embargo, no identificamos ningún homólogo de los genes *SHI/STY/SRS*. Puesto que se encuentran homólogos ya en briofitas, sospechábamos que no los habíamos encontrado por no estar presentes en los transcriptomas disponibles y no porque el genoma de *E. californica* no codificara ningún gen de la familia. Por ello, para buscarlos, se diseñaron cebadores degenerados basados en la secuencia de los dominios conservados RING-like e IGGH de los genes *SHI/STY/SRS* de otras especies. Sólo un gen putativo *SHI/STY/SRS*, denominado *EcSRS-L*, se amplificó a partir de cDNA de flores de *E. californica*. La secuencia codificante completa de *EcSRS-L* se obtuvo posteriormente mediante Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR) y mediante el uso de un cebador adaptado de oligo-dT. La secuencia de la proteína *EcSRS-L* predicha poseía el dominio RING típico y el motivo IGGH típicos de la familia. Recientemente se ha identificado otro miembro de la familia, *EscaSTY-L* (Pfannebecker et al., 2017a), que sin embargo nosotros no pudimos amplificar con esta estrategia, probablemente porque contiene una variante del dominio IGGH que no se alinea con nuestros cebadores degenerados (Fig. C2.2).

La secuencia del gen *EcSRS-L* se muestra a continuación:

EcSRS-L

ATG GCA GGA TTT TCA CTA GGT GGA GGT GGG GGT AGT GGT GGT GGT AAT AAC CAA AAC CCA
 M A G F S L G G G G G S G G G N N Q N P>

100

CCT CAA GAA ATC CAC CCA GAA AAC CTT TTC TTA TAT AGA AAT GAA GAA ATT TCA TCT TAC
 P Q E I H P E N L F L Y R N E E I S S Y>

AAC AAC AAT AGT AAT AGT AAC AAG GGT TTT GAG TTA TGG CAA CAT CAT CAA CAT CAA CTT
 N N N S N S N K G F E L W Q H H Q H Q L>

200

CAA AGA CAT CAT CAC CAT TAC CAA TTA CAA CAA CAA CAA CAA AAT GCT TAT TCT TTA
 Q R H H H H Y Q L Q Q Q Q Q Q N A Y S L>

300

GAT ATG GGA ACG AGT CGA AGT ACT AAC GCG GGT TCG GAT GAA TCA TCT TCA AGA GCT TTA
 D M G T S R S T N A G S D E S S S R A L>

ACA ATG ATG ATG AGA CAT ACT AAT ACT AAT AGT AAT AGT GGA GGT GGA GAA GGA GAA GGA
 T M M M R H T N T N S N S G G G E G E G>

400

AAA GGT TGT CAA GAT TGT GGA AAT CAA GCT AAA AAA GAT TGT ATT CAT ATG AGA TGT AGA
 K G C Q D C G N Q A K K D C I H M R C R>

ACT TGT TGT AAA AGT AGA GGA TTT CCA TGT CAA ACT CAT GTT AAA AGC ACT TGG GTA CCT
 T C C K S R G F P C Q T H V K S T W V P>

500

GCC TCT AGA AGA AGA GAA AGA CAA CAA CAA CTT CAA GCT CTA CAA GAA CAT CAA CTC ATG
 A S R R R E R Q Q Q L Q A L Q E H Q L M>

600

AGA GGA GGA GGA GGA GAA GGA GTA GAG AGA GAG AAT ACT ACT ACT ACT ACT ACT AAA
 R G G G G E G V E R E N T T T T T T T T T K>

AGA CTT AGA GAA AAC CTT CTT CCA ACT AAT AAT TCT ACT CTT GCT TGC ACT TCT AAT ACT
 R L R E N L L P T N N S T L A C T S N T>

700

CGT ATA CCC ACT ACT ACT TCC ACA GGG TTA GAA GTG GGG AAT TTT CCA GCG GAA TTG AAT
 R I P T T T S T G L E V G N F P A E L N>

TCA TCA GCT GTG TTT CGT TGT GTT AGG GTT AGT GGA ATT GAA GAT GCA GAT GAA CAA TAT
 S S A V F R C V R V S G I E D A D E Q Y>

800

GCA TAT CAA ACT GCT GTT AAC ATT GGG GGT CAT TTA TTC AAA GGC ATT CTT TAC GAT CAA
 A Y Q T A V N I G G H L F K G I L Y D Q>

900

GGC CCT GGT TCT TCA GGC GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT ACA CGT CAT CTC ATA
 G P G S S G G G G G G G G G G G G T R H L I>

ACC GAT AGT ACC ACC ACC GTC ACC ACC TCA GCC GGA GTT GCT GCT GGG TTG CTT GAT TCT
 T D S T T T V T T S A G V A A G L L D S>

1000

ACT TCT TTG TAC CCA ACT CCT CTC AAT GCT TTC ATG GCG GGT ACA CAC TTC TTC CCA CCA
 T S L Y P T P L N A F M A G T H F F P P>

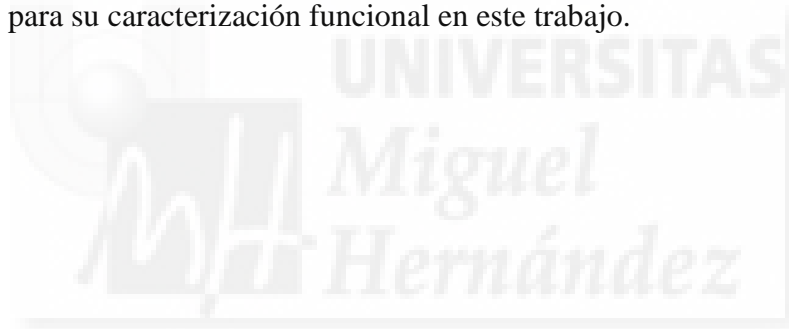
CCA AGA TCA TAA
 P R S *>

2.1.3. Alineamiento de secuencias

Para determinar el grado de similitud de los genes identificados con los de la familia *SHI/STY/SRS* en *Arabidopsis thaliana* se realizó, utilizando la herramienta ClustalW del paquete Mac Vector, un alineamiento múltiple de las secuencias predichas de sus proteínas.

En la figura C2.2 se muestra como, tanto las proteínas de *Arabidopsis*, como las identificadas en *Nicotiana benthamiana* o *Eschscholzia californica*, comparten dos dominios altamente conservados; un dominio RING zinc finger C3HC3H rico en cisteína e histidina, que normalmente se ha relacionado con interacciones proteicas; y un motivo IGGH que parece ser específico para esta familia (Fridborg et al., 2001), pero fuera de estas regiones conservadas las secuencias de proteínas son, en general, bastante divergentes.

Los tres genes identificados en *N. benthamiana* y el identificado en *E. californica* fueron elegidos para su caracterización funcional en este trabajo.



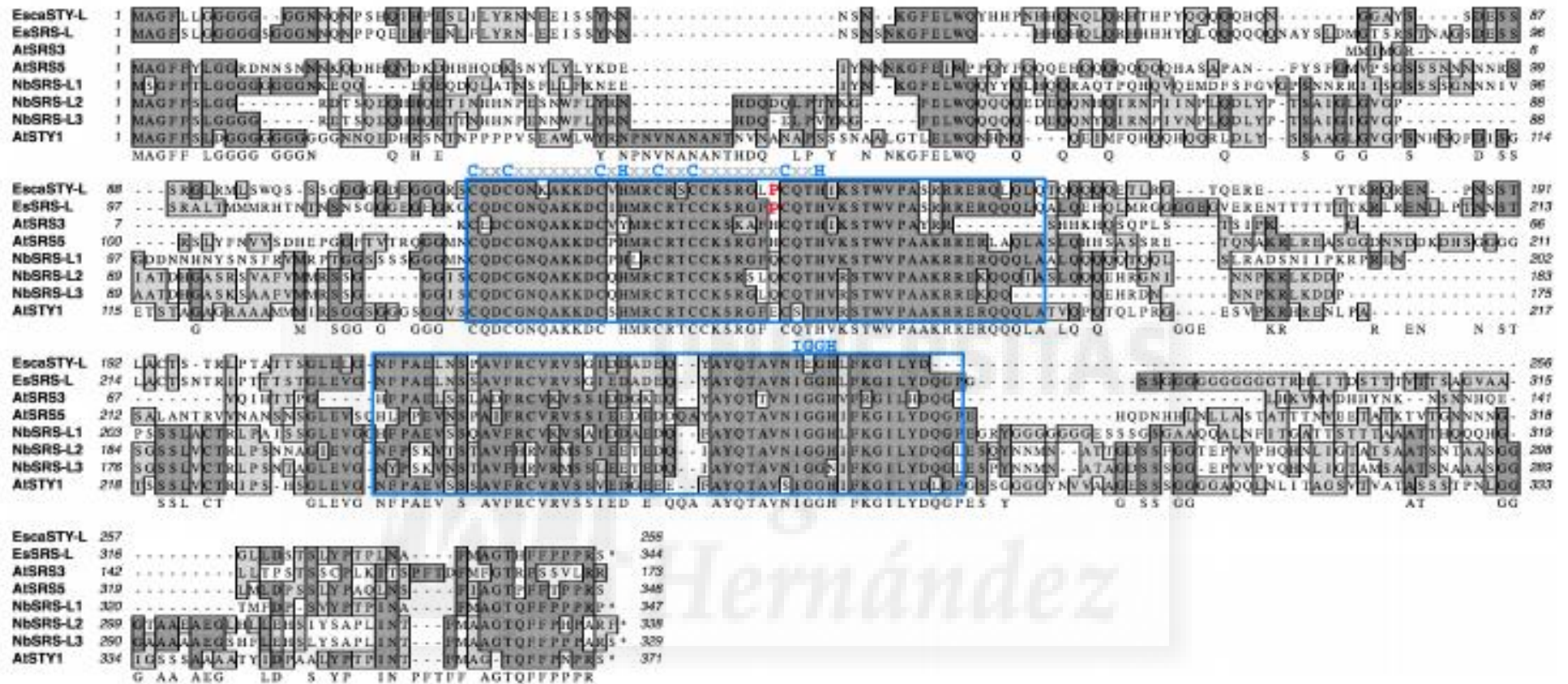


Figura C2.2. Alineamiento de secuencias entre las proteínas de la familia SHI/STY/SRS para las especies (por orden de aparición): *Eschscholzia californica*, *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*. Los dominios C3HC3H RING Zinc finger e IGGH aparecen enmarcados en azul. Se muestran en rojo los residuos atípicos de Prolina en las proteínas de *E. californica*.

2.1.4. Árbol filogenético

Para determinar las relaciones filogenéticas entre los genes de *E. californica* y *N. benthamiana* y los miembros de la familia *SHI/STY/SRS* en Arabidopsis, se realizaron análisis comparativos de secuencias.

Para este estudio realizamos un nuevo análisis BLAST en una versión más reciente del genoma de *Nicotiana benthamiana* (v1.0.1, disponible en solgenomics.net desde 2015), donde identificamos 8 secuencias más con homología a genes *SHI/STY/SRS* y cuyas secuencias proteicas deducidas contenían los dominios RING e IGGH. Además, incluimos la secuencia publicada de *EscaSTY-L* y la del gen de la familia identificado en la briofita *Physcomitrella patens*, *PpSHI* (Pfannebecker et al., 2017a)

Utilizamos de nuevo el paquete Mac Vector para realizar el alineamiento de las secuencias deducidas de las proteínas, esta vez con la herramienta MUSCLE. Con este alineamiento, construimos un árbol de distancias (Fig. C2.3) mediante el algoritmo Neighbor-joining, incorporado en el software Mega7,. En este caso, se estimó el árbol a partir de las matrices de distancia de 2000 réplicas *bootstrap*.

El árbol resultante (Fig. C2.3) tenía una topología global similar a la de otros previamente publicados, aunque se encontraron algunas diferencias que afectaban principalmente a los clados menos soportados, probablemente debido al uso de diferentes métodos de reconstrucción de los árboles y a que se utilizaron conjuntos de secuencias diferentes. El clado que comprende a los factores de Arabidopsis AtSTY1, AtSHI y AtSRS8 incluía también a cinco de las proteínas predichas de Nicotiana, dos de las cuales eran las correspondientes a los genes *NbSRS-L2* y *NbSRS-L3* que habíamos identificado previamente. En otro clado se agrupaban cuatro proteínas más de Nicotiana, incluyendo a *NbSRS-L1*, y a AtSRS5 y AtSRS7, mientras que tanto *EcSRS-L* como *EscaSTY-L* pertenecían al mismo clado que AtSRS3. Por último, las dos proteínas de Nicotiana restantes estaban agrupadas junto con AtLRP1.

El bajo valor de *bootstrap* en algunas ramificaciones no permitió establecer inequívocamente las relaciones filogenéticas más directas de algunos de los factores de *N. benthamiana* y *E. californica* con las proteínas SHI/STY/SRS de Arabidopsis, pero el árbol sugería que el alto número de homólogos encontrados en Arabidopsis y

Nicotiana procedían de eventos de duplicación independientes y, además, que en Nicotiana, un alotetraploide reciente, normalmente estaban presentes dos copias de cada gen.

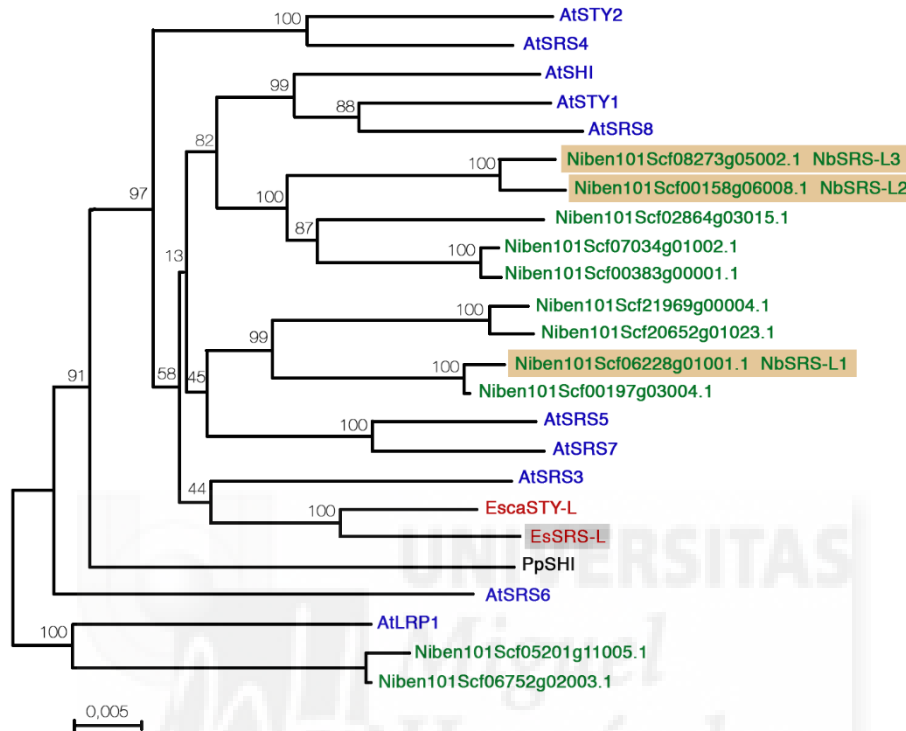


Figura C2.3. Árbol filogenético de las proteínas SHI/STY/SRS para las especies *Physcomitrella patens*, *Eschscholzia californica*, *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*. Las proteínas que identificamos inicialmente y que hemos caracterizado funcionalmente en este trabajo están recuadradas (con sombreado marrón las proteínas de *N. benthamiana* y en gris la proteína de *E. californica*).

2.2. Patrones de expresión de SHI/STY/SRS en *Eschscholzia californica* y *Nicotiana benthamiana*. Hibridación “*in situ*”.

Se analizó el patrón de expresión espacio-temporal en yemas jóvenes de flores silvestres de *Nicotiana benthamiana* y *Eschscholzia californica* en distintos estadios de desarrollo. Para ello se diseñaron sondas específicas de los genes *SRS-L* de estas dos especies que hibridaban con cada uno de los correspondientes mRNAs, localizadas en

Resultados

zonas de la región codificante. Para los genes *SRS-L* de *Nicotiana benthamiana*, se diseñaron sondas donde la homología de secuencia entre los tres genes fuera baja a fin de minimizar efectos de hibridación cruzada.

Con este ensayo se pretendía estudiar la posible conservación funcional de los genes *SHI/STY/SRS*. En general, cuando los homólogos tienen funciones conservadas en diferentes especies, sus patrones de expresión son también similares.

Los tres genes *NbSRS-L* estudiados en *N. benthamiana* mostraron patrones de expresión similares, pero no idénticos (Fig. C2.4).

NbSRS-L1 se detectó en estadios muy jóvenes, en el meristemo floral (Fig. C2.4A). En etapas posteriores, la expresión de *NbSRS-L1* se concentró en el extremo distal de los pétalos en crecimiento y del gineceo, así como en la placenta y en las anteras (Fig. 12B). En estadios posteriores a la fusión del estilo, *NbSRS-L1* se detectó principalmente en óvulos y granos de polen, mientras que sólo se expresaba débilmente en el dominio interior del estilo y el estigma (Fig. C2.4 C, D).

NbSRS-L2 mostró una expresión más expandida en los órganos florales. En yemas jóvenes, la expresión de *NbSRS-L2* se asoció a todos los primordios de órganos florales incipientes (Fig. C2.4 E), donde se pudo detectar a lo largo del desarrollo floral (Fig. C2.4 E-H). En etapas posteriores, se detectó expresión en pétalos en crecimiento, estambres y gineceo, principalmente en el extremo distal (Fig. C2.4 F). Después de la fusión del estilo, *NbSRS-L2* se expresaba principalmente en los óvulos y también podía encontrarse en el dominio interno del estilo, la pared del ovario y el extremo distal de los pétalos en crecimiento (Fig. C2.4G-H).

Los patrones de expresión de *NbSRS-L3* eran muy similares a los de *NbSRS-L1* (Fig. C2.4 I-K), aunque en etapas posteriores la expresión en el dominio interior del estilo era más fuerte que para *NbSRS-L1* (Fig C2.4 L).

En resumen, los genes *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2* y *NbSRS-L3* mostraron patrones de expresión notablemente similares durante el desarrollo floral, expresándose en todos los primordios de órganos florales desde las primeras etapas de desarrollo y más tarde asociados principalmente al extremo distal de los órganos florales en desarrollo, placentas y primordios del óvulo, así como a la parte interior del estilo en etapas más avanzadas. Estos patrones de expresión se asemejan a los descritos para varios genes *SHI/STY/SRS* de *Arabidopsis* (Fig. C2.5) (Kuusk et al., 2002; Kuusk et al., 2006).

Por otro lado, para *Eschscholzia californica*, los transcritos del gen *EcSRS-L* se detectaron débilmente en flores jóvenes desde las primeras etapas de desarrollo. En las yemas muy jóvenes, *EcSRS-L* fue detectado en los primordios de los estambres y el primordio del carpelo (Fig. 13A). En etapas posteriores, el mRNA de *EcSRS-L* se acumulaba débilmente en anteras, en la placenta y en los óvulos (Fig. C2.5B-F). La expresión de *EcSRS-L* también podía detectarse en las células más distales del gineceo en desarrollo, en el dominio que posteriormente se diferenciaría en el estilo y el estigma (Fig. C2.5 B, D).

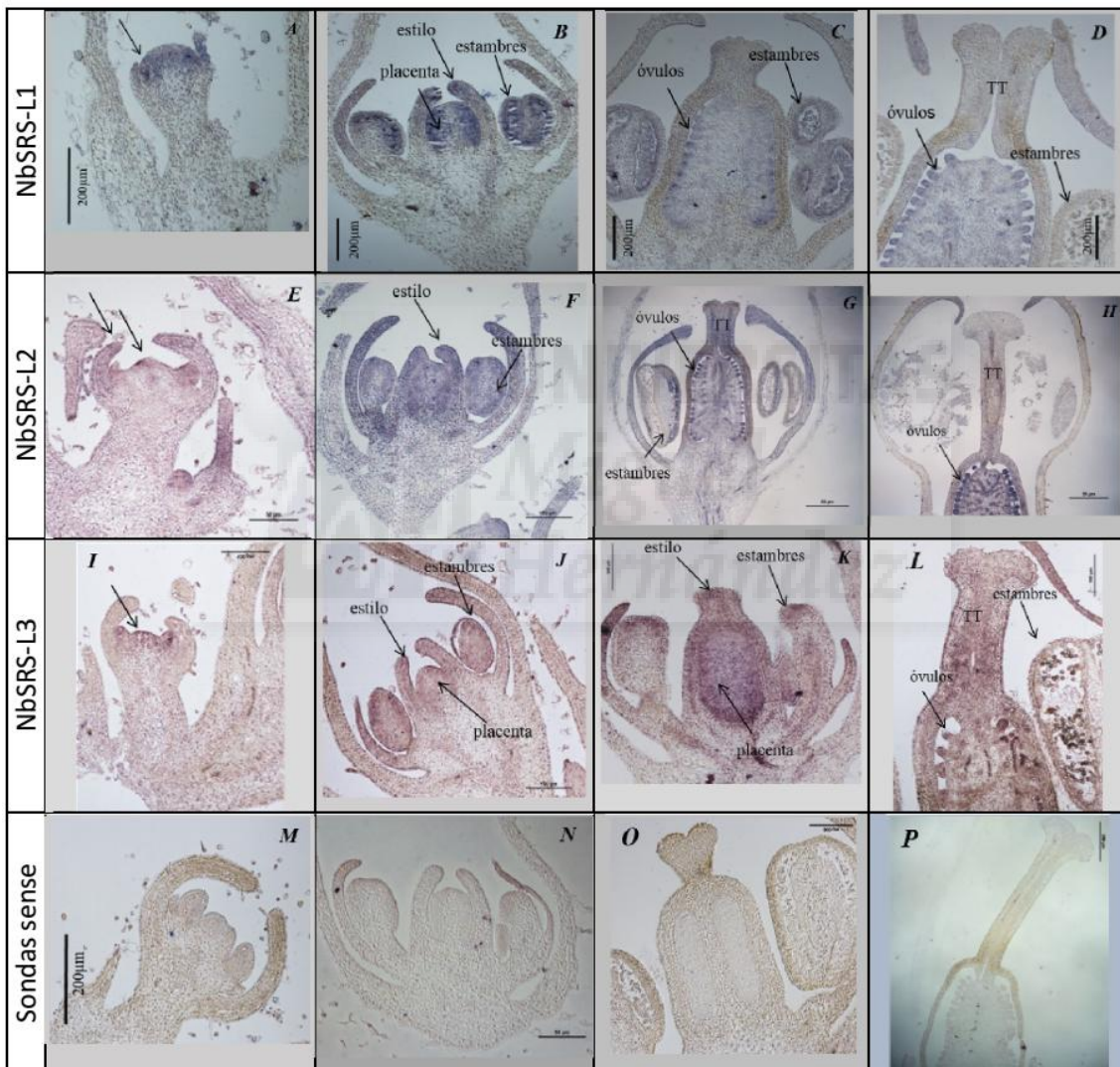


Figura C2.4. Patrones de expresión de los genes *SHI/STY/SRS* en flores silvestres de *N. benthamiana*. La expresión de los genes *NbSRS-L* en *N. benthamiana* se concentra en estambres (B,C,D,F,G,J,K,L), óvulos (B,C,D,F,G,H,J,K,L), en estilo en desarrollo (B,F,J,K), en el tracto de transmisión (TT) (D,G,H,L) y en la parte apical del meristemo floral (A,E,I). Las figuras A-D corresponden a los patrones de expresión de *NbSRS-L1*, las figuras E-H indican los patrones de expresión de *NbSRS-L2*, las figuras I-L muestran la expresión de *NbSRS-L3* en flores de

Resultados

N. benthamiana y las figuras **M-P** pertenecen a los controles negativos, resultado de la hibridación con una sonda sentido de los genes *NbSRS-L*.

Este patrón de expresión se asemejaba de manera general a los descritos para los genes *SHI/STY/SRS* de *Arabidopsis*, los cuales mostraron acumulación distal en el desarrollo del gineceo y, al menos en el caso de *AtSTY1*, expresión en óvulos, tal y como se muestra en la Fig. C2.6, tomada de Kuusk et al., (2002). Además, como ya se ha mostrado anteriormente, los genes *SHI/STY/SRS* de *Nicotiana benthamiana* mostraban patrones de expresión similares a los reportados para el gen *EcSRS-L* en *Eschscholzia californica*, lo cual podría estar indicando que la expresión de los genes *SHI/STY/SRS* podría estar conservada en especies evolutivamente distantes.

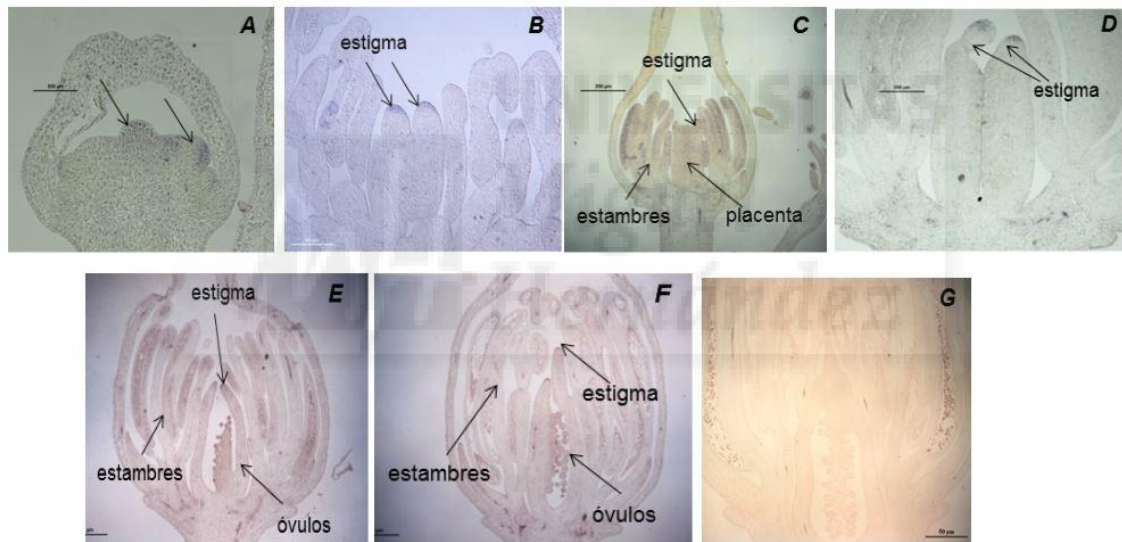


Figura C2.5. Patrones de expresión de los genes *SHI/STY/SRS* en flores silvestres de *Eschscholzia californica*. Los genes *SHI/STY/SRS* en *Eschscholzia californica* se expresan en estambres (**C,E,F**), óvulos (**C,E,F**), en estilo y estigma en desarrollo (**B,C,D,E,F**) y en la parte apical del meristemo floral (**A**). Las figuras **A-F** muestran los patrones de expresión de *EcSRS-L* en *Eschscholzia californica*, mientras que la figura **G** corresponde al control negativo obtenido al hibridar con una sonda sentido.

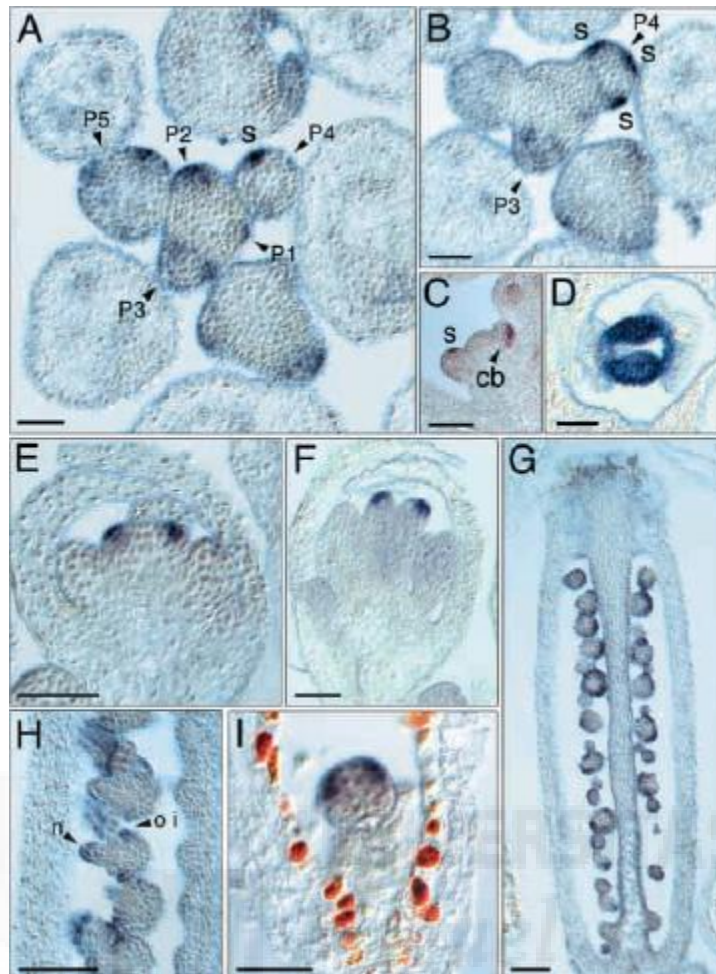


Figura C2.6. Expresión de *STY1* en *Arabidopsis* determinada por hibridación “*in situ*”. (A,B) secciones transversales consecutivas del meristemo inflorescente. (C) Sección longitudinal del meristemo inflorescente. (D-F) Expresión de la elongación del gineceo. (G) Sección longitudinal del estadio 12 del gineceo mostrando expresión entre estilo y estigma, en las capas externas del septum y en los tegumentos exteriores. (H) Sección longitudinal de los óvulos jóvenes. La expresión se ve en los tegumentos exteriores. (I) Sección longitudinal del embrión. Figura tomada de Kuusk et al., (2002).

2.3. Análisis funcional de los genes de la familia *SHI/STY/SRS* en las especies *Nicotiana benthamiana* y *Eschscholzia californica*.

2.3.1. Rescate funcional: generación de transgénicas

Un método de comprobar el grado de conservación funcional de un gen en diferentes especies es la comparación del efecto fenotípico de la sobreexpresión de

Resultados

dicho gen en distintas especies, o bien el grado en el que el gen de una especie es capaz de sustituir el gen homólogo en otra especie. Para realizar este análisis, se generaron plantas transgénicas en *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaban los genes *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2*, *NbSRS-L3* y *EcSRS-L*, tanto en fondo silvestre como en el fondo mutante *styl1-1 styl2-1*, un doble mutante en dos genes de la familia SHI/STY/SRS que tiene un fenotipo evidente en el desarrollo del estilo y el estigma pero es fértil. Si las propiedades moleculares de las proteínas homólogas en las dos especies están conservadas, esperaríamos encontrar fenotipos semejantes a los de la sobreexpresión del gen endógeno en el caso del fondo silvestre, y la supresión del fenotipo mutante en el fondo *styl1 styl2*.

Se han generado las construcciones de sobreexpresión: 35S::*NbSRS-L1*, 35S::*NbSRS-L2*, 35S::*NbSRS-L3* y 35S::*EcSRS-L* (Fig.C2.7).

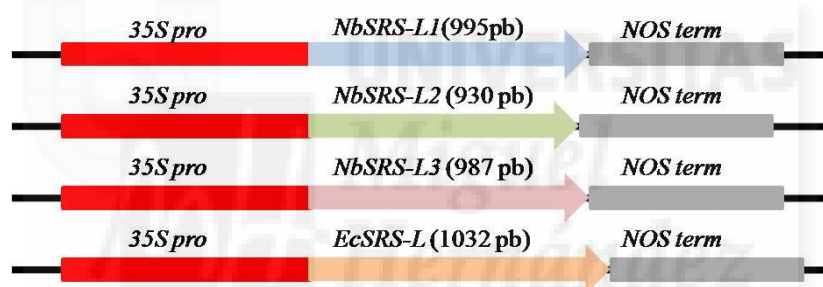


Figura C2.7. Esquema de las construcciones utilizadas para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la sobreexpresión de los genes *NbSRS-L* y *EcSRS-L*. Se representa el promotor 35S (en rojo), la secuencia codificante de *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2*, *NbSRS-L3* y *EcSRS-L* (en azul turquesa, verde, violeta y rosa, respectivamente) y el terminador del gen NOS (en gris).

Con estas construcciones se transformaron tanto plantas silvestres, como los mutantes *styl1styl2* de *Arabidopsis*.

Cuando se introdujeron estas construcciones en plantas mutantes *styl1styl2* de *A. thaliana*, se observó el rescate parcial o completo de los defectos en estilo y estigma presentes en los frutos mutantes en la mayoría de las líneas transformadas con cualquiera de las tres construcciones (Fig. C2.8 C-E y Fig. C2.9). Atendiendo a los fenotipos observados se establecieron tres categorías: complementación total, complementación parcial y no complementación (Fig. C2.9). La figura C2.8 C muestra frutos en los que sólo se produce el rescate parcial del fenotipo mutante, el estilo no está

fusionado del todo y las valvas están ensanchadas en la parte apical. Las construcciones 35S::NbSRS-L1 y 35S::NbSRS-L3 causaron defectos más suaves. Además del rescate, la sobreexpresión de los tres genes produjo otros efectos fenotípicos en el desarrollo del gineceo y fueron más evidentes cuando se introdujeron en el fondo silvestre. Estos fenotipos se describen en el siguiente punto.

En la figura C2.9 se ve como 35S::NbSRS-L1 resultó algo menos eficiente en la complementación del fenotipo *sty1 sty2*, mientras que 35S::NbSRS-L2 y 35S::NbSRS-L3 presentaron frecuencias muy similares de cada una de las categorías fenotípicas y fueron capaces de suprimir completamente los defectos en el desarrollo del estilo y el estigma en aproximadamente la mitad de las líneas T1. Por otro lado, la sobreexpresión de cualquiera de los tres genes *NbSRS-L* en fondo mutante *sty1sty2* de *Arabidopsis* también fue capaz de suprimir el margen aserrado típico de las hojas mutantes (Fig. C2.10), a la vez que causaba un desarrollo anormal de las mismas, que mostraban una morfología más estrecha y alargada que las silvestres, y estaban ligeramente curvadas hacia el envés. Este fenotipo recordaba al de las líneas de sobreexpresión del gen *STY1* en *Arabidopsis*.

Resultados

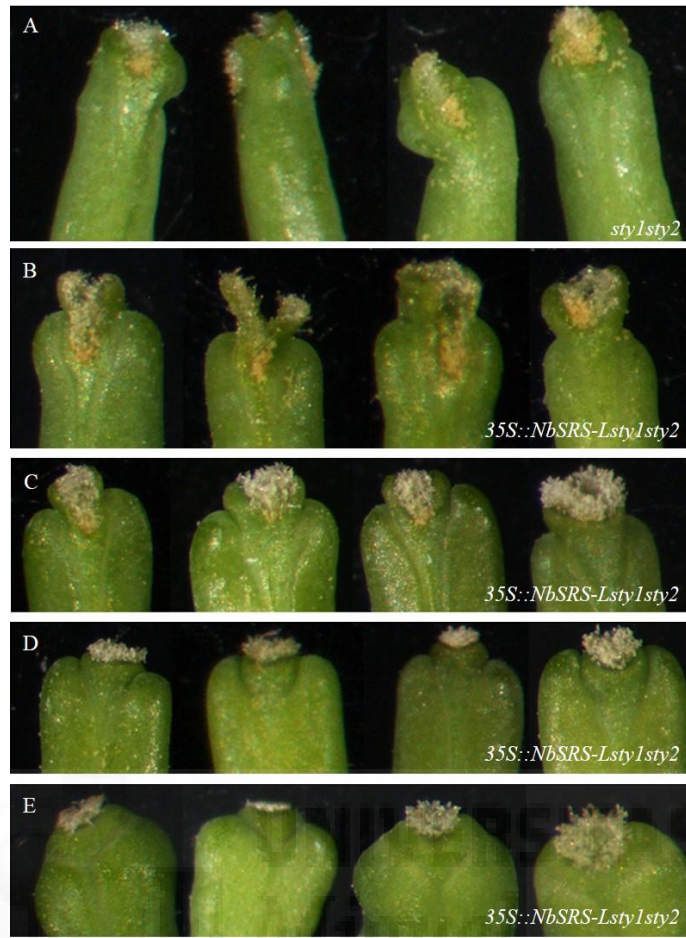


Figura C2.8. Fenotipo en frutos de plantas transgénicas *NbSRS-L* en fondo mutante *sty1 sty2* de *Arabidopsis thaliana*. Fotos tomadas a la lupa. Se muestra la parte apical de (A) mutante *sty1 sty2* de Arabidopsis, (B-E) complementación del mutante *sty1 sty2* con los genes *NbSRS-L*. Se obtuvieron diferentes categorías de complementación, (B) frutos no complementados, (C) frutos parcialmente complementados, (D y E) frutos totalmente complementados.

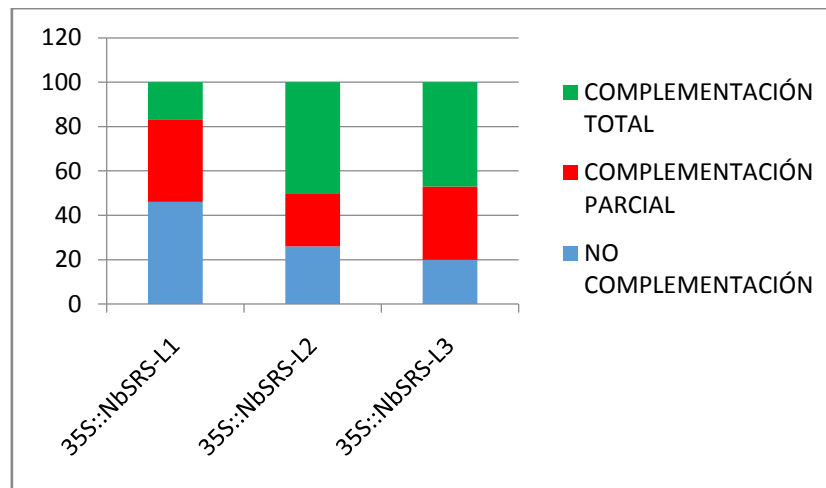


Figura C2.9. Gráfica de frecuencias de las distintas categorías obtenidas tras la complementación de los genes *NbSRS-L* en fondo *sty1 sty2*. En azul se representa la frecuencia de plantas no complementadas, en rojo las plantas que presentaban una complementación parcial y en verde las plantas donde la complementación fue completa. Para cada una de las construcciones se observaron 30 plantas T1.



Figura C2.10. Fenotipo de las hojas de roseta de plantas transgénicas 35S::NbSRS-L en fondo mutante *sty1 sty2* de *Arabidopsis thaliana*. Fotografía a bajo aumento de las hojas de roseta (A) de una planta silvestre, (B) del mutante *sty1 sty2*, donde se aprecian las hojas aserradas, (C) línea de sobreexpresión del gen *STY1* de *A. thaliana* donde se observan hojas alargadas y curvadas hacia dentro, (D) líneas de complementación de los genes *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2* y *NbSRS-L3* sobre fondo mutante *sty1 sty2*, en los tres casos se obtuvo el mismo fenotipo, las hojas se presentan alargadas y curvadas hacia dentro, lo que recuerda al fenotipo de sobreexpresión de *STY1*.

Un estudio similar se llevó a cabo con el gen *EcSRS-L* identificado en este trabajo. Se generaron 30 líneas T1 con 35S::EcSRS-L en fondo mutante *sty1sty2*. Sin embargo, la sobreexpresión de *EcSRS-L* no fue capaz de producir la complementación del fenotipo mutante *sty1sty2* (Fig. C2.11).



Figura C2.11. Fenotipo en frutos de plantas transgénicas *EcSRS-L* en fondo mutante *sty1 sty2* de *Arabidopsis thaliana*. Fotos tomadas a la lupa. Detalle de la parte apical de los frutos de *Arabidopsis*. Se observaron 30 plantas T1 de 35S::*EcSRS-L*.

2.3.2. Sobreexpresión de los genes de la familia *SHI/STY/SRS* en *Arabidopsis thaliana*.

Para completar el estudio del análisis funcional de los genes de la familia *SHI/STY/SRS* en las especies *Nicotiana benthamiana* y *Eschscholzia californica* se generaron líneas de sobreexpresión de los genes *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2*, *NbSRS-L3* y *EcSRS-L* en fondo silvestre de *Arabidopsis thaliana*. Las plantas transgénicas se generaron utilizando las construcciones 35S::*NbSRS-L1*, 35S::*NbSRS-L2*, 35S::*NbSRS-L3* y 35S::*EcSRS-L* descritas anteriormente (Fig. C2.7). Si las funciones moleculares que codifican estas proteínas estuvieran conservadas en *N. benthamiana*, *E. californica* y *A. thaliana*, se esperaría obtener en *Arabidopsis* fenotipos semejantes a los de la sobreexpresión de los genes endógenos *AtSHI/STY*.

El estudio fenotípico de las plantas transgénicas que sobreexpresan las proteínas *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2*, *NbSRS-L3* y *EcSRS-L* fue realizado por Verónica Sánchez Gerschon durante la realización de su Trabajo Fin de Máster, con mi colaboración y bajo mi codirección. Por la coherencia temática con el resto de resultados de este capítulo, hemos incluido parte del trabajo en él también. Para la realización de este trabajo se observaron 30 plantas T1 que sobreexpresaban los tres genes *NbSRS-L* y se vió que los tres genes causaban alteraciones fenotípicas similares en el desarrollo del carpelo y el fruto (Fig. C2.12). Estas alteraciones recordaban a las causadas en las líneas ya reportadas que expresan constitutivamente *AtSTY1* y *AtSTY2* (Kuusk et al., 2002) (Fig. C2.12).

Además, los fenotipos de sobreexpresión en carpelo y fruto de los tres genes *NbSRS-L* estudiados en este trabajo sobre fondo silvestre eran muy similares a los observados en fondo mutante *sty1sty2* (Fig. C2.8).

En las líneas 35S::*NbSRS-L1* y 35S::*NbSRS-L3* se observaron mayoritariamente defectos en el desarrollo del gineceo que afectaban principalmente a la forma y longitud del estilo, el cual se reducía y no se elongaba como en los frutos silvestres. La forma general de los frutos parecía más ancha y con los extremos romos en las líneas donde los defectos fenotípicos fueron más débiles (Fig. C2.12 A, B, categoría 1) o frutos más cortos que los silvestres, más anchos, especialmente en el extremo apical, y con una superficie del ovario irregular (Fig. C2.12 A, B, G, H, categoría 2) en las líneas con defectos más severos. Cuando se observaban lateralmente los frutos 35S::*NbSRS-L3* en la categoría 2 se distinguía como las valvas se elongaban hasta alcanzar el mismo nivel que el estigma y el estilo y le daban una morfología rectangular al fruto en su parte apical, en lugar de la forma apuntada típica de los frutos silvestres (Fig. C2.12 G), aunque no se observó ninguna formación ectópica de células de estilo ni otros cambios en la identidad celular (Fig. C2.12 H).

La sobreexpresión de *NbSRS-L2* causó alteraciones fenotípicas similares pero más severas en el desarrollo de los frutos. Aproximadamente un tercio de las líneas mostraron un fenotipo de similar a los de los sobreexpresores *NbSRS-L1* o *NbSRS-L3* más afectados ya descritos (Fig. C2.12A, B), pero la mayoría de las líneas transgénicas mostraron otros defectos más pronunciados que se subdividieron en dos categorías adicionales (Figuras C2.12 A, B, categorías 3 y 4). La categoría 3 la formaban frutos con ovarios cortos e inflados (Fig. C2.12 A). Las células de las valvas tenían morfologías similares a las silvestres, pero no estaban orientadas en paralelo al eje apical-basal de crecimiento del fruto, sino que formaban un ángulo con el réplum (Fig. C2.12 C, D). Además, los márgenes de valva en el extremo apical no estaban definidos, el estilo era corto y expandido lateralmente, y la demarcación entre el estilo y las valvas no era discernible (Fig. C2.12 C, D, J).

Por último, la categoría 4 comprendía alrededor del 40% de las líneas 35S::*NbSRS-L2*, que tenían frutos cortos de forma cónica, con zonas de estilo ectópico, formadas por células estriadas y columnares que se desarrollaban extensamente en los dominios laterales de la mitad apical de las valvas (Figuras C2.12 E, F), y células más

Resultados

cercanas al replum que conservaban la identidad de células de valva pero que se elongaban formando un ángulo más amplio con el eje apical-basal (Figura C2.12 E) (Gomariz-Fernández et al., 2017).

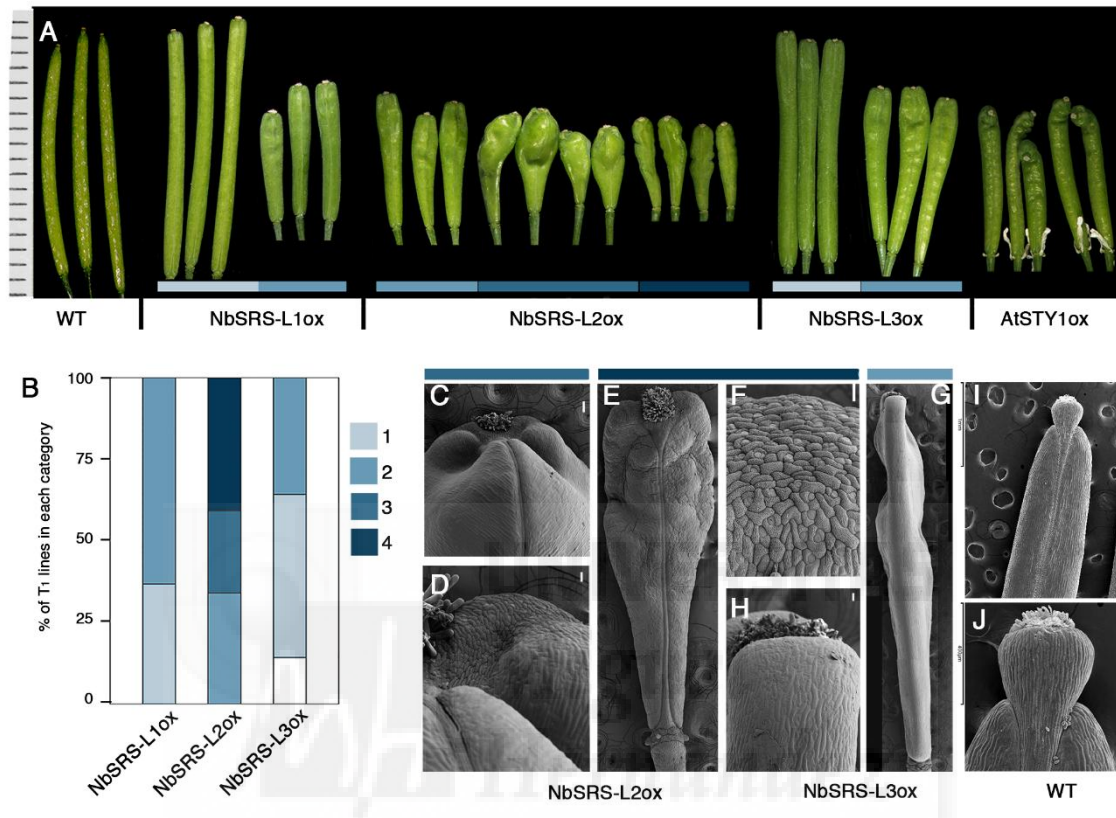


Figura C2.12. Fenotipos de líneas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan los genes *NbSRS-L*. (A) Se muestran entre tres y cinco frutos de una sola planta representativa de las diferentes categorías fenotípicas y genotipos. Los frutos AtSTYox pertenecen a una línea transgénica obtenida del laboratorio de E. Sundberg (Kuusk et al., 2002). (B) Relación de las diferentes categorías fenotípicas entre las líneas transgénicas T1 obtenidas para cada construcción, donde 1 (azul claro) representa el fenotipo más débil y 4 (azul oscuro) el fenotipo más fuerte. El color blanco corresponde a las plantas que no muestran diferencias notables respecto a los frutos silvestres. (C-J) Micrografías electrónicas de barrido de frutos de genotipos y categorías seleccionadas. (C, D) Frutos de las líneas 35S::NbSRS-L2 en la categoría 3. (C) Parte apical del fruto. (D) Detalle del área estilo/valva. (E) Fruto de una línea 35S::NbSRS-L2 en la categoría 4. (F) Detalle de la parte apical del fruto mostrada en (E). (G) Vista lateral de un fruto 35S::NbSRS-L3 en la categoría 2. (H) Detalle de las células de valva de la zona apical del fruto mostrado en el panel (G). (I) Fruto silvestre. (J) Detalle del dominio apical, donde la demarcación del estigma, el estilo y las válvas se ve claramente. Escala en (C-G): 50 μ m. (Tomada de Gomariz-Fernández et al., 2017).

El conjunto de estos resultados parecían indicar que los tres factores de transcripción SHI/STY/SRS de *N. benthamiana* tenían propiedades moleculares similares entre ellos y también, al menos, a los factores STY1 y STY2 de *Arabidopsis*, a pesar de la alta divergencia en sus secuencias fuera de los dominios RING e IGGH.

De igual modo, se generaron y examinaron 30 líneas de plantas T1 que sobreexpresaban el gen *EcSRS-L* en fondo silvestre. Sin embargo, la sobreexpresión de *EcSRS-L* no fue capaz de producir ningún efecto fenotípico en el fondo silvestre (Fig. C2.13), de igual manera que ocurría cuando se sobreexpresaba en fondo mutante *stylsty2* (Fig. C2.11) (Gomariz-Fernández et al., 2017).



Figura C2.13. Fenotipo en frutos de plantas transgénicas *EcSRS-L* en fondo silvestre *Arabidopsis thaliana*. Fotos tomadas a la lupa (Escala=1cm). Vista global de los frutos. (Tomada de Gomariz-Fernández et al., (2017); imágenes suplementarias).

2.4. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).

Para conocer si los genes *SHI/STY/SRS* en *N. benthamiana* y *E. californica* desempeñan una función en el desarrollo del gineceo, y más específicamente en la diferenciación de los tejidos apicales del carpelo, se estudió la función de estos genes usando el Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS) para reducir sus niveles de transcritos en estas especies. Este método permite una disminución transitoria en la expresión de un gen específico por medio de virus de plantas modificados, que dirigen la degradación directa de los mRNAs endógenos y ha sido utilizado con éxito en *N.*

Resultados

Benthamiana, *E. californica* y otras especies (Constantin et al., 2004; Hileman et al., 2005; Wege et al., 2007).

Para *N. benthamiana* se generaron diferentes construcciones en el vector TRV2 diseñadas para silenciar específicamente cada gen *NbSRS-L*, la combinación de dos de ellos o los tres simultáneamente. Se inocularon doce plantas con cada construcción y se caracterizaron fenotípicamente entre 5 y 20 flores de cada planta (Tabla C2.1).

Las flores silvestres de *Nicotiana benthamiana* en anthesis están formadas por un primer verticilo de cinco sépalos, un segundo verticilo de cinco pétalos blancos que forman una corola larga de forma tubular, un tercer verticilo de cinco estambres con filamentos largos que están fusionados a los pétalos, y un gineceo bicarpelar situado en el centro del cuarto verticilo. El pistilo maduro de *Nicotiana benthamiana* comprende un ovario bilocular corto con una placenta central y un estilo muy largo y fino, de alrededor de 3cm de longitud, que acaba en un estigma redondo (Fig C2.14 A-D) (Fourquin y Ferrándiz, 2014).

En las plantas inoculadas con el vector TRV2-NbSRS-L1, el 64% de las flores mostraban un fenotipo anormal en la parte apical del pistilo. La longitud del estilo era menor, y esto hacía que en una vista distal de la flor en anthesis, el estigma no fuera visible a la altura de las anteras (Fig. C2.14E). El estigma, y en algunos casos la parte apical del estilo, no se fusionaba correctamente y aparecían divididos en la parte apical y en ocasiones formando una especie de rizo (Fig. C2.14 E-H; Tabla C2.1). Además, al observar la superficie del estigma en el microscopio electrónico de barrido (SEM) se apreciaba un desarrollo anormal de la papilas estigmáticas (Fig.C2.15 O), presencia de tejido estigmático ectópico en las zonas del estilo no fusionadas y una morfología diferente a la silvestre (Fig. C2.15 N, P). El tratamiento con TRV2-NbSRS-L2 y TRV2-NbSRS-L3 produjo menos flores con fenotipo anormal, 15% y 22% respectivamente (Tabla C2.1). En ambos casos se observó una reducción en la longitud del estilo, por lo que el estigma no era capaz de alcanzar la altura de las anteras en la flor en anthesis (Fig. C2.14 I-L y Fig C2.14 M-P). Además, de nuevo el estigma se presentaba deformado y con ligeros problemas de fusión en algunos casos. El tratamiento con TRV2-NbSRS-L1 y TRV2-NbSRS-L3 simultáneamente, es el que obtuvo el mayor porcentaje de flores con fenotipo anormal, 70% (Tabla C2.1). Estas flores, además de los fenotipos reportados para TRV2-NbSRS-L1 y TRV2-NbSRS-L3 por separado, mostraban

alteraciones en otros órganos florales, como diferencias en el número de sépalos, pétalos, valvas, estilos y estigmas (Fig. C2.14 Q-U). Al observarlas en el microscopio electrónico de barrido (SEM), se vio que las papilas estigmáticas presentaban alteraciones severas (Fig. C2.15 G, K) y presencia de tejido estigmático ectópico en las zonas del estilo no fusionadas (Fig. C2.15 J). Cuando se inoculó TRV2-NbSRS-L1, TRV2-NbSRS-L2 y TRV2-NbSRS-L3 de forma conjunta se obtuvo un 64% de flores con fenotipo diferente al silvestre, que resultó ser el mismo porcentaje que con el tratamiento de TRV2-NbSRS-L1 de forma individual (Tabla C2.1). El fenotipo que más se presentaba al inducir el silenciamiento de los tres genes *NbSRS-L* en *N. benthamiana* fue la reducción de la longitud del estilo y la falta de fusión en el estigma y en la parte más apical del estilo, aunque esta última con menor frecuencia (Fig. C2.14V-Y).

En resumen, observamos que los tratamientos de VIGS produjeron defectos fenotípicos severos en el desarrollo del estilo y el estigma, así como de la corola. Estos fenotipos recordaban a los reportados para el mutante *sty1 sty2* y combinaciones mutantes de orden superior en miembros de esta familia de *Arabidopsis thaliana* (Kuusk et al., 2002, 2006).

Tabla C2.1. Frecuencias obtenidas tras el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en plantas de *Nicotiana benthamiana* para cada una de las construcciones utilizadas.

Construcción VIGS de <i>N. benthamiana</i>	Nº de plantas inoculadas (muertas)	Nº de plantas con fenotipo de silenciamiento	Nº de flores/planta observada	Nº de flores/planta con fenotipo de silenciamiento en flor	Nº de flores totales con fenotipo de silenciamiento	% de flores con fenotipo de silenciamiento
TRV2:NbSRS-L1	12 (5)	7	10-20	4-14	82/128	64%
TRV2:NbSRS-L2	12 (2)	8	7-20	1-6	22/143	15%
TRV2:NbSRS-L3	12 (2)	9	5-20	2-8	30/137	22%
TRV2:NbSRS-L1/ TRV2:NbSRS-L3	12 (3)	9	15-20	8-18	120/172	70%
TRV2:NbSRS-L1/ TRV2:NbSRS-L2/ TRV2:NbSRS-L3	12(2)	10	3-20	2-14	63/99	64%



Figura C2.14. Fenotipos de flores en antesis de plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con pTRV2-NbSRS-L1 (E-H), con pTRV2-NbSRS-L2 (I-L), pTRV2-NbSRS-L3 (M-P), pTRV2-NbSRS-L1/pTRV2-NbSRS-L3 (Q-U) y pTRV2-NbSRS-L1/pTRV2-NbSRS-L2/pTRV2-NbSRS-L3 (V-Y). (A-D) corresponden a flores silvestres en antesis de *Nicotiana benthamiana*. Los fenotipos causados por el silenciamiento de los genes NbSRS-L en plantas de *Nicotiana benthamiana* comprenden pistilos con estilos cortos y estigmas deformados que no alcanzan la corola y, por tanto, no son visibles en el nivel de los estambres (E-F, I-P, V-W), estilos y estigmas no fusionados (G-H, S-U, X-Y), diferencias en el número y morfología de los sépalos (K, Q) y a veces diferencias en el número de estilos (T), estigmas (U) y valvas (R). (E=500µm).

Resultados

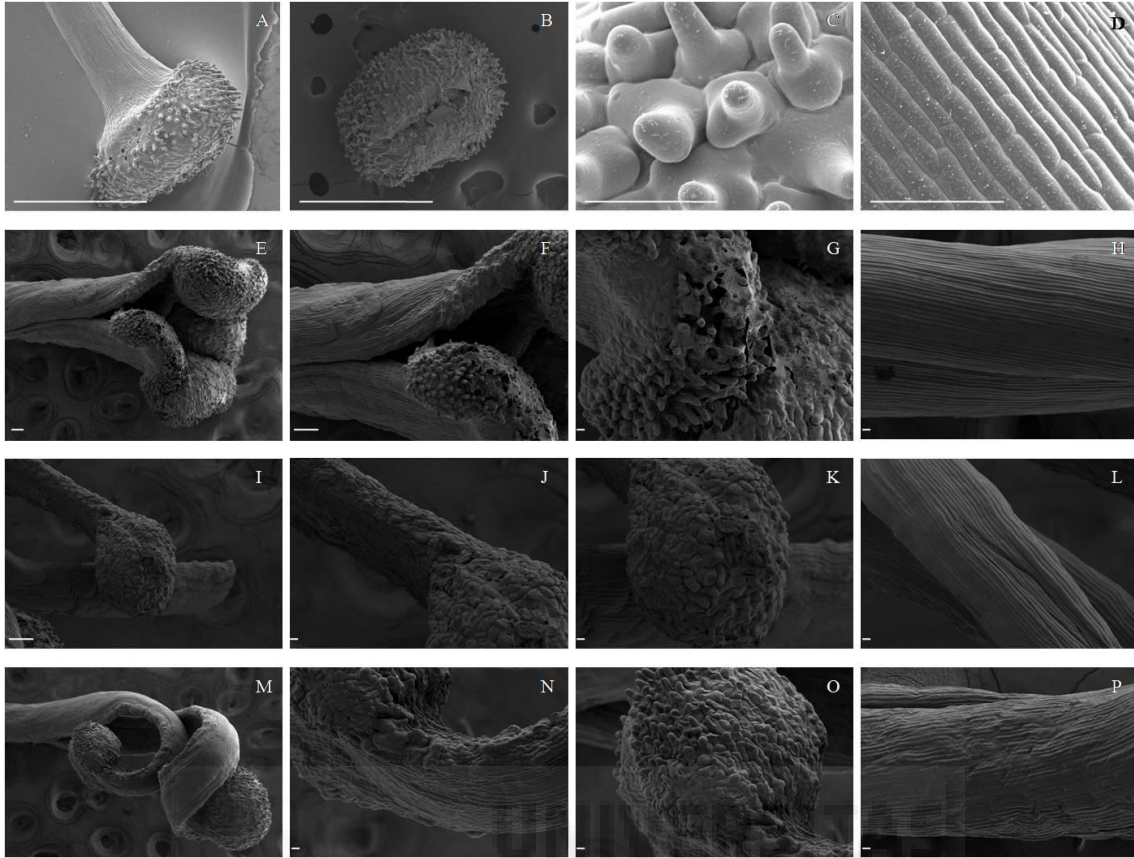


Figura C2.15. Micrografías tomadas al microscopio electrónico de barrido (SEM) de la región apical de pistilos de *N. benthamiana* en anthesis. (A) estigma y estilo silvestre (E=600µm), (B) estigma silvestre completamente cubierto por papilas estigmáticas (E=700µm), (C) detalle de las papilas estigmáticas en una flor silvestre (E=60µm), (D) células de estilo silvestre (E=60µm), (E-F,I) estigma y estilo de flores en anthesis de plantas inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L3 (E=100µm), (G,K) detalle de las papilas estigmáticas de flores en anthesis de plantas inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L3, donde se aprecia cómo éstas estaban notablemente afectadas (E=20µm), (H,L) células de estilo de flores en anthesis de plantas inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L3, no se observa límite entre células (E=20µm), (J) detalle de estigma y estilo de flor en anthesis de plantas inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L3, hay presencia de tejido estigmático ectópico en el estilo (E=20µm), (M) estigma y estilo de flor en anthesis procedente de planta inoculada con TRV2-NbSRS-L1 (E=100µm), (N-O) detalle del estilo y estigma de flor en anthesis procedente de planta inoculada con TRV2-NbSRS-L1, presencia de tejido estigmático ectópico en el estilo (E=20µm), (P) detalle de células de estilo de flor en anthesis procedente de planta inoculada con TRV2-NbSRS-L1 donde no se observaba el límite entre células (E=20µm).

Para evaluar la eficiencia y la especificidad de cada tratamiento, se midieron también los niveles de expresión de *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2* y *NbSRS-L3* mediante RT-qPCR en flores procedentes de tres plantas tratadas para cada tratamiento que mostraban fenotipos relacionados con la inactivación.

En las plantas tratadas con NbSRS-L1-VIGS, *NbSRS-L1* se silenciaba notablemente mientras que *NbSRS-L2* también aparecía ligeramente silenciado. Sin embargo, sorprendentemente, y a pesar de que el fragmento utilizado para realizar la construcción TRV2-NbSRS-L1 pretendía dirigir específicamente la inactivación de *NbSRS-L1*, *NbSRS-L3* presentaba un nivel de silenciamiento mucho más acusado que el propio *NbSRS-L1* (Tabla C2.1, Fig. C2.16).

En las flores NbSRS-L2-VIGS, una de las muestras no presentaba silenciamiento para *NbSRS-L2*, mientras en esa misma muestra tanto *NbSRS-L1* como *NbSRS-L3* sí se silenciaban. En las otras dos muestras se observaba un fuerte silenciamiento de *NbSRS-L2*, pero de igual intensidad que el de *NbSRS-L1* y menor que el de *NbSRS-L3* (Tabla C2.1, Fig. C2.17).

Por otro lado, en las flores NbSRS-L3-VIGS, *NbSRS-L3* presentaba un silenciamiento muy acusado. *NbSRS-L1* también estaba silenciado, aunque en menor medida, mientras que *NbSRS-L2* no presentaba silenciamiento (Tabla C2.1, Fig. C2.18). Los resultados parecían sugerir que la construcción NbSRS-L3-VIGS tampoco era totalmente específica para el gen *NbSRS-L3*, aunque su especificidad podría ser mayor que en las otras dos construcciones mencionadas.

Al medir los niveles de expresión mediante RT-qPCR, se observó que tanto el gen *NbSRS-L1* como *NbSRS-L3* aparecían silenciados, pero en menor medida que cuando se silenciaban ambos genes por separado. (Fig. C2.19).

También se quiso estudiar qué ocurriría si se trataba de silenciar mediante VIGS los tres genes *NbSRS-L* de *Nicotiana benthamiana* simultáneamente. Además, en el análisis de los niveles de expresión, *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2* y *NbSRS-L3* aparecían mucho menos silenciados que cuando se realizaba el ensayo de VIGS de cada uno de estos genes de forma individual (Fig. C2.20).

En general, se observó que las construcciones TRV2-NbSRS-L1, TRV2-NbSRS-L2, y TRV2-NbSRS-L3 no eran completamente específicas dirigiendo el silenciamiento de los respectivos genes.

Resultados

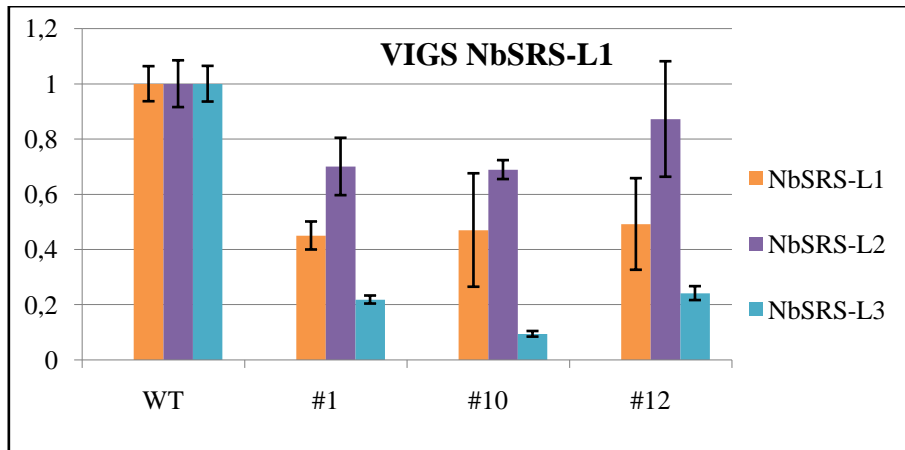


Figura C2.16. Nivel de expresión de los genes diana *NbSRS-L* en las líneas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con TRV2-NbSRS-L1. Se estudió la expresión de los genes *NbSRS-L1* (naranja), *NbSRS-L2* (violeta) y *NbSRS-L3* (azul).

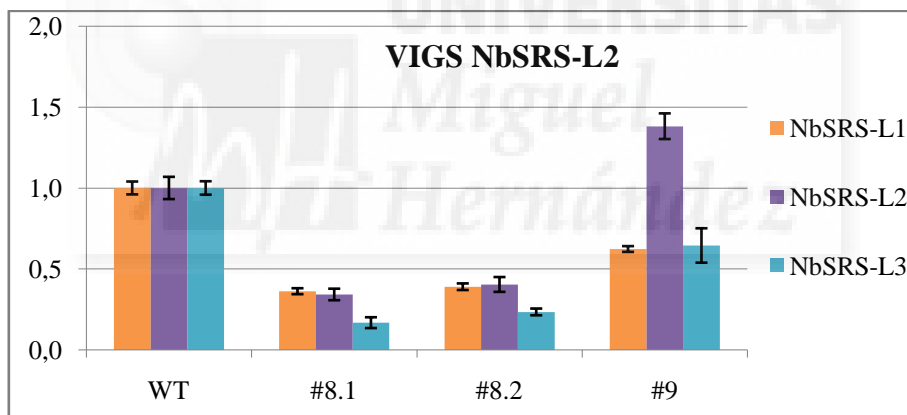


Figura C2.17. Nivel de expresión de los genes diana *NbSRS-L* en las líneas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con TRV2-NbSRS-L2. Se estudió la expresión de los genes *NbSRS-L1* (naranja), *NbSRS-L2* (violeta) y *NbSRS-L3* (azul).

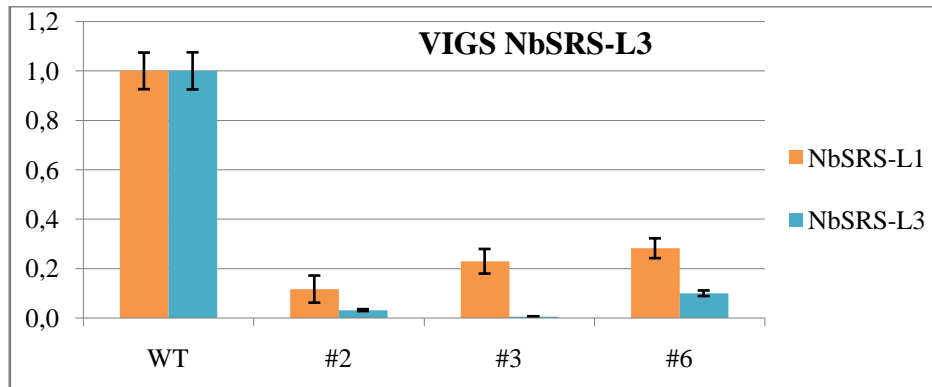


Figura C2.18. Nivel de expresión de los genes diana *NbSRS-L* en las líneas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con TRV2-NbSRS-L3. Se estudió la expresión de los genes *NbSRS-L1* (naranja) y *NbSRS-L3* (azul). También se estudió la expresión del gen *NbSRS-L2* en estas muestras, pero por problemas técnicos durante el ensayo no se muestra en esta figura.

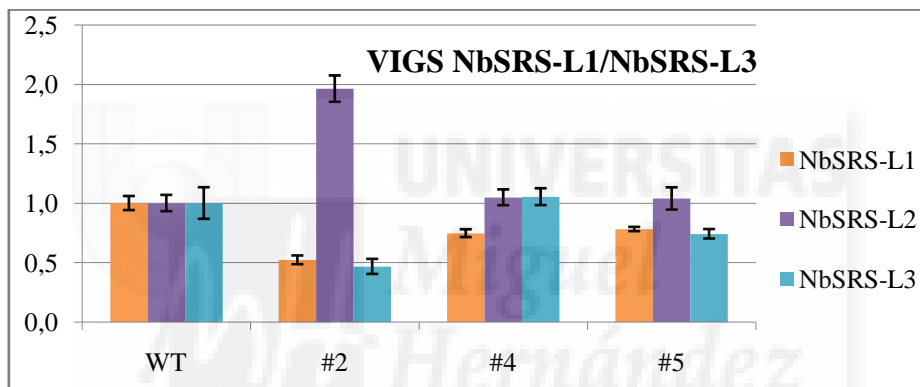


Figura C2.19. Nivel de expresión de los genes diana *NbSRS-L* en las líneas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L3. Se estudió la expresión de los genes *NbSRS-L1* (naranja), *NbSRS-L2* (violeta) y *NbSRS-L3* (azul).

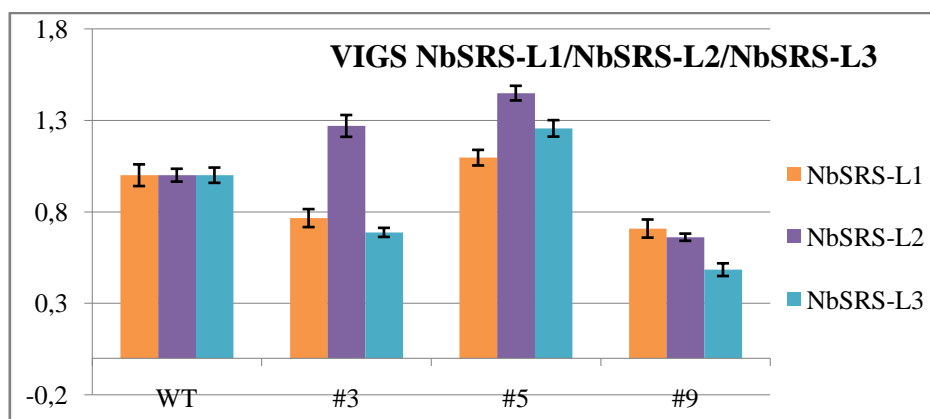


Figura C2.20. Nivel de expresión de los genes diana *NbSRS-L* en las líneas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con TRV2-NbSRS-L1/TRV2-NbSRS-L2/TRV2-NbSRS-L3. Se estudió la expresión de los genes *NbSRS-L1* (naranja), *NbSRS-L2* (violeta) y *NbSRS-L3* (azul).

Resultados

En el caso de *Eschscholzia californica* se generaron dos construcciones TRV diferentes utilizando dos fragmentos distintos de la secuencia codificante del gen *EcSRS-L* identificado.

Se inocularon 120 plántulas con cada una de las construcciones pero en ningún caso se obtuvo ningún fenotipo anormal (Fig. C2.21). Paralelamente a cada experimento se inocularon plantas con TRV2-EcPDS como control positivo. El gen *EcPDS* produce la degradación de las clorofilas y en las plantas donde la inoculación tiene éxito se espera que se produzca el blanqueamiento de las plántulas. En el 68% de las plántulas inoculadas con TRV2-EcPDS se observó blanqueamiento, por lo que descartamos que la ausencia de flores de *Eschscholzia californica* con fenotipo anormal se debiera a un problema técnico durante el desarrollo del ensayo VIGS. Además, se evaluó la eficiencia y la especificidad del tratamiento midiendo los niveles de expresión de *EcSRS-L* mediante RT-qPCR en flores procedentes de cuatro plantas tratadas tomadas aleatoriamente. En tres de estas plantas se observó como la expresión del gen *EcSRS-L* se veía notablemente reducida (Fig. C2.22).



Figura C2.21. Fenotipos de gineceos de flores en anthesis de plantas de *Eschscholzia californica* inoculadas con TRV2-EcSRS-L.

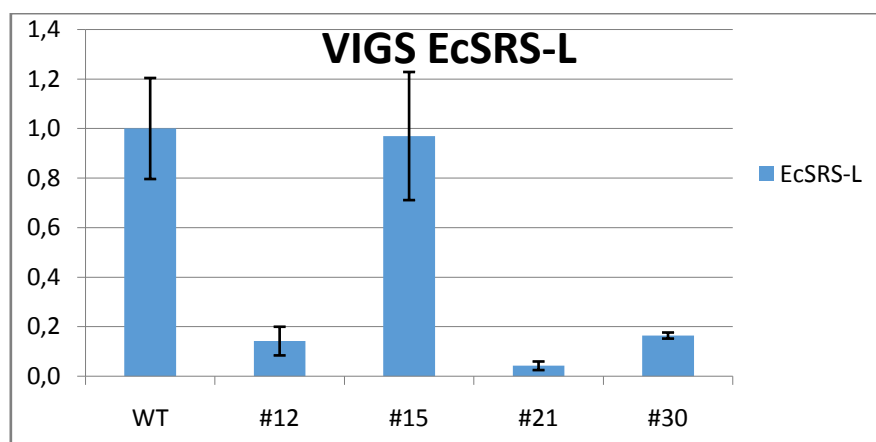


Figura C2.22. Nivel de expresión del gen diana *EcSRS-L* en las líneas de *Eschscholzia californica* inoculadas con TRV2-*EcSRS-L*. Se estudió la expresión del gen *EcSRS-L* (azul).

2.5. Sobreexpresión de los genes *NbSHI/STY/SRS* en *Nicotiana benthamiana*.

Siguiendo con el estudio de la conservación funcional de los genes de la familia SHI/STY/SRS a lo largo de la evolución de las angiospermas, se planteó conocer el efecto de la sobreexpresión de los genes *NbSRS-L* estudiados en este trabajo en *Nicotiana benthamiana*. Para realizar este estudio se generaron plantas transgénicas en las que se introdujeron las construcciones 35S::*NbSRS-L1* y 35S::*NbSRS-L2* previamente utilizadas para la expresión heteróloga en *Arabidopsis*. De nuevo, las plantas fueron generadas por Verónica Sánchez Gerschon como parte de su Trabajo Fin de Máster, con mi colaboración y bajo mi codirección.

Las plantas transgénicas se generaron mediante cultivo in vitro de *N. benthamiana* y la posterior transformación de sus explantes utilizando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que portaban las construcciones 35S::*NbSRS-L1* y 35S::*NbSRS-L2*.

Se obtuvieron 23 líneas transgénicas independientes para 35S::*NbSRS-L1* y 9 para 35S::*NbSRS-L2*, aproximadamente la mitad de estas líneas mostraron cambios fenotípicos notables en la morfología del gineceo (Fig. C2.23A, E, J). Tanto las plantas 35S::*NbSRS-L1* como las 35S::*NbSRS-L2* mostraron fenotipos similares, aunque, de

Resultados

igual forma que se observó en *Arabidopsis*, la expresión constitutiva de *NbSRS-L2* produjo efectos más severos (Gomariz-Fernández et al., 2017).

Los pistilos de las plantas que sobreexpresaban *NbSRS-L1* presentaban una morfología de estigma y estilo normal, sólo que más corto (Figura C2.23 E). Aunque la demarcación entre el estilo y el ovario estaba definida de igual manera que en el gineceo silvestre (Fig. C2.23 B), sí se mostraba una transición gradual entre la zona alargada con células columnares típicas del estilo y las células pequeñas casi isodiamétricas del ovario (Fig. C2.23 E-G). En relación al margen de valva, en contraste con los pistilos silvestres que están poco definidos y adyacentes, en las plantas 35S::*NbSRS-L1* se presentaban más pronunciados y separados por varias filas de células que formaban crestas de células estigmáticas en la parte superior del ovario (Fig. C2.23 E-H). En algunas ocasiones, de estas crestas surgían pequeñas protuberancias cilíndricas que recordaban a estilos y que terminaban en un estigma redondeado (Fig. C2.23 F). En cuanto al ginóforo, éste era alargado y se mostraba claramente separado del ovario (Fig. C2.23 D, I) (Gomariz-Fernández et al., 2017).



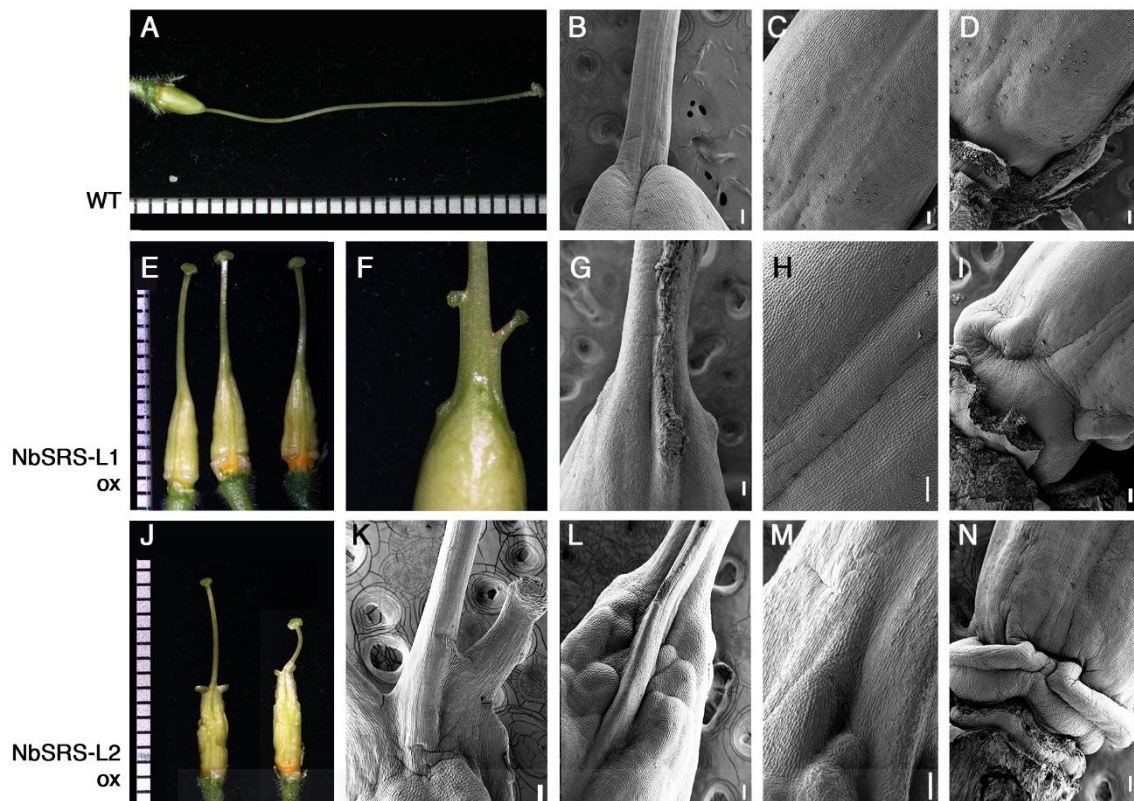


Figura C2.23. Fenotipos de los pistilos de líneas transgénicas de *N. benthamiana* que sobreexpresan los genes *NbSRS-L1* o *NbSRS-L2*. (A–D) Pistilos silvestres. (A) Vista lateral. (B–D) Micrografías electrónicas de barrido de las distintas partes del pistilo silvestre. (B) Interfase estilo-ovario. (C) Vista parcial del ovario. (D) Vista del ginóforo en el extremo basal del ovario. (E–I) Pistilos 35S::*NbSRS-L1*. (E) Tres pistilos de diferentes plantas transgénicas que muestran fenotipos similares. (F) Detalle de la interfase ovario-estilo. Se pueden observar las pequeñas protuberancias de tejido estigmático. (G–I) Micrografías electrónicas de barrido de los pistilos 35S::*NbSRS-L1*. (G) Detalle de la interfase ovario-estilo. (H) Vista media del ovario. (I) Vista del ginóforo alargado del pistilo 35S::*NbSRS-L1*. (J–N) Pistilos 35S::*NbSRS-L2*. (J) Dos pistilos de diferentes plantas transgénicas que muestran fenotipos similares. (K–N) Micrografías de pistilos 35S::*NbSRS-L2*. (K) Detalle de la interfase ovario-estilo. (L) Detalle de la interfase ovario-estilo de otro pistilo diferente. (M) Detalle de otra interfase ovario-estilo donde se observan células de estilo y ovario mezcladas. (N) Vista de un ginóforo, donde se observa el desarrollo anormal del tejido. (E=100 μ m) (Tomada de Gomariz-Fernández et al., 2017).

Por otro lado, las líneas 35S::*NbSRS-L2* mostraban fenotipos similares a los reportados para las líneas 35S::*NbSRS-L1*, sólo que más acusados. La zona de unión entre el estilo y el ovario mostraba fuertes alteraciones y más frecuentemente dieron lugar a la aparición de estilos ectópicos (Fig. C2.23 J-L). La superficie del ovario era irregular y presentaba un crecimiento desigual, con dominios entremezclados de células con identidad de estilo y ovario (Fig. C2.23 J, L, M). También el ginóforo aparecía más

Resultados

pronunciado y estaba separado del ovario por una protuberancia de tejido (Fig. C2.23 N) (Gomariz-Fernández et al., 2017).

Por otro lado, la sobreexpresión de los genes *NbSRS-L* no sólo causó modificaciones en la morfología del gineceo, sino que también provocó fuertes alteraciones en el desarrollo de la hoja, especialmente en las líneas 35S::*NbSRS-L2*. Las hojas de las plantas transgénicas eran más oscuras que las silvestres y presentaban restricciones en el crecimiento marginal, curvándose fuertemente hacia el envés y dando lugar a hojas con aspecto de capucha (Fig. C2.24) (Gomariz-Fernández et al., 2017).

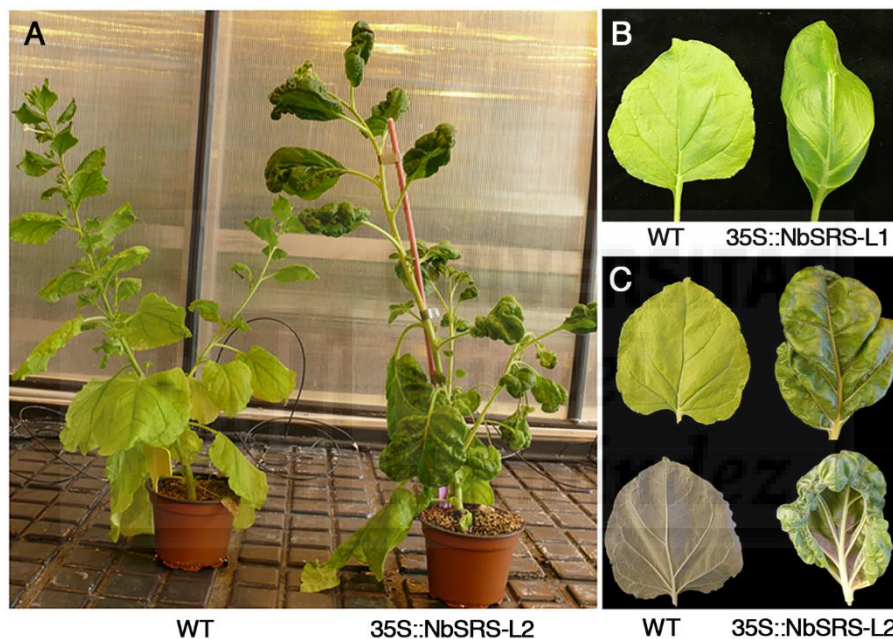


Figura C2.24. Sobreexpresión de los genes *NbSRS-L* en *N. benthamiana*. (A) Plantas silvestre (izquierda) y 35S::*NbSRS-L2* (derecha) de edad similar. (B) Vista adaxial de una hoja silvestre completamente expandida (izquierda) y una hoja 35S::*NbSRS-L1* (derecha). (C) Vistas adaxial (arriba) y abaxial (abajo) de una hoja silvestre (izquierda) y una hoja 35S::*NbSRS-L2* (derecha) (Tomada de Gomariz-Fernández et al., 2017).

2.6. Estudio de la posible formación del complejo proteico STY-CRC-NGA en *Nicotiana benthamiana* (Nb) y *Eschscholzia californica* (Ec).

Se ha reportado mediante ensayos de Bi/TriFC que CRC interacciona simultáneamente con STY1 y NGA3, y todo esto sugiere que se estaría formando un complejo transcripcional entre los factores STY, CRC y NGA que estaría dirigiendo la formación del estilo (Navarrete-Gómez 2011). Nuestra hipótesis es que este complejo podría estar formándose en otras especies de angiospermas, donde ejercería funciones equivalentes.

Para comprobar si los factores SHI/STY/SRS que habíamos identificado en *Nicotiana* o *Eschscholzia* también podían interactuar con los homólogos de NGA y CRC, se realizó un ensayo de interacción proteína-proteína *in vivo* mediante complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC). Este experimento está basado en la reconstitución de la fluorescencia de la proteína YFP mediada por la interacción física de dos proteínas no fluorescentes, cada una de las cuales lleva fusionadas las mitades de la YFP. Si las dos proteínas interactúan físicamente la proximidad de los dos fragmentos de la YFP restaurará la fluorescencia de la molécula, que puede detectarse mediante microscopía confocal.

Para llevar a cabo el ensayo se clonaron las regiones codificantes completas de los genes *NbSRS-L1*, *NbSRS-L2* y *NbSRS-L3* de *Nicotiana benthamiana* y *EcSRS-L* de *Eschscholzia californica*, obtenidas anteriormente de la forma descrita, para generar una fusión traduccional en posición C-terminal con cada mitad de la proteína YFP (Belda-Palazon et al. 2012). De la misma forma, se clonaron también las regiones codificantes completas de los genes *NbNGAa*, *NbNGAb* y *EcNGA* (Fourquin y Ferrándiz, 2014), *NbCRC* (Lee et al., 2005) y *EcCRC* (Orashakova et al., 2009). Con las construcciones obtenidas en distintas combinaciones se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* que, tras 3 días, fueron observadas al microscopio confocal.

Para el ensayo de interacciones se utilizó como control positivo una interacción de factores de transcripción de la familia MADS de *Arabidopsis*, FRUITFULL (FUL) y SUPPRESSOR-OF-OVEREXPRESSION-OF-CONSTANS 1 (SOC1), que ya ha sido demostrada por varios métodos (de Folter et al. 2005), mientras que como control

Resultados

negativo, se utilizó SOC1 con AGAMOUS (AG), otro factor de la familia MADS con el que se ha demostrado que no interactúa físicamente (Balanzá et al. 2014; de Folter et al. 2005; Immink et al. 2002a). También se agroinfiltraron las construcciones correspondientes a las fusiones de los factores que estudiamos con la mitad YFP^N, ya que este dominio corresponde al fragmento de mayor tamaño de la proteína YFP y puede dar lugar a falsos positivos en algunos casos en los que pueda emitir autofluorescencia, debido a la conformación que toma al fusionarlo con la proteína de interés.

Para el ensayo de interacciones en *Nicotiana benthamiana* se estudiaron las proteínas NbCRC, NbNGAa, NbNGAb, NbSRS-L1, NbSRS-L2 y NbSRS-L3. Los controles negativos y positivos dieron el resultado esperado (Fig. C2.25) y por tanto se pudo realizar el ensayo de interacción en ambas direcciones, aunque para simplificar se indican sólo los resultados de las interacciones en una dirección. A continuación se realizaron los ensayos para detectar las posibles interacciones entre:

YFP^C-NbNGAa/YFP^N-NbCRC, YFP^C-NbNGAb/YFP^N-NbCRC,
YFP^C-NbCRC/YFP^N-NbSRS-L1, YFP^C-NbCRC/YFP^N-NbSRS-L2
e YFP^C-NbCRC/YFP^N-NbSRS-L3.

Todos los ensayos dieron resultados positivos (Fig. C2.26), indicando que es muy probable que se estén formando los heterodímeros NbCRC-NbNGA y NbCRC-NbSRS *in vivo* en *N. benthamiana*.

Paralelamente se realizó el mismo ensayo con las interacciones:

YFP^C-NbNGAa/YFP^N-NbSRS-L1, YFP^C-NbNGAb/YFP^N-NbSRS-L1,
YFP^C-NbNGAa/YFP^N-NbSRS-L2, YFP^C-NbNGAb/YFP^N-NbSRS-L2,
YFP^C-NbNGAa/YFP^N-NbSRS-L3 e YFP^C-NbNGAb/YFP^N-NbSRS-L3.

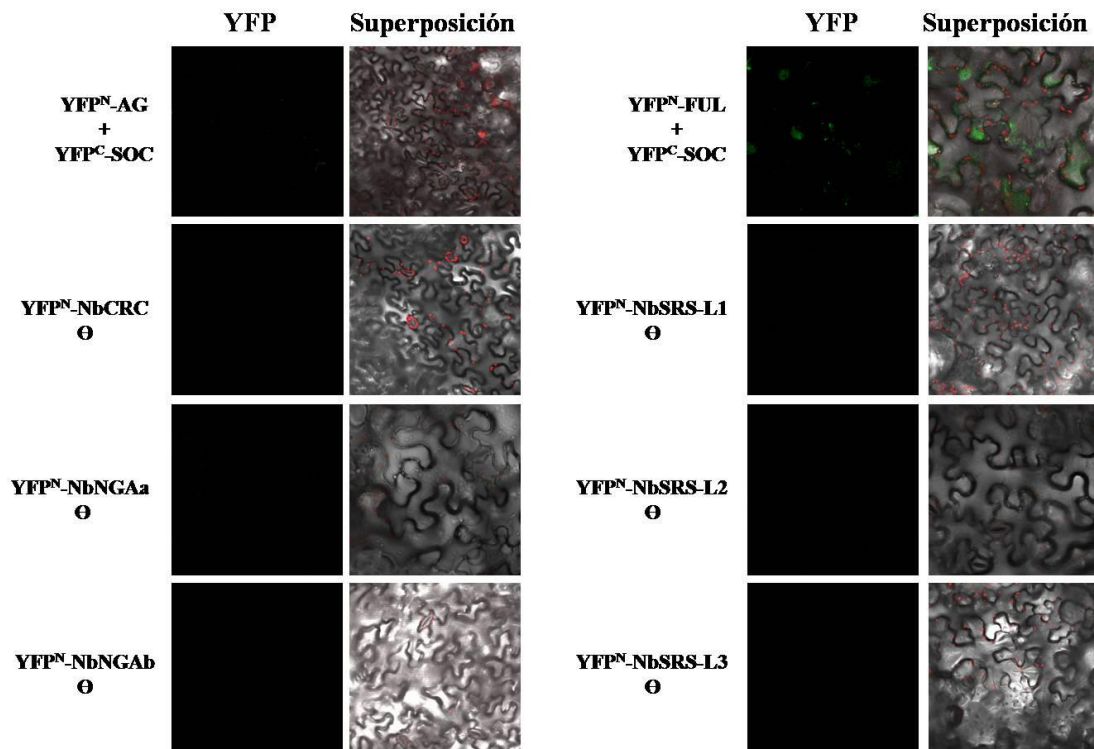


Figura C2.25. Controles utilizados en el estudio de la interacción proteína-proteína.

Todos estos ensayos dieron resultados negativos (Fig. C2.26), lo que podría indicar que los factores NbNGA y NbSRS-L no eran capaces de heterodimerizar en *N. benthamiana*, un resultado similar al obtenido con los factores homólogos de *Arabidopsis*. Sin embargo, cuando se realizó el ensayo con estas mismas interacciones pero añadiendo la proteína NbCRC al sistema mediante el control de un promotor constitutivo 35S pero sin fusionar a ningún otro dominio, sí se obtuvieron resultados positivos (Fig. C2.26). Estos resultados indicaban que en *N. Benthamiana*, NbCRC es capaz de formar heterodímeros con los factores NbNGA y NbSRS-L y que además su presencia es requerida para formar el trímero NbSRS-L-NbCRC-NbNGA, de manera análoga a lo que ocurre en *Arabidopsis thaliana* (Navarrete-Gómez 2011).

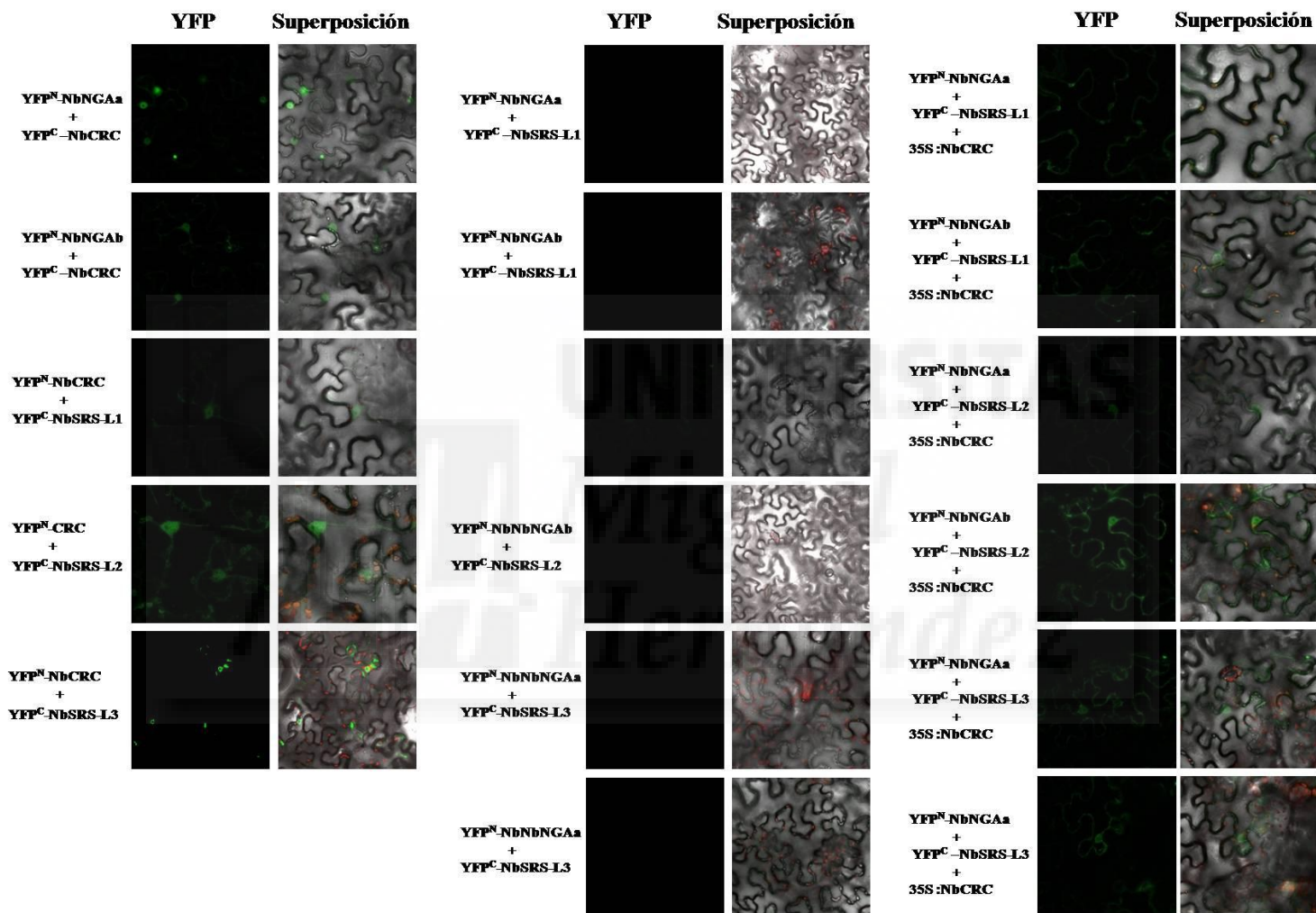


Figura C2.26. Estudio de la interacción proteína-proteína entre los factores de transcripción NbCRC, NbNGAa, NGAb, NbSRS-L1, NbSRS-L2 y NbSRS-L3 de la especie *Nicotiana benthamiana*.

Para el caso de *Eschscholzia californica* se realizó un ensayo de interacciones entre las proteínas EcCRC, EcNGA y EcSRS-L, utilizando los controles descritos anteriormente. Se obtuvo el resultado esperado en los controles negativos y positivos (Fig. C2.27) y por tanto se pudo realizar el ensayo de interacción en ambas direcciones, aunque en la figura C2.27 sólo se muestran los resultados en una dirección.

El ensayo de BiFC en *Eschscholzia californica* se realizó para detectar las posibles interacciones entre:

YFP^C-EcNGA/YFP^N-EcCRC,

YFP^C-EcSRS-L/YFP^N-EcNGA

e YFP^C-EcSRS-L/YFP^N-EcCRC.

Los ensayos de interacción entre YFP^C-EcNGA/YFP^N-EcCRC, YFP^C-EcSRS-L/YFP^N-EcNGA resultaron positivos mientras que YFP^C-EcSRS-L/YFP^N-EcCRC no eran capaces de restaurar la fluorescencia (Fig. C2.27). Estos resultados podrían indicar que en *Eschscholzia californica* se estaría formando un heterodímero entre las proteínas NGA-CRC y NGA-SRS pero, sin embargo, no se estaría formando el heterodímero CRC-SRS. Paralelamente se probó de nuevo la interacción YFP^C-EcSRS-L/YFP^N-EcCRC pero introduciendo en el sistema la proteína EcNGA bajo el control de un promotor constitutivo y esta vez sin fusionar a ningún otro dominio, ya que parecía que esta proteína era capaz de interactuar con las otras dos. En este ensayo sí se observaron resultados positivos (Fig. C2.27), lo que podría estar indicando que en *Eschscholzia californica* también se estaría formando el trímero EcCRC-EcNGA-EcSRS-L pero en este caso el interactor que estaría actuando como nexo del complejo proteico sería EcNGA, a diferencia de lo reportado en *Arabidopsis thaliana* por Navarrete-Gómez, (2011) y los resultados obtenidos en este estudio para *Nicotiana benthamiana*, donde el papel de nexo de unión del complejo recaería sobre la proteína CRC.

Resultados

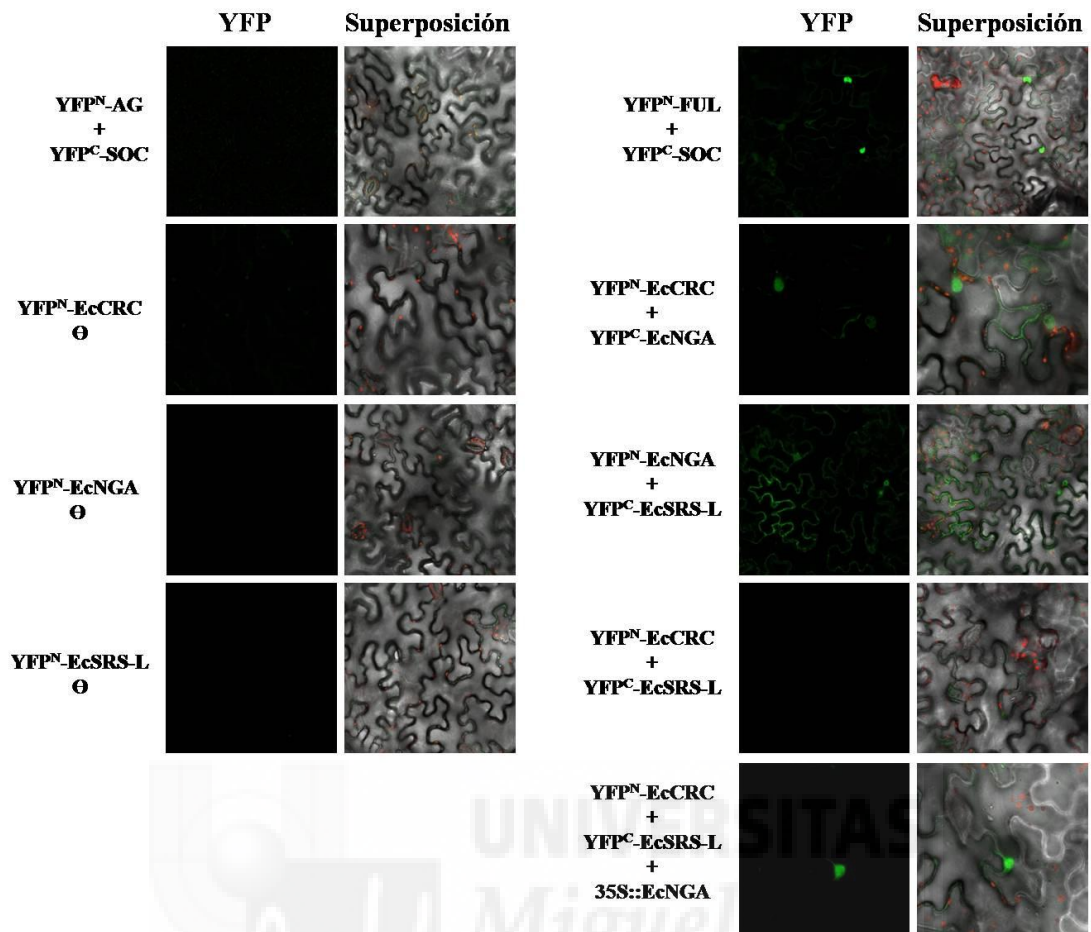


Figura C2.27. Estudio de la interacción proteína-proteína entre los factores de transcripción EcCRC, EcNGA y EcSRS-L de la especie *Eschscholzia californica*.

2.7. Puesta a punto de un sistema de determinación de dianas directas de factores de transcripción en especies no modelo difícilmente transformables.

2.7.1. Comparación genes diana.

Para entender cómo se estructuran las redes reguladoras de genes, es crucial conocer cuáles son las dianas directas de los factores de transcripción. Si además queremos estudiar la evolución de dichas redes, sería de gran utilidad poder comparar las dianas de dos factores ortólogos de diferentes especies. Si se dispone de líneas transgénicas que expresen versiones etiquetadas y/o inducibles del factor de transcripción de interés, es posible utilizarlas para realizar análisis de transcriptómica y de unión a DNA mediante inmuno precipitación de cromatina para obtener listas de dianas directas con un alto nivel de confianza. Sin embargo, la generación de líneas transgénicas puede ser un factor limitante en especies no modelo. En estos casos, se suele recurrir a métodos indirectos, como el análisis de interacciones entre factores de transcripción y promotores concretos en sistemas heterólogos (Hellens et al, 2005), aunque estos métodos no son útiles para aproximaciones no basadas en genes candidatos. Una alternativa que permite la identificación del conjunto de dianas directas de un determinado factor ha sido propuesta recientemente (Bargmann et al., 2013). El método, denominado TARGET (por *Transient Assay Reporting Genome-wide Effects of Transcription factors*), consiste en utilizar la transformación transitoria de protoplastos con una construcción en la que el factor de transcripción de interés está fusionado a un dominio receptor de glucocorticoides (GR), de modo que la traslocación al núcleo del factor-GR puede inducirse por tratamiento con dexametasona (dexa), un ligando del dominio GR (Bargmann et al., 2013).

2.7.2. Búsqueda de dianas de *EcSRS-L* adaptando el sistema TARGET.

Para profundizar con el estudio evolutivo de la conservación funcional de los factores de transcripción NGA, STY y CRC en otras especies, nos planteamos identificar el conjunto de dianas directas de *EcSRS-L* en la especie no transformable *E. californica* a partir de protoplastos derivados de esta especie, utilizando la técnica descrita por Bargmann et al., (2013).

Esta técnica utiliza el vector pBeaconRFP_GR para la transfección. Este vector expresa el factor de transcripción de interés fusionado al receptor de glucocorticoides (GR), permitiendo la entrada controlada del conjunto quimérico GR-factor de transcripción dentro del núcleo mediante la adición de dexametasona (Schena y Yamamoto, 1988). Además, el vector contiene un casete de expresión separado con un marcador de selección fluorescente positivo (proteína fluorescente roja, RFP). De esta manera, la utilización de este vector permite seleccionar mediante separación celular activada por fluorescencia en un citómetro de flujo (*FACS sorting*) las células con señal RFP, separando así los protoplastos que hayan sido transfectados con éxito de aquellos no transformados.

Para poder estudiar las dianas de la proteína *EcSRS-L* en *E. californica*, se clonó su secuencia codificante en el vector pBeaconRFP_GR mediante recombinación Gateway (Fig. C2.28).



Figura C2.28. Esquema de la construcción utilizada para la transformación de protoplastos de *E. californica* con el factor de transcripción *EcSRS-L*. Se representa la proteína rojo fluorescente (en rojo), el terminador del gen NOS (en gris), el promotor 35S (en violeta), el receptor de glucocorticoides (GR) (en azul), la secuencia codificante de *EcSRS-L* (en verde) y el terminador 35S (en marrón).

Para llevar a cabo este objetivo realicé una estancia en la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh (USA), en el grupo del doctor Robert G. Franks. Durante

ese periodo se optimizó el protocolo de preparación de protoplastos para la especie *E. californica* y la transfección de los mismos.

2.7.3. Obtención de protoplastos a partir de flores y hojas de *E. californica*.

Como se ha dicho anteriormente, el objetivo de este estudio es conocer las dianas moleculares del factor de transcripción EcSRS-L en *E. californica*, y al ser ésta una especie no modelo difícilmente transformable, se ha trabajado con protoplastos de flor y de hoja derivados de esta especie.

Para poder separar mediante un citómetro de flujo los protoplastos transformados con la construcción que contiene la secuencia codificante de EcSRS-L y posteriormente poder realizar el análisis de los perfiles de transcripción para esta proteína estudio, se necesita obtener alrededor de un millón (10^6) de protoplastos transfectados. Hasta llegar a alcanzar una suspensión de protoplastos en la concentración y condiciones idóneas para poder continuar con la transfección, fue necesario optimizar los protocolos de obtención de protoplastos, tanto los derivados de flores de *E. californica* como los protoplastos de mesófilo.

2.7.3.1. Obtención de protoplastos a partir de flores de *E. californica*.

Para la producción de protoplastos derivados de flores de *E. californica* se adaptó la técnica utilizada por Reddy, (2014) para la obtención de protoplastos del meristemo apical del tallo en *Arabidopsis thaliana*.

Se utilizaron botones florales correspondientes a los estadios 8-9 (Becker et al., 2005) que fueron desmenuzados y digeridos, lavando la suspensión de protoplastos resultante con una solución tampón y haciéndolos pasar por varios filtros para eliminar los restos indeseables, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Con el propósito de obtener una solución limpia de restos de plástidos, pared celular, o cualquier otro tipo de restos procedentes de la digestión, se probaron diferentes tiempos

Resultados

de incubación en la solución de enzimas, así como diferente grado de corte de los botones florales. Además, al utilizar la flor completa para la obtención de protoplastos, también se desprendían granos de polen, que junto con los demás restos dificultaban la transfección posterior, resultando en la hibridación del DNA en aquellos cuerpos más pequeños que los protoplastos. Para evitar la presencia de granos de polen en la suspensión de protoplastos, se trabajó sólo con carpelos procedentes de alrededor de 30 flores en preantesis, pertenecientes a estadios 8 y 9 (Becker et al., 2005). Estas flores se abrieron previamente, y se eliminaron los sépalos, los estambres y los pétalos, utilizando sólo los gineceos troceados en la digestión.

Los mejores resultados se alcanzaron al cortar los gineceos en fragmentos más grandes y al reducir el tiempo de digestión a una hora. De esta manera se obtuvo una suspensión de protoplastos saludables y en una concentración suficiente para poder realizar la transfección, aunque la suspensión contenía demasiados restos no deseables procedentes de la digestión para que se produjese con éxito la transfección.

Con el objetivo de obtener una solución de protoplastos más limpia que favoreciese la transfección, se realizó un gradiente de sacarosa siguiendo el protocolo de Zhai et al., (2009), en el cual se incluye sacarosa a una concentración 0.5M en la solución de enzimas. Tampoco de esta manera se consiguió reducir de forma significativa la presencia de restos no deseables en la suspensión de protoplastos, por lo que se optó por trabajar con protoplastos procedentes de hojas de *E. californica*.

2.7.3.2. Obtención de protoplastos a partir de hojas de *E. californica*.

Para preparar protoplastos derivados de hojas de *E. californica* se utilizó la técnica descrita por Yoo et al., (2007) para la obtención de protoplastos de mesófilo de *Arabidopsis thaliana*, introduciendo algunas modificaciones.

En primer lugar, fue necesario retirar la cutícula del envés de las hojas para favorecer la entrada de la solución de enzimas en el mesófilo, ya que las ceras presentes en la cutícula, debido a su carácter polar, evitan el contacto de la solución de enzimas con la epidermis.

El envés de las hojas se puso en contacto con la solución de enzimas y se dejó actuar el tiempo necesario para que se produjese la digestión, tras la cual se recogió la suspensión

de protoplastos en una solución tampón y se filtró para eliminar restos, tal y como se describe con más detalle en el apartado de materiales y métodos. En la figura C2.29 se pueden ver protoplastos de hoja de *E. californica*.

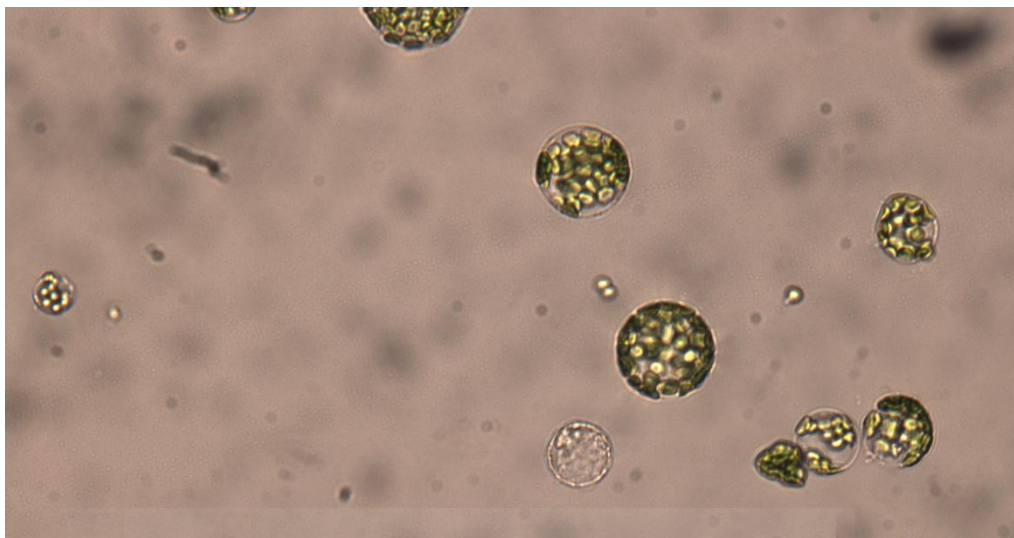


Figura C2.29. Protoplastos procedentes de hoja de *E. californica*. Se pueden observar algunos restos de plástidos y de protoplastos dañados tras la digestión.

2.7.4 Transfección de protoplastos de mesófilo de *E. californica*

Los protoplastos obtenidos a partir de hojas de *E. californica* fueron transfectados siguiendo el protocolo descrito por Yoo et al., (2007), en el cual se utiliza una solución de Polietilenglicol (PEG)-calcio para inducir la desorganización de las membranas celulares y permitir así la entrada del DNA que contiene la construcción con la que se pretende transformar los protoplastos. Para que la transfección tenga éxito se necesita utilizar entre 10 y 20 μg de DNA plasmídico de alta pureza en cada reacción, siendo esa cantidad la necesaria para plásmidos de un tamaño comprendido entre 5 y 10 kilobases (kb). El tamaño del vector pBeaconRFP_GR junto con la CDS de la proteína EcSRS-L es de 9539 pares de bases.

La transfección de protoplastos de mesófilo de *E. californica* con la construcción pBeaconRFP_GR::EcSRS-L no dió resultados positivos. Se repitió el ensayo para distintos tiempos de incubación con la solución PEG-calcio (diferentes tiempos

Resultados

comprendidos entre 5 y 10 minutos) y a distintas concentraciones de PEG (entre 10% y 20%) (masa/volumen), y en ninguno de los ensayos se consiguieron protoplastos transformados.

Estos resultados negativos podrían deberse a que el tamaño de la construcción pBeaconRFP_GR::EcSRS-L fuese demasiado grande y dificultase el paso a través de las membranas celulares. Para descartar que la falta de éxito en la transfección fuese causada por un proceso de producción de protoplastos ineficiente, se probó a transfectar protoplastos procedentes de hoja de *E. Californica* con un plásmido más pequeño. Para este ensayo se utilizó la construcción pUC19-GFP, de un tamaño de alrededor de 3kb, y que ya había sido utilizado para transformar protoplastos de mesófilo de *A. thaliana* con una eficiencia de transfección del 90%.

Como control del experimento se realizó en paralelo la obtención de protoplastos y la transfección con hojas de *A. thaliana*, siguiendo la técnica utilizada por Yoo et al., (2007), con algunas modificaciones. Para que este experimento tuviese éxito, las hojas utilizadas debían de proceder de plantas que aún no hubiesen desarrollado el tallo principal y que se encontrasen en perfecto estado de salud.

Tras varios ensayos para optimizar las condiciones de trabajo se determinó que en el caso de las hojas de *A. thaliana* el tiempo óptimo de digestión de la hoja para la obtención de protoplastos era de 2 horas, sin agitación ni vacío; mientras que la máxima eficiencia de transfección se alcanzó mediante la incubación de 5 minutos con una solución de PEG-calcio al 20% (masa/volumen). Sin embargo, no fué posible obtener una eficiencia mayor del 25% en la transfección (Fig. C2.30).

Por otro lado, se estableció que el tiempo de digestión óptimo para obtener protoplastos de *E. californica* era de 3 horas, sin agitación ni vacío. Las condiciones óptimas para la transfección fueron las mismas que para el caso de los protoplastos de hoja de *A. thaliana*, es decir, una incubación de 5 minutos con una solución de PEG-calcio al 20% (masa/volumen). Sin embargo, la eficiencia de transfección de los portoplastos derivados de hojas de *E. californica* no excedió del 1% (Fig. C2.31).

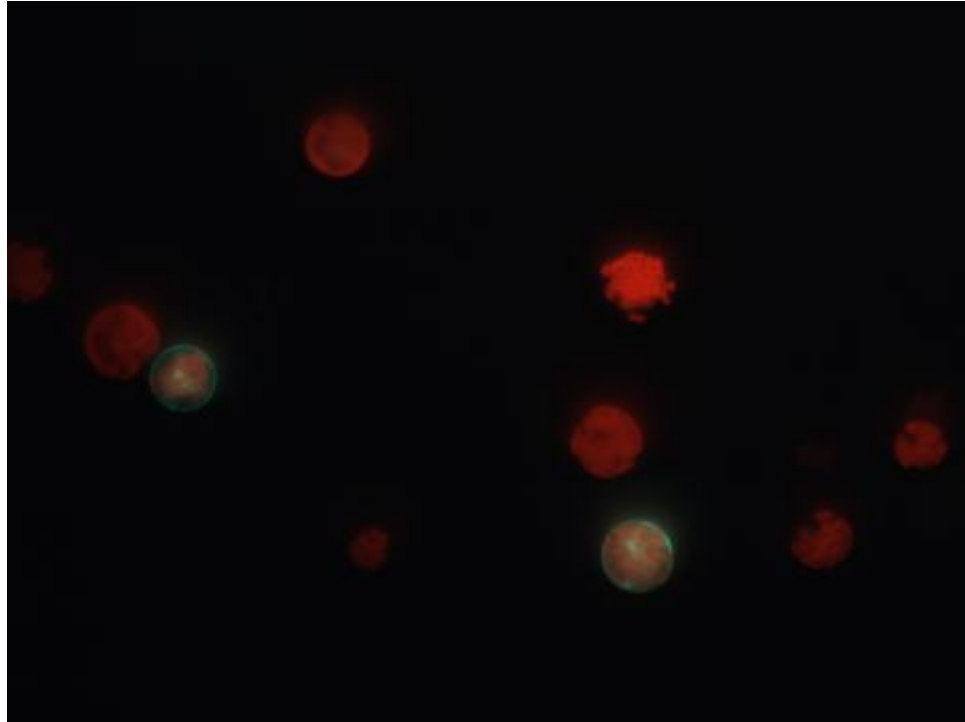


Figura C2.30. Protoplastos de hoja de *A. thaliana* transfectados con pUC19-GFP.

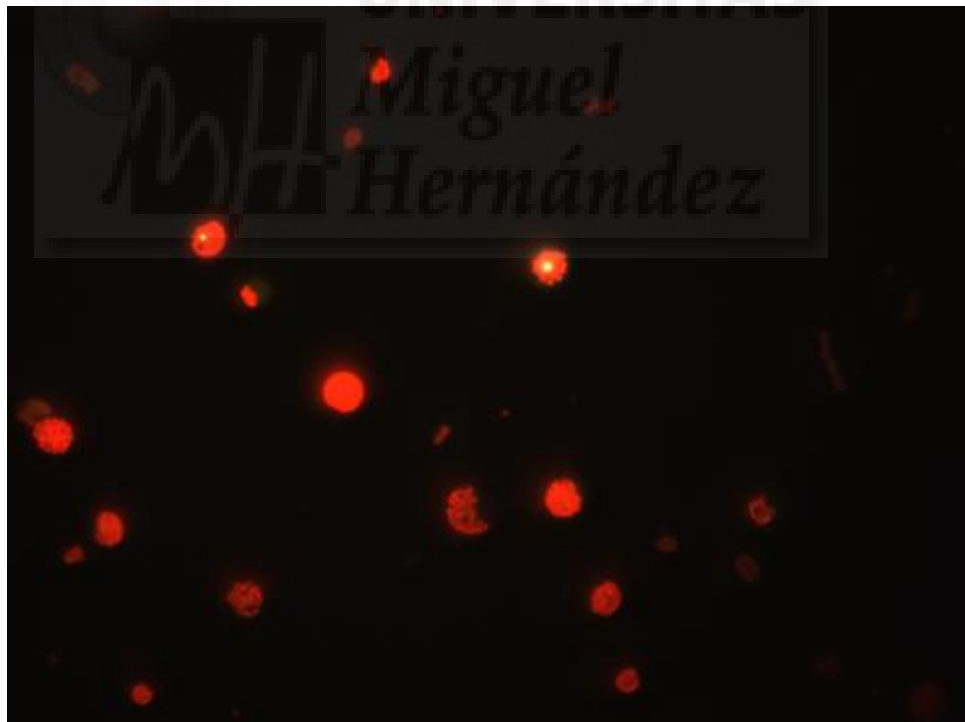


Figura C2.31. Protoplastos de hoja de *E. californica* transfectados con pUC19-GFP.

Debido a que se agotó el tiempo destinado a la realización de la estancia y a la consecución de este objetivo antes de poder obtener resultados satisfactorios, no fué

Resultados

posible finalizar este experimento y no se pudieron determinar las dianas moleculares de la proteína EcSRS-L en *E. californica*. Tampoco fue posible llevar a cabo una transformación eficiente de los protoplastos de esta especie con un DNA plasmídico que expresase una versión inducible de la proteína EcSRS-L para el posterior análisis de sus perfiles de transcripción. Sin embargo, con este trabajo se consiguió elaborar un protocolo adaptado a la especie no transformable *E. californica* que permitiría la elaboración de protoplastos viables para la posterior transformación de dichas células, así como su transfección con plásmidos que expresen una versión inducible de una proteína de interés. Además, se establecieron una serie de factores limitantes de crucial importancia para que este proceso pueda tener éxito. En la figura C2.32 se muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de protoplastos derivados de hojas de *E. californica* y su posterior transfección, así como los puntos críticos del protocolo.



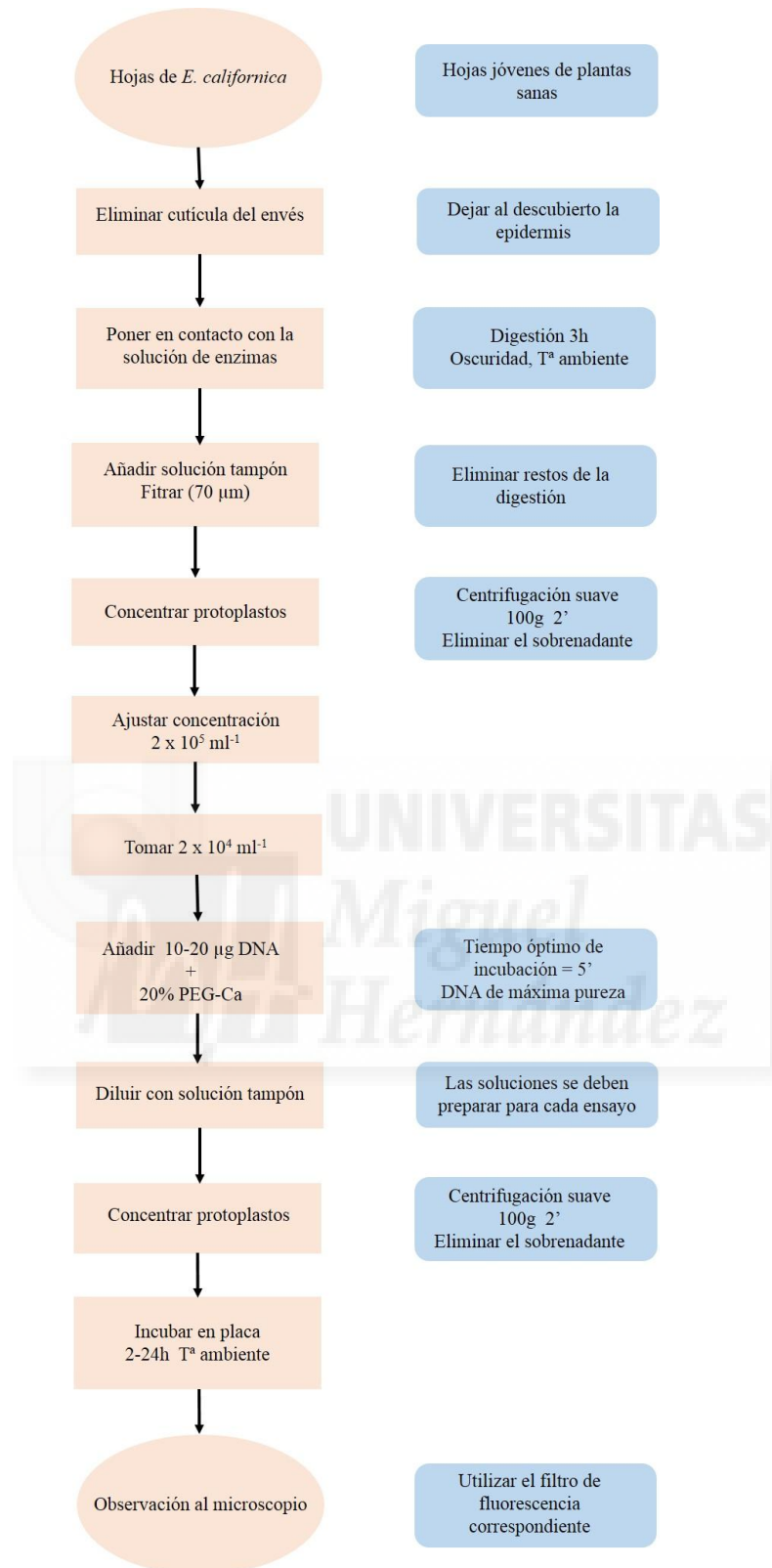


Figura C2.32. Diagrama de flujo del proceso de producción de protoplastos de hoja de *E. californica* y su transfección. En azul se indican los puntos limitantes del proceso.

DISCUSIÓN



Esta tesis doctoral está dirigida a explorar la validez del modelo que hemos propuesto para explicar la morfogénesis y evolución del gineceo de las angiospermas y que hemos denominado *Carpel Code*. Según este modelo, la especificación de la identidad de los distintos módulos funcionales del gineceo estaría determinada por la formación de complejos transcripcionales en distintas combinaciones. La composición de cada complejo dependería, al menos en parte, del solapamiento espacio-temporal de distintos factores de transcripción capaces de interaccionar, de modo que un mismo factor podría dirigir la formación de tejidos diferentes si interaccionara en cada dominio con factores distintos. Es posible hipotetizar, además, que cada complejo, en función de su composición, tendría un conjunto de dianas moleculares diferente y/o distinta actividad reguladora sobre las mismas. Por otro lado, este modelo también permite especular con que el origen y la evolución de los carpelos en las angiospermas podrían estar ligados a la formación *de novo* de estos complejos en este grupo de plantas, quizá por la adquisición de los factores implicados de la capacidad de interaccionar con otros.

En este contexto, hemos planteado abordar estas cuestiones mediante dos aproximaciones experimentales diferentes. Por un lado, la determinación del efecto en el transcriptoma de la inducción de NGA1 y STY1, y cómo éste varía cuando se impide la formación del posible complejo STY1-CRC-NGA1; por otro, si la formación y función de este complejo y de los factores implicados podría estar conservada en especies distantes y con morfologías del pistilo distintas.

1. El conjunto de dianas y la actividad transcripcional de STY1 y NGA1 varía en ausencia de CRC

En la primera parte del trabajo se ha pretendido conocer las dianas moleculares del complejo transcripcional STY-CRC-NGA en *Arabidopsis thaliana*. Para ello se ha comparado el efecto en el transcriptoma de la inducción simultánea de NGA1 y STY1 tanto en presencia como en ausencia de CRC, basándonos en la hipótesis de que se estaría formando un complejo proteico STY1-CRC-NGA1 en el dominio de expresión del factor CRC, que no se formaría en el fondo mutante *crc*. Existen evidencias que nos han llevado a asumir la formación de este complejo, como son los fenotipos de pérdida de expresión de los genes *SHI/STY/SRS* (Kuusket al., 2006) que se asemejan en gran medida a los mutantes de los genes *NGA* (Trigueros et al., 2009), lo cual sugiere que

tanto los genes *NGA* como los genes *SHI/STY/SRS* podrían estar actuando en la misma ruta genética (Navarrete-Gómez, 2011; Trigueros et al.2009). Además, se ha descrito que los genes *NGA* y *SHI/STY/SRS* se expresan en dominios altamente solapantes, aunque no parece que los genes *NGA* y *SHI/STY/SRS* estén regulándose uno al otro. Por otro lado, cuando *STY1* y *NGA3* se expresan bajo el control de un promotor constitutivo, se obtienen fenotipos fuertemente sinérgicos y muy diferentes a los causados por la sobreexpresión de estos genes por separado (Trigueros et al., 2009). Todo ello sugiere que los factores de transcripción *NGA* y *SHI/STY/SRS* estarían actuando cooperativamente y al mismo nivel, probablemente formando parte de un complejo transcripcional, pero no se ha podido probar la interacción física directa de estos dos factores (Trigueros et al., 2009). Sin embargo, se sabe que *CRC* se expresa en la epidermis de las valvas y en las regiones apicales del gineceo, que son las zonas más afectadas por la sobreexpresión conjunta de *STY1* y *NGA3*. Además, la sobreexpresión conjunta de estos dos genes en fondo mutante *crc* tiene efectos muy distintos a los observados en fondo silvestre, y significativamente, desaparece la formación de estilo ectópico en el dominio de expresión de *CRC* (Navarrete-Gómez 2011), lo cual podría indicar que *CRC* es necesario para la función de *STY1* y *NGA3* en la diferenciación de estos tejidos. Además, en un ensayo de Bi/TriFC realizado por Navarrete-Gómez (2011), se mostró que tanto *STY1* como *NGA3* interaccionaban con *CRC*, sugiriendo que este factor podía actuar como puente entre *NGA* y *STY* para formar un complejo de mayor orden.

1.1. La inducción de la actividad constitutiva de *STY1:GR* y *GR:NGA1* mediante su traslocación al núcleo en presencia y ausencia de *CRC* tiene efectos fenotípicos similares a los de las líneas de sobreexpresión y sus combinaciones equivalentes

Para la realización de estos experimentos decidimos utilizar el sistema inducible basado en la fusión del dominio receptor de glucocorticoides (*GR*) al factor transcripcional de interés. Una vez expresada en planta la construcción que codifica esta proteína quimérica con un dominio *GR*, la proteína de fusión se localiza en el citoplasma, donde no puede ejercer actividad transcripcional. Cuando se aplica

dexametasona, el dominio receptor GR cambia de conformación, pierde capacidad de interactuar con ciertas proteínas citoplasmáticas, y la proteína de fusión se trasloca al núcleo, donde el factor de interés puede acceder a la regulación de sus dianas.

Antes de realizar el estudio transcriptómico, generamos las líneas necesarias y comprobamos que sus fenotipos fueran similares a los que habían dado sustento a nuestra hipótesis, para validar así su utilidad en esta estrategia. Las líneas 35S::STY1:GR se habían obtenido del laboratorio de E. Sundberg (Uppsala Univ), y su descripción y caracterización había sido publicada anteriormente (Kuusk et al, 2006). En nuestras condiciones experimentales, los fenotipos observados tras el tratamiento con dexametasona eran similares, aunque más severos, a los de las líneas 35S::STY1, tanto en fondo silvestre como *crc*. La mayor severidad del fenotipo no era de extrañar y hay varios ejemplos en la literatura que reportan casos similares (p. ej. Girin et al, 2011). Es posible que las líneas 35S::STY:GR acumulen niveles muy altos de proteína en el citoplasma y que su traslocación al núcleo tenga un efecto mayor al de la sobreexpresión continuada del factor en las líneas 35S::STY1, que podría estar acumulándose a menores niveles, tal vez por efectos autorregulatorios o por una cierta bajada de la actividad del promotor 35S, que suele producirse en estadios tardíos del desarrollo si el gen que se sobreexpresa compromete el crecimiento de la planta. En cualquier caso, se consideró que esta línea era válida para nuestro propósito. Las líneas 35S::GR:NGA1 habían sido generadas por Patricia Ballester en el laboratorio, quien ya las había caracterizado, comprobando que sus efectos fenotípicos eran muy similares a los observados en las plantas 35S::NGA3 disponibles. Cuando las introdujimos en fondo mutante *crc*, el fenotipo de la inducción de NGA1, sin embargo, fue menos severo que el observado en las líneas 35S::NGA3 *crc* (Navarrete-Gómez, 2011). No tenemos una explicación perfectamente convincente para este resultado; es posible que la función de *NGA1* sea más dependiente de la presencia de *CRC* que la de *NGA3*; o que, al contrario que lo que sugerían los fenotipos de la inducción de STY1:GR, que las líneas 35S::NGA3 disponibles expresen *NGA3* a niveles mayores que los que se acumulan en las líneas 35S::GR:NGA1; también es posible que la fusión al dominio GR haga que la actividad del factor GR:NGA1 sea algo diferente a la de NGA1. Más llamativo resultaba que la inducción simultánea de STY1 y NGA1 en fondo silvestre tuviera un efecto fenotípico muy severo, con la transformación de prácticamente todo el pistilo en tejido de estilo, y que en fondo *crc*, esta misma inducción simultánea apenas tuviera efecto. En cualquier caso, como el efecto fenotípico de la inducción simultánea de

STY1 y NGA1 en fondo silvestre era similar al observado en las líneas 35S::*STY1* 35S::*NGA3* y también se revertía en fondo mutante *crc*, decidimos llevar a cabo el experimento, puesto que también eran compatibles con los presupuestos de nuestra hipótesis de partida.

1.2. El conjunto de dianas moleculares de STY1 y NGA1 en presencia y ausencia de CRC es diferente, así como el efecto regulatorio sobre muchas de las dianas comunes en ambos contextos.

Mediante la hibridación de microarrays de Agilent de dos canales con RNA extraído de inflorescencias donde se había inducido STY1 y NGA1, tanto en presencia como en ausencia de CRC, se obtuvo un gran número de genes que respondían de diferente manera en cada una de estas situaciones, lo cual avalaría nuestra hipótesis sobre la modificación de la función de los factores STY y NGA por la posible formación del complejo STY1-CRC-NGA1. Las posibles dianas identificadas debían de ser en su mayor parte directas, puesto que la inducción se realizó en presencia de cicloheximida, un compuesto que impide la traducción de nuevas proteínas y, por tanto, la regulación transcripcional que precise de la síntesis de factores intermediarios.

Los resultados globales del experimento fueron muy llamativos, pudiendo destacarse varios aspectos:

- En primer lugar, la inducción de STY1 y NGA1 en presencia de CRC (es decir, en fondo silvestre) produjo tanto la activación como la represión de un número relativamente elevado de genes, de los cuales era mayor el conjunto de genes reprimidos (434) que el de genes activados (112). Mientras que se ha descrito que STY1 tiene un dominio de activación transcripcional (Kuusk et al., 2002), los factores NGA tienen un dominio tipo EAR conservado que ha sido relacionado con represión transcripcional mediada por la interacción con cofactores de tipo TOPLESS (Ikeda y Ohme-Takagi, 2009). Con este experimento no es posible distinguir si todas estas dianas lo son simultáneamente de STY1 y de NGA1, si las que se activan son

mayoritariamente aquellas reguladas por STY1 (o complejos en los que interaccionan STY1 y NGA1) y las que se reprimen las reguladas por NGA1, u otras posibilidades mixtas, aunque probablemente representan la respuesta a funciones tanto conjuntas como cooperativas de estos factores en escenarios múltiples. Sería necesario complementarlo con experimentos de inducción de uno de los factores en ausencia de los otros y viceversa. En cualquier caso, los resultados sugieren que los factores STY y NGA podrían tener actividades transcripcionales diferentes en función de su contexto molecular, lo cual estaría en línea con nuestra hipótesis de partida.

- En segundo lugar, resulta muy llamativo que de los 112 genes activados por la inducción simultánea de STY1 y NGA1 en fondo silvestre, ninguno se encuentre activado cuando esta inducción se realiza en fondo *crc*, sino que 50 de ellos no responden y 62 lo hacen pero de modo opuesto, es decir, son reprimidos. Esto sugiere fuertemente que estos 112 genes son dianas del posible complejo STY-CRC-NGA, o de otros que incluyan al menos a STY o NGA y a CRC, de nuevo apoyando nuestra hipótesis de partida. Además, el hecho de que 62 genes parezcan ser dianas de STY1 y/o NGA1, pero que su respuesta transcripcional sea opuesta dependiendo de la presencia de CRC indica que ese factor podría estar afectando a la actividad transcripcional de estos factores, probablemente por su interacción física.

- En cuanto a los 434 genes reprimidos por la inducción de STY1 y NGA1 en fondo silvestre, tan solo 38 lo son también en fondo *crc*, lo cual sugiere que sólo éstos son regulados por STY1 y/o NGA1 de modo independiente a CRC. La expresión de 339 de los genes reprimidos por STY1 y/o NGA1 no varía en ausencia de CRC, lo cual sugiere que para que STY1 y/o NGA1 los repriman necesitan interaccionar con este factor, o bien que CRC es necesario para activarlos y por tanto en su ausencia no se expresan significativamente, por lo que el posible efecto represor de STY1 y/o NGA1 sería irrelevante; además, 57 genes reprimidos por la inducción de STY1 y NGA1 en fondo silvestre aparecen activados cuando la inducción se realiza en fondo *crc*, de modo que, de nuevo, parecería que la posible interacción con CRC en estos casos modificaría la actividad transcripcional de STY1 y/o NGA1 sobre estas dianas.

En resumen, estos resultados parecen confirmar que los factores STY1 y NGA1 ejercerían funciones diferentes en presencia y en ausencia de CRC, lo cual se reflejaría tanto en la regulación de dianas distintas como en la regulación de las mismas dianas pero en sentidos opuestos; además, STY1 y/o NGA1 también serían capaces de regular a varios genes independientemente de CRC, lo cual explicaría que su sobreexpresión en fondo *crc* también tuviera efectos fenotípicos sobre el desarrollo.

1.3. Identificación de posibles dianas del complejo STY-CRC-NGA con un papel en el desarrollo del gineceo

Entre toda la lista de genes expresados diferencialmente tras la inducción de STY1 y NGA1 en fondo silvestre y fondo mutante *crc*, definimos ciertos criterios de selección para centrarnos en un subconjunto de un tamaño manejable para su caracterización funcional. Aunque durante el desarrollo de este trabajo no ha habido tiempo suficiente para realizar dicha caracterización, sí que hemos planteado intentar resolver las siguientes cuestiones:

- ¿Son estos genes realmente dianas del complejo STY-CRC-NGA?
- ¿Podemos encontrar en sus promotores indicios de que este posible complejo se una a secuencias distintas o con distinta afinidad?
- ¿Cómo podemos explicar que en presencia y en ausencia de CRC algunas de ellas sean reguladas de modo opuesto? ¿Podemos identificar cofactores o factores adicionales que formen parte del complejo? ¿Podemos definir posibles cambios conformacionales mediados por la interacción con CRC que afecten a la actividad transcripcional de los factores implicados?
- ¿Tienen estos genes un papel en el desarrollo del estilo?

Para resolver estas cuestiones, sería necesario desarrollar un extenso plan de trabajo, para lo cual, como paso previo, hemos decidido restringir el estudio a los genes potencialmente más significativos con criterios tanto experimentales, buscando minimizar los posible artefactos (por ejemplo, utilizando resultados de experimentos similares realizados con material vegetal distinto), como de coherencia con sus patrones de expresión, función molecular, etc, todo ello descrito en el apartado de resultados. De este modo, hemos seleccionado 22 genes candidatos.

Entre ellos, resultaron especialmente interesantes seis: *YUC4*, *DVL20*, *CYP94B3*, *TCP15*, *JAB* y *BNQ2*. Todos estos genes tienen un papel relevante en el desarrollo de la parte apical del gineceo, que es donde se presume que actúa el complejo STY1-CRC-NGA1.

YUCCA4 (*YUC4*) es activado cuando se inducen STY1 y NGA1 en fondo silvestre pero no varía su expresión en fondo *crc*, de modo que parecería ser una diana de STY y/o NGA, pero necesitaría de CRC para su regulación. Se sabe que *YUC4* interviene en la biosíntesis de auxinas y que su transcripción es activada directamente por STY1 dirigiendo el desarrollo del gineceo (Cheng et al., 2006; Sohlberg et al., 2006). Además, *YUC4* ya ha sido descrito como posible diana (directa o indirecta) de los factores NGA, ya que la falta de actividad de NGA en la parte apical del gineceo conduce a que no se exprese *YUC4* en estas posiciones. Sin embargo, fuera de la zona apical del gineceo no parece que las proteínas NGA sean necesarias para activar la transcripción de *YUC4* (Trigueros et al., 2009). En las líneas amiR-NGA, *YUC4* no se expresa en el estilo, mientras que su expresión es normal en el resto de la flor; además, *YUC4* no se expresa constitutivamente en la línea 35S::NGA3. Todo esto podría sugerir que es necesaria la función adicional de algún otro gen que actúe junto con NGA para activar la expresión de este gen (Trigueros et al., 2009). Con estos antecedentes y teniendo en cuenta el comportamiento de *YUC4* en el ensayo de inducción de STY1 y NGA1 realizado en este trabajo, STY1 y NGA1 podrían estar actuando conjuntamente con CRC en la parte apical del gineceo para activar a *YUC4* como posible diana del complejo, que a su vez activaría la síntesis de auxinas en esta zona participando así en la morfogénesis del estilo de *Arabidopsis thaliana*. Además, en el experimento realizado por el sistema pOpON se vio que, al menos en el caso de la inducción de STY1, *YUC4* también estaba activado en fondo silvestre (en presencia de CRC) y no variaba su actividad en ausencia de CRC, lo cual refuerza experimentalmente esta idea.

Los genes DEVIL codifican pequeños polipéptidos involucrados en la diferenciación, el crecimiento y el desarrollo celular. Pertenecen a una familia de 21 miembros en *Arabidopsis* conocidos como RTFL/DVL (Wen et al. 2004) y son péptidos específicos de plantas cuya función molecular es aún un misterio. Puesto que los genes RTFL/DVL no comparten semejanza de secuencia con motivos o dominios bien caracterizados, no se han obtenido pistas sobre su función a partir de sus datos de secuencia (Ikeuchi et al., 2011). No se han descrito fenotipos asociados a la pérdida de

Discusión

función de ninguno de estos genes, quizá debido a una extensa redundancia funcional, pero la sobreexpresión de muchos de ellos afecta al desarrollo de la planta y también al gineceo, posiblemente regulando la división celular. Es el caso de DVL1, cuya sobreexpresión provoca fenotipos pleiotrópicos caracterizados por una estatura más baja, hojas de roseta redondeadas, inflorescencias compactas, pedicelos cortos y silicuas con puntas astadas, una morfología muy característica y que no se ha descrito para ningún otro mutante de *Arabidopsis* (Wen et al., 2004). La sobreexpresión de otros genes DVL/RTFL causa fenotipos muy similares en el desarrollo de la roseta y de la inflorescencia, aunque los frutos pueden adoptar morfologías diversas, como puntas de flecha en las líneas 35S::DVL4, o formas aplanadas y ovaladas en las líneas 35S::DVL3 (Wen et al., 2004; Wen y Walker, 2006). Algunos estudios sobre estos genes han mostrado que su sobreexpresión suprime la proliferación celular polarizada a lo largo del eje longitudinal de la hoja, causando así el acortamiento de las mismas, y que otros de los defectos observados, como protrusiones en las inflorescencias y en la base del tricoma, son también consecuencia de alteraciones en la proliferación celular (Ikeuchi et al., 2011; Narita et al., 2004). En este trabajo hemos identificado el gen DVL20 como posible diana del complejo proteico STY-CRC-NGA, aunque hasta el momento no se ha descrito la función que desempeña ni el efecto de su sobreexpresión. Cuando se inducen STY1 y NGA1 en presencia de CRC, la expresión de DVL20 se reprime, mientras que en ausencia de CRC no varía su expresión. Teniendo en cuenta que los genes RTFL/DVL se han descrito como reguladores negativos de la proliferación celular, nuestros resultados podrían indicar que el complejo STY-CRC-NGA estaría regulando negativamente a DVL20 en la parte apical del gineceo, quizá permitiendo la elongación del estilo. Se ha descrito que los factores de transcripción NGA junto con los factores CIN-TCP, actúan redundantemente para restringir gradualmente la actividad de la proliferación celular a los dominios marginales y basales de las hojas y otros órganos laterales, y que su ausencia confiere un crecimiento marginal persistente en las hojas, los cotiledones y los órganos florales (Álvarez et al., 2016). Nuestros resultados sugieren que, quizá, esta actividad podría estar modulada en determinados contextos por la regulación de genes de la familia DVL/RTFL, también relacionados con el control del ciclo celular. Cabe aquí destacar que, aunque CRC solo se expresa en el gineceo de *Arabidopsis*, otros miembros de la familia YABBY se expresan en las hojas, donde son necesarios para establecer correctamente la polaridad adaxial-abaxial (Chen et al., 1999; Sawa et al., 1999a; Sawa et al., 1999b; Siegfried et al., 1999), de modo que, de manera

análoga, podríamos especular con que un posible complejo STY-YAB-NGA podría actuar en otros dominios ejerciendo funciones paralelas, incluida su interacción con los genes RTFL/DVL.

CYP94B3 es una enzima perteneciente a la subfamilia CYP94 del citocromo P450 (CYP), que podría jugar un papel esencial en la respuesta a la hormona jasmonato (JA) (Bruckhoff et al., 2016). Se ha reportado que la acumulación de JA se incrementa significativamente en mutantes que carecen de la función CYP94B, es decir, los mutantes triples *cyp94b1 cyp94b2 cyp94b3*, pero no en los mutantes simples o dobles, por lo que los tres genes *CYP94* actuarían de forma completamente redundante y podrían estar participando en la inactivación oxidativa del JA (Bruckhoff et al., 2016). En nuestro ensayo, *CYP94B3* está reprimido cuando se inducen STY1 y NGA1 en presencia de CRC y activado cuando CRC está ausente, lo cual podría sugerir que la presencia de CRC sería necesaria para reprimir a la diana putativa del complejo *CYP94B3* y evitar la acumulación de JA. Además, *CYP94B3* se expresa fuertemente en la vasculatura de los estambres, pero también se ha observado su expresión en la parte apical del gineceo. Por otro lado, se ha visto que los genes *CYP94* influyen en el correcto desarrollo temporal de las flores de *Arabidopsis*, y aunque no se han establecido relaciones claras entre estos genes y el complejo STY-CRC-NGA, se sabe que la pérdida de función de los genes *CYP94* no sólo afecta a la homeostasis del JA, sino también a rutas metabólicas adicionales (Bruckhoff et al., 2016).

TCP15 es un factor de transcripción de la familia TEOSINTE BRANCHED1-CYCLOIDEA-PCF (TCP) que está involucrado en el desarrollo del estigma (Lucero et al., 2015), donde también estaría actuando el complejo STY1-CRC-NGA1. Las líneas sobreexpresoras de *TCP15* muestran gineceos con defectos de fusión en la parte apical y un menor volumen de tejido estigmático (Lucero et al., 2015). Estos fenotipos recuerdan a los mutantes de pérdida de función *crc*. En el ensayo de inducción de STY1 y NGA1 realizado en este trabajo, se ha visto que *TCP15* está activado en fondo silvestre (presencia de CRC) y no varía su expresión cuando CRC no está presente, resultado en principio contradictorio con el fenotipo *35S::TCP15* descrito, ya que parecería indicar que CRC es necesario para activar a *TCP15*, y que éste a su vez estaría regulando negativamente la correcta formación de la parte apical del gineceo. Por otro lado, se ha reportado que *TCP15* modula la expresión de los genes implicados en la homeostasis de auxinas y en el desarrollo del estilo/estigma. En ensayos de microarrays llevados a cabo

Discusión

usando RNA de plantas *P15:TCP15-EAR* (una versión de *TCP15* que funcionaría como represor constitutivo) y plantas *35S::TCP15*, se vio cómo *TCP15* influía en la regulación de factores de transcripción que además están involucrados en el desarrollo de los tejidos apicales del gineceo, como *STY1*, que aparecía activado por *TCP15:EAR*, mientras que su expresión estaba reprimida en las líneas sobreexpresoras de la forma nativa de *TCP15* (Lucero et al., 2015); o *CRC*, cuya expresión también estaba muy aumentada en las plantas *P15:TCP15-EAR*, pero no variaba significativamente en las plantas *35S::TCP15*. Además, Lucero et al. (2015) observaron que los niveles de transcripción de *YUC1*, *YUC4* y *YUC6* se reducían en las flores *35S::TCP15* y se incrementaban en las plantas *P15:TCP15-EAR* (Lucero et al., 2015). Mientras que los cambios de expresión en los genes involucrados en la biosíntesis de auxinas podrían explicarse por los cambios en la expresión de *STY1* y *CRC*, la respuesta transcripcional de *STY1* y *CRC* a *TCP15* sugiere un escenario complejo, en el cual *TCP15* sería una posible diana del complejo *STY1-CRC-NGA1* y a su vez estaría regulando al menos a *STY1* y *CRC*, aunque probablemente no de forma directa, ya que están activados en las líneas *TCP15:EAR*, en las que *TCP15* estaría reprimiendo a sus dianas. En cualquier caso, parece existir una relación funcional clara entre *STY1*, *CRC*, *NGA* y *TCP15* que merece ser explorada en mayor profundidad.

Por otro lado, *JAIBA* (*JAB*) es un factor de transcripción de clase II HD-ZIP que tiene relación funcional con *CRC*, uno de los componentes del complejo transcripcional que se está estudiando. Zúñiga-Mayo et al. (2012) describieron que los mutantes *jab* afectaban al desarrollo de los frutos y las semillas. Estos defectos derivaban de un desarrollo anormal de la placenta y los óvulos, que son tejidos que también se ven afectados en los mutantes *crc*. Además, generaron el doble mutante *jab crc* y observaron que las flores homocigotas para el doble mutante mostraban defectos en los procesos de determinación del meristemo floral y en el desarrollo del dominio medial del gineceo, lo cual mostraba la interacción funcional de ambos genes (Zúñiga-Mayo et al., 2012). En nuestro ensayo, *JAB* aparece reprimido cuando se induce *STY1* y *NGA1* en fondo silvestre (en presencia de *CRC*) y no varía su expresión al inducir *STY1* y *NGA1* en fondo mutante *crc*, lo que podría indicar que *STY1* y *NGA1* necesitarían a *CRC* para reprimirlo en el dominio de expresión de éste último, o que, alternativamente, *CRC* podría ser un activador de *JAB* en las zonas en las que no se expresan los genes *NGA* y *STY*, que, cuando están presentes junto con *CRC*, impedirían su expresión. Sería

necesario un estudio detallado de la expresión de *JAB* en los fondos mutantes correspondientes para proponer un modelo de regulación más fundado, así como un análisis genético que determinara las posibles interacciones de *JAB* con *STY1* y *NGA*, pero es posible especular con que la posible función del complejo *STY-CRC-NGA* sería permitir la función conjunta de *JAB* y *CRC* en la formación de las placentas, en las que no se expresan todos los factores conjuntamente, y a su vez mantener bajos los niveles de *JAB* en determinados estadios de desarrollo en la zona apical del gineceo.

BANQUO2 (*BNQ2*) es un factor de transcripción perteneciente a la familia bHLH que ha sido descrito en *Arabidopsis thaliana* como un regulador del tiempo de floración; está directa y negativamente regulado por *AP3* y *PI*, de modo que su represión en el segundo verticilo es necesaria para el correcto desarrollo de los pétalos (Mara et al., 2010). Se ha descrito que las plantas *bnq3* florecen más tarde que las plantas silvestres, mientras que las plantas transgénicas *35S::BNQ3* florecen considerablemente antes, de igual manera que ocurre en las sobreexpresoras de *BNQ1* y *BNQ2*. Además, las líneas de sobreexpresión de los genes *BNQ* muestran defectos en la morfología floral (Mara et al., 2010). Aunque no se ha descrito ninguna función de *BNQ2* en el desarrollo del gineceo de *A. thaliana*, se ha reportado que un gen homólogo a *BNQ2* en *Solanum lycopersicum*, *Style2.1*, controla la longitud del estilo en esta Solanácea (Chen et al., 2007), lo que nos lleva a pensar que *BNQ2* podría tener alguna función asociada al desarrollo del estilo de *Arabidopsis thaliana* quizás enmascarada por su redundancia funcional con otros dos genes muy cercanos, *BNQ1* y *BNQ3*. Por otro lado, el ensayo de inducción de *STY1* y *NGA1* muestra que es necesaria la presencia de *CRC* para activar a *BNQ2*, ya que éste está activado en fondo silvestre pero no varía su expresión en fondo *crc*.

Atendiendo a estos criterios, podríamos considerar los genes arriba descritos como dianas putativas del complejo *STY1-CRC-NGA1*, aunque sería necesario realizar ensayos futuros para validar su relación con estos factores.

Por otro lado, los genes *MYB57*, *AXR3*, *PRXCA*, *AT3G22540*, *WAVH1*, *AT1G68780*, *AT4G13540*, *AT3G54390*, *AT1G43910*, *AT2G28510*, *OFPI2*, *AT4G35165* y *WRKY28*, aunque no tienen descrita ninguna función en el desarrollo del estilo, se expresan fuertemente, o de forma moderada en el carpelo y en ocasiones en el estigma de *Arabidopsis thaliana*, por lo que también se podrían considerar como candidatos a dianas moleculares del complejo transcripcional *STY1-CRC-NGA1* en esta especie, y

podrían ayudar a elucidar cuáles son los mecanismos moleculares de la actividad de este complejo. Además, todos estos genes también resultaron escogidos en el experimento realizado mediante el sistema pOpON, lo que podría apoyar su selección como posibles dianas.

2. El complejo STY-CRC-NGA podría tener funciones conservadas en especies distantes de angiospermas

En el segundo capítulo de este trabajo se ha estudiado la conservación funcional de los miembros de la familia de genes *SHI/STY/SRS* en la dicotiledónea auténtica *N. benthamiana* y la dicotiledónea basal *E. californica*. Hemos determinado los patrones de expresión de los genes estudiados durante el desarrollo floral, caracterizado los fenotipos florales causados por su silenciamiento, y los efectos de su sobreexpresión tanto en el sistema heterólogo *A. thaliana* como en *N. benthamiana*. Además, se ha estudiado la posible conservación funcional del complejo transcripcional STY-CRC-NGA reportado para *A. thaliana*, en las especies *N. benthamiana* y *E. californica*, y se ha establecido un protocolo de obtención y transfección de protoplastos de la especie no transformable *E. californica* que permitirá estudiar las redes reguladoras de genes en esta especie. Este trabajo apoya la conservación funcional de los genes *SHI/STY/SRS* en el desarrollo apical del gineceo y su posición en las redes genéticas reguladoras para dirigir el desarrollo del estilo y el estigma en las dicotiledóneas.

2.1. La función de *SHI/STY/SRS* en el desarrollo apical del gineceo está conservada en las Dicotiledóneas Auténticas.

Los genes *SHI/STY/SRS* de *Arabidopsis* actúan de forma redundante para especificar el desarrollo del estilo y el estigma, como lo revela el fenotipo de múltiples combinaciones de mutaciones en miembros de esta familia (Kuusk et al., 2006).

La expresión de los diferentes genes *SHI/STY/SRS* en *Arabidopsis* se ha analizado por hibridación “*in situ*” de mRNA o por el uso de reporteros fusionando el promotor de estos genes al gen GUS (Eklund et al., 2011; Kuusk et al. 2002, 2006). Estos experimentos muestran patrones de expresión que se superponen en gran medida, y que generalmente están asociados con dominios de acumulación de auxinas en todos

los órganos laterales y en los tejidos apicales del gineceo en desarrollo, lo que es compatible con el alto nivel de redundancia encontrado en esta familia (Eklund et al., 2011; Kuusk et al. 2002, 2006).

En este trabajo se ha caracterizado la expresión de un miembro de la familia *SHI/STY/SRS* en la dicotiledónea basal *E. californica* y de tres miembros de ésta en *N. benthamiana*, observando una conservación significativa en el patrón de acumulación de sus mRNAs en las flores de estas dos especies y de *Arabidopsis*. En todos los casos, se ha detectado expresión en botones florales jóvenes, en el dominio distal de los órganos florales en crecimiento, en el primordio del óvulo y en el dominio apical del pistilo, lo que indica que las regiones reguladoras de estos genes contienen elementos conservados, a pesar de la distancia evolutiva de las especies correspondientes y de las diferencias entre parálogos dentro del mismo genoma. En trabajos previos se ha identificado un elemento regulador presente en los promotores de la mayoría de los genes *SHI/STY/SRS* de *Arabidopsis*, una caja GCC a la que se unen factores de transcripción de la familia AP2/ERF; esta caja parece ser necesaria para la expresión de los genes *SHI/STY/SRS* en el dominio distal de los órganos laterales, incluyendo los tejidos apicales de los gineceos en desarrollo (Eklund et al., 2011). Un trabajo reciente que incluye una filogenia integral de la familia *SHI/STY/SRS* en un amplio grupo de plantas con representación de todos los grandes clados, también reporta la presencia de estas cajas GCC en los promotores de los genes *SHI/STY/SRS*, encontrando que está presente en casi todas las secuencias de angiospermas, pero no en los taxones más basales como aquellos que incluyen musgos, licofitas o gimnospermas (Pfannebecker et al., 2017a). Así pues, no es sorprendente que también hayamos detectado estas cajas GCC conservadas dentro de las secuencias promotoras de los tres genes de *Nicotiana*, para las cuales se disponía de secuencias genómicas, lo que apoya su importancia para dirigir su expresión al gineceo apical.

La expresión constitutiva heteróloga de los genes *SHI/STY/SRS* de *N. benthamiana* en *Arabidopsis* causa efectos fenotípicos similares a los de la sobreexpresión de los genes endógenos (Kim et al., 2010; Kuusk et al., 2002), incluyendo la formación de tejido ectópico de estilo, la pérdida de definición entre el estilo y el ovario, y un crecimiento excesivo de las valvas en el extremo apical del pistilo, una morfología típicamente asociada a la acumulación de auxinas y que imita el tratamiento exógeno con esta hormona (Ståldal et al., 2008). A pesar de la divergencia

Discusión

entre las secuencias de las proteínas de *Arabidopsis* y *Nicotiana*, que es alta fuera de los dominios conservados RING e IGGH, y la aparición de eventos de duplicación independientes en cada especie, los fenotipos de sobreexpresión asociados a los tres genes *NbSRS-L* son similares, así como la capacidad de los diferentes factores *NbSRS-L* para complementar el fenotipo mutante *sty1 sty2*.

Estos experimentos apoyan que muchas de las proteínas SHI/STY/SRS son básicamente equivalentes en función molecular, aunque fuera de los dominios conservados RING e IGGH muestren baja similitud de secuencia, lo que sugiere que la mayoría de sus interacciones con los promotores de sus dianas y con otras proteínas estarían mediadas por estos dominios conservados. En este contexto, nos resultó muy sorprendente que el gen *EcSRS-L* de *E. californica* no complementara el fenotipo mutante *sty1 sty2* de *Arabidopsis* ni causara defectos fenotípicos cuando se sobreexpresaba en plantas silvestres de *Arabidopsis*. Cuando comparamos en detalle los dominios RING e IGGH de *EcSRS-L* con los de otros miembros de la familia tanto de *Arabidopsis* como de *Nicotiana* y de muchas otras especies, observamos que compartían con ellos una alta similitud de secuencia, aunque el último residuo de cisteína en el dominio zinc-finger de *EcSRS-L* (y del otro factor descrito en esta especie, *EscaSTY*) está precedido por un residuo de prolina, mientras que en la mayoría de los miembros de esta familia esta posición está más frecuentemente ocupada por un residuo cargado o polar como aspartato, glutamato, histidina o glutamina. Dadas las propiedades estructurales de los residuos de prolina, que tienen una rigidez conformacional excepcional que suele afectar a la estructura secundaria de proteínas y a las interacciones proteína-proteína (Morris et al., 1992), es posible que esta diferencia pueda afectar a la función. Este residuo de prolina no es exclusivo de los homólogos de *E. californica*, sino que también se encontró en 5 de las 91 proteínas predichas incluidas en el estudio filogenético de Pfannebecker et al. (2017a). Sin embargo, dado que ninguno de estos homólogos ha sido caracterizado funcionalmente, sería necesario realizar análisis equivalentes con algunos de ellos para probar esta hipótesis.

El silenciamiento mediado por VIGS de los homólogos de *NbSRS-L* también apoya la conservación de la función de las proteínas SHI/STY/SRS en el desarrollo del estilo y el estigma, al menos en *N. benthamiana*. Los pistilos de las plantas VIGS-*NbSRS-L* muestran una serie de defectos fenotípicos que afectan fuertemente a estos tejidos: la mayoría presentan estilos cortos, que no se fusionan correctamente y con un

estigma poco desarrollado y con defectos morfológicos. Además, se observan otros defectos fenotípicos asociados previamente con la pérdida de la función de *SHI/STY/SRS* en *Arabidopsis*, como defectos generales en el crecimiento de órganos florales y en el desarrollo de las anteras (Kuusk et al., 2006). Los tratamientos mediante VIGS no fueron específicos entre los genes *NbSRS-L* en estudio, por lo que no es posible estimar el nivel de redundancia genética o las funciones específicas de cada gen individual. Sin embargo, dado que los tres genes muestran patrones similares de expresión y causan efectos similares cuando se sobreexpresan en *Arabidopsis* o en *Nicotiana*, parece más probable que trabajen redundantemente, como se ha descrito para los miembros de la familia *SHI/STY/SRS* en *Arabidopsis*.

Desafortunadamente, el silenciamiento de *EcSRS-L* mediante VIGS no fue suficiente para inducir cambios fenotípicos en *E. californica*, por lo que no podemos inferir ninguna conclusión significativa. La ausencia de fenotipos anormales en las plantas tratadas con VIGS y en las plantas de *Arabidopsis* que expresan *EcSRS-L*, puede sugerir que la proteína *EcSRS-L* no es funcional y que otros miembros de esta u otras familias proporcionan la función de especificación de estilo y estigma. Como ya hemos mencionado, en *E. californica* sólo se ha descrito un gen *SHI/STY/SRS* adicional, que presenta un alto nivel de homología con el gen *EcSRS-L* presentado en este estudio, incluyendo el residuo de prolina distintivo en el dominio RING y por tanto es poco probable que sea funcionalmente divergente (Pfannebecker et al., 2017a). Sin embargo, el genoma de *E. californica* no se ha secuenciado todavía, y es posible que codifique a otros miembros de la familia que pueden tener un papel en el desarrollo del estilo y el estigma. Para completar estos estudios, sería interesante extender este tipo de estudios a otras dicotiledóneas basales y taxones aún más basales dentro de las angiospermas, para apoyar de manera concluyente la conservación del papel de los factores *SHI/STY/SRS* en la diferenciación del estilo y el estigma en las angiospermas, que, aún a falta de los mismo, parece un escenario probable.

Las plantas de *Nicotiana* tratadas mediante VIGS de *NbSRS-L* ocasionalmente mostraron un mayor número de órganos florales o pistilos multicarpelares. Estos fenotipos no se habían descrito previamente para los mutantes *shi/sty* en *Arabidopsis*, lo que podría reflejar una función específica de los genes *SHI/STY/SRS* en *Nicotiana*. Sin embargo, recientemente se ha mostrado que los mutantes *vrs2* en cebada, afectados en un gen *SHI/STY/SRS*, producen un mayor número de meristemas de espiguillas en la

inflorescencia (Youssef et al., 2017), un comportamiento indeterminado que recuerda de algún modo al mayor número de órganos florales encontrados en las plantas VIGS-NbSRS-L. Este paralelismo podría revelar la conservación de un papel adicional de los miembros de la familia *SHI/STY/SRS*, que podría estar relacionado con su función conservada descrita en la homeostasis hormonal (Eklund et al., 2010b, 2011; Fridborg et al., 2001; Kim et al., 2010, Youssef et al., 2017; Zawaski et al., 2011). Además, podemos especular con la relación funcional entre los genes *SHI/STY/SRS* y *CRC*, punto de partida de este trabajo, ya que *CRC* ha sido relacionado en un gran número de especies con el control de la indeterminación del meristemo floral, y en concreto esta función parece ser la más evidente en plantas de *N. benthamiana* y de *E. californica* donde la expresión de los ortólogos de *CRC* está reducida (Lee et al., 2005; Orashakova et al., 2009).

2.2. Conservación de la red genética reguladora del desarrollo del gineceo.

Los fenotipos de las líneas 35S::*NbSRS-L* en *Nicotiana* recuerdan a los descritos para las plantas 35S::*STY1* de *Arabidopsis*, lo cual parece indicar que las rutas que dirigen el desarrollo del estilo y el estigma en estas dos especies son probablemente similares, a pesar de las grandes diferencias en la morfología de estilo y estigma en ambas especies. Por otra parte, además de dirigir el desarrollo ectópico de estos tejidos, los cambios generales en la morfología del pistilo, como la demarcación menos evidente entre el ovario y el estilo, o la proliferación irregular de células en las paredes del ovario que causan rugosidades en la superficie del ovario, sugieren que el proceso de especificación del pistilo en diferentes territorios y dominios funcionales responde a señales similares en especies con morfologías de pistilo muy diversas.

Este estudio también revela que, como en *Arabidopsis*, los genes *NGA* y *SHI/STY/SRS* también comparten sus funciones en el desarrollo del pistilo en *Nicotiana*. Los genes *NbNGA* y *NbSRS-L* muestran patrones de expresión muy similares en el desarrollo de flores y conducen a fenotipos altamente relacionados cuando se silencian mediante VIGS (Fourquin y Ferrándiz, 2014). Sin embargo, mientras que la

inactivación de *NbNGA* causa una completa falta de tejido estigmático y estilar en los pistilos de *Nicotiana*, la inactivación de los genes *NbSRS-L* sólo produjo defectos más suaves en estos mismos tejidos, lo que podría sugerir que la contribución de los factores *NbSRS-L* a esta función es menos importante. Por otro lado, el VIGS sobre los genes *NbSRS-L* en este trabajo no redujo de un modo tan eficaz su expresión como el VIGS sobre los genes *NbNGA* reportado anteriormente (Fourquin y Ferrándiz, 2014); además, el número de genes *SHI/STY/SRS* en el genoma de *N. benthamiana* es también mayor que el número de homólogos de *NbNGA*; por tanto, es probable que los fenotipos observados en las plantas *NbSRS-L-VIGS* no reflejen el efecto de una pérdida completa de la función de *SHI/STY/SRS*.

2.3. La formación del complejo transcripcional STY-CRC-NGA está conservada en *N. benthamiana* y *E. californica*.

Los genes *NGA* pertenecen a la subfamilia de factores de transcripción RAV del dominio B3 presentes en todas las plantas terrestres, pero poseen tres dominios característicos conservados que sólo se encuentran en las proteínas *NGA* de las angiospermas (Fourquin y Ferrándiz, 2014; Pfannebecker et al., 2017b). Ya se habían encontrado homólogos a los genes *SHI/STY/SRS* en briofitas, aunque la caja GCC que confiere la expresión del carpelo sólo se ha encontrado en los promotores de los genes *SHI/STY/SRS* de las angiospermas (Pfannebecker et al., 2017a). Esto sugiere que los genes *NGA* y *SHI/STY/SRS* pueden haber adquirido funciones específicas relacionadas con el origen evolutivo del estilo y el estigma, que son tejidos específicos de las angiospermas.

Del mismo modo, los ortólogos del gen *CRC* también tienen un papel conservado en estas funciones en una amplia gama de especies de angiospermas (Fourquin et al., 2005, 2007, 2014; Ishikawa et al., 2009; Lee et al., 2005; Orashakova et al., 2009; Yamada et al., 2011; Yamaguchi et al., 2004).

Con todas estas evidencias, podríamos proponer una conservación evolutiva en las rutas genéticas que dirigen la diferenciación del carpelo. En línea con la hipótesis central de este trabajo, la posible formación de un complejo que incluiría a los factores *NGA*, *SHI/STY/SRS* y *CRC* podría ser responsable del origen evolutivo del estilo, un

Discusión

tejido que se encuentra exclusivamente en plantas con flores. Si esto fuera así, cabría esperar que este complejo se pudiera formar en diferentes especies; para determinar si al menos este era el caso en las especies que hemos utilizado en este trabajo, realizamos los ensayos correspondientes con los ortólogos de estos factores en las mismas.

El ensayo de interacción proteína-proteína *in vivo* realizado mediante BiFC para *Nicotiana benthamiana* mostró que no se producía una interacción física entre las proteínas NbSRS-L y NbNGA, de la misma manera que ocurría con los factores homólogos de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, NbCRC era capaz de formar heterodímeros tanto con los factores NbSRS-L como con los factores NbNGA, y además su presencia era necesaria para la formación de un trímero entre estos tres factores, resultado que recuerda nuevamente a lo observado en *Arabidopsis* (Navarrete-Gómez, 2011). Estos resultados podrían indicar que los principales factores de transcripción involucrados en el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana* estarían actuando de forma cooperativa formando un complejo proteico que se conserva, al menos, a través de las dicotiledóneas auténticas.

Por otro lado, cuando se estudió la formación del complejo STY-CRC-NGA en *E. californica*, se vio que los factores EcNGA y EcSRS-L eran capaces de heterodimerizar, de igual manera que también se formaba un dímero entre EcNGA y EcCRC. Sin embargo, no se observó interacción física entre EcCRC y EcSRS-L. Al realizar el ensayo de interacciones entre EcCRC y EcSRS-L en presencia de EcNGA, se recuperaba la señal fluorescente, lo que indicaba que en *E. californica* también se puede formar un trímero EcCRC-EcNGA-EcSRS-L. En este complejo el interactor que actuaría como nexo de unión sería EcNGA, lo cual contrasta con los resultados reportados para *Arabidopsis* (Navarrete-Gómez, 2011) y en *Nicotiana*, donde CRC es el nexo del complejo. Es difícil especular si estas diferencias en las interacciones observadas están producidas por diferencias en las propiedades de las proteínas correspondientes; podemos recordar aquí que la sobreexpresión de *EcSRS-L* en *Arabidopsis* no producía efectos fenotípicos evidentes, quizá porque no era capaz de interactuar con el mismo conjunto de factores que las propias proteínas SHI/STY/SRS de *Arabidopsis*. El hecho de que, aunque de modo diferente, los factores EcSRS, EcCRC y EcNGA sí sean capaces de formar un trímero en planta, sin embargo, sería compatible con la posible función conservada de este complejo, que en el caso de *Eschscholzia* podría ser el resultado de la coevolución de los tres tipos de factores. Esto

hace que sea muy interesante seguir indagando sobre la posible función de estos genes y la conservación de sus interacciones en otras especies de dicotiledóneas basales, en las que es posible encontrar especies con estilos cortos, como *Eschscholzia californica* y otras sin estilo, como las del género *Papaver*, y así estimar si estas variaciones están relacionadas con la diversidad morfológica de este dominio.

2.4. Optimización del protocolo de obtención y transfección de protoplastos de la especie no transformable *E. californica*.

En este trabajo se ha demostrado la conservación funcional de los genes *SHI/STY/SRS* en el desarrollo del estilo y el estigma en la dicotiledónea auténtica *Nicotiana benthamiana*. Los gineceos de las plantas VIGS-NbSRS-L mostraban defectos fenotípicos que recuerdan a los descritos para la pérdida de función de *SHI/STY/SRS* en *Arabidopsis thaliana*, como estilos cortos que no se fusionaban correctamente y estigmas poco desarrollados con defectos morfológicos. Además, las líneas 35S::*NbSRS-L* en *Nicotiana* muestran fenotipos muy similares a los ya mencionados para las plantas 35S::*STY1* de *Arabidopsis*. Sin embargo, en *E. californica* el VIGS no fue suficiente para producir cambios fenotípicos que nos permitiesen concluir que la función del desarrollo del estilo y estigma de los genes *SHI/STY/SRS* también se encontrase conservada en esta especie, y además, hasta el momento no es posible conseguir plantas transgénicas en *E. californica* con una eficiencia suficiente. Debido a estos inconvenientes, una alternativa para estudiar la conservación funcional de los genes *SHI/STY/SRS* en esta especie podría ser el sistema TARGET (Bargmann et al., 2013), mediante el cual se podrían conocer las dianas directas de estos genes en la especie no transformable *E. californica*. De esta manera, si las dianas de *SHI/STY/SRS* conocidas para otras especies de angiospermas también estuvieran conservadas en *E. californica*, podría sugerir que la función de estos genes en el desarrollo del estilo y el estigma también estaría conservada en esta dicotiledónea basal. Además, se podría utilizar este sistema para estudiar las dianas directas de EcCRC y EcNGA, los otros dos componentes del complejo proteico STY-CRC-NGA y establecer relaciones entre ellas para conocer las dianas del complejo en esta especie.

Discusión

Aunque no se consiguió completar el objetivo marcado previamente de obtener dianas directas de *EcSRS-L* a partir de protoplastos de *E. californica*, con este trabajo se ha conseguido optimizar el protocolo de obtención de protoplastos de esta especie para su posterior transfección con un vector que exprese la proteína de interés. Se estableció que a partir de hojas de *E. californica* se podía conseguir una solución de protoplastos suficientemente saludables y limpia de restos de la digestión enzimática que permitiera una posterior transfección con una elevada eficiencia. Además, para que la transfección tuviese éxito, establecimos que era necesario utilizar DNA de gran pureza y preferiblemente vectores de reducido tamaño, para facilitar su paso a través de las membranas celulares. Este protocolo optimizado para la especie *E. californica* podría ser de mucha utilidad en futuros trabajos que ayuden a entender cómo se estructuran las redes reguladoras de genes en las dicotiledóneas basales.



CONCLUSIONES



Primera: Se han identificado una gran cantidad de genes que responden de manera diferente a la inducción conjunta de STY1 y NGA1 en presencia o en ausencia de CRC, en *Arabidopsis thaliana*. Además, algunos de estos genes tienen papeles relevantes en el desarrollo de la parte apical del gineceo, lo cual podría apoyar la idea de que los factores de transcripción STY, NGA y CRC formarían un complejo que estaría dirigiendo la morfogénesis del estilo en *Arabidopsis thaliana*.

Segunda: Los genes *SHI/STY/SRS* tienen conservada la función de dirigir el desarrollo del estilo y el estigma en las dicotiledóneas auténticas.

- Se ha observado una conservación significativa de los patrones de expresión de los genes *SHI/STY/SRS* en *N. benthamiana*, *E. californica* y *A. thaliana*, tres especies distantes evolutivamente.
- Las rutas que dirigen el desarrollo del estilo y estigma en *N. benthamiana* y *A. thaliana* podrían ser similares, a pesar de la notable diferencia en la morfología de estos tejidos en estas dos especies.

Tercera: La formación del complejo proteico STY-CRC-NGA también se conservaría a través de las dicotiledóneas, aunque los mecanismos moleculares por los que actúa este complejo podrían haber variado a lo largo de la evolución de estas plantas.

BIBLIOGRAFÍA



- Álvarez, J.P., Furumizu, C., Efroni, I., Eshed, Y., y Bowman, J.L.** (2016). Active suppression of a leaf meristem orchestrates determinate leaf growth. *eLife*. 5, e15023.
- Álvarez, J. P., Goldshmidt, A., Efroni, I., Bowman, J. L., y Eshed, Y.** (2009). The *NGATHA* distal organ development genes are essential for style specification in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 21, 1373–1393.
- Álvarez, J., y Smyth, D.R.** (1999). *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development* 126, 2377-2386.
- Álvarez-Buylla, E. R., Benitez, M., Davila, E. B., Chaos, A., Espinosa-Soto, C., y Padilla-Longoria, P.** (2007). Gene regulatory network models for plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 83–91.
- Balanzá, V., Martínez-Fernández, I., y Ferrándiz, C.** (2014). Sequential action of *FRUITFULL* as a modulator of the activity of the floral regulators *SVP* and *SOCI*. *J Exp. Bot.* 65, 1193-1203.
- Balanzá, V., Navarrete, M., Trigueros, M., y Ferrándiz, C.** (2006). Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* 57, 3457-3469.
- Ballester, P.** (2016). Los genes *NGATHA*: análisis genético y molecular de su papel en la morfogénesis del gineceo de *Arabidopsis thaliana*. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ballester, P., y Ferrándiz, C.** (2016). Shattering fruits: variations on a dehiscent theme. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35, 68–75.
- Bargmann, B.O., Marshall-Colon, A., Efroni, I., Ruffel, S., Birnbaum, K.D., Coruzzi, G.M., y Krouk, G.** (2013). TARGET: a transient transformation system for genome-wide transcription factor target discovery. *Mol Plant*. 6, 978-80.
- Bechtold, N., Ellis, J., y Pelletier, G.** (1993). In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences Serie III. Sciences de la Vie* 316, 1194-1199.
- Becker, A., Gleissberg, S., y Smyth, D.R.** (2005). Floral and vegetative morphogenesis in California Poppy (*Eschscholzia californica* Cham.). *Int. J. Plant Sci.* 166, 537-555.

Bibliografía

- Belda-Palazon, B., Ruiz, L., Marti, E., Tarraga, S., Tiburcio, A.F., Culianez, F., Farras, R., Carrasco, P., y Ferrando, A.** (2012) Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One* 7, e46907.
- Bender, R.L., Fekete, M.L., Klinkenberg, P.M., Hampton, M., Bauer, B., Malecha, M., Lindgren, K., A Maki, J., Perera, M.A., Nikolau, B.J., y Carter, C.J.** (2013). PIN6 is required for nectary auxin response and short stamen development. *Plant J.* 74, 893-904.
- Berardini, T.Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., y Huala, E.** (2015). The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis*. 53, 474-485.
- Bombarely, A., Rosli, H. G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L. A., y Martin, G. B.** (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1523–1530.
- Bowman, J.L., Drews, G.N., y Meyerowitz, E.M.** (1991). Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell*. 3, 749-758.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., y Meyerowitz, E. M.** (1989). Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1, 37–52.
- Bowman, J.L., y Smyth, D.R.** (1999). *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectar development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helixloop-helix domains. *Development* 126, 2387-2396.
- Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N., y Coen, E.** (1993). Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell*. 72, 85–95.
- Bruckhoff, V., Haroth, S., Feussner, K., König, S., Brodhun, F., y Feussner, I.** (2016). Functional Characterization of CYP94-Genes and Identification of a Novel Jasmonate Catabolite in Flowers. *PLoS One*. 26, e0159875.

Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H.M., y Peng, J. (2006). Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142, 509-25.

Chanderbali, A.S., Yoo, M.J., Zahn, L.M., Brockington, S.F., Wall, P.K., Gitzendanner, M.A., Albert, V.A., Leebens-Mack, J., Altman, N.S., Ma, H., Depamphilis, C.W., Soltis, D.E., y Soltis, P.S. (2010). Conservation and canalization of gene expression during angiosperm diversification accompany the origin and evolution of the flower. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 22570-22575.

Chávez-Montes, R. A., Herrera-Ubaldo, H., Serwatowska, J., y de Folter, S. (2015). Towards a comprehensive and dynamic gynoecium gene regulatory network. *Curr. Plant Biol.* 3-4, 3-12.

Chen, K.Y., Cong, B., Wing, R., Vrebalov, J., y Tanksley, S.D. (2007). Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science.* 26, 643-645.

Chen, Q., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L. y Drews, G. N. (1999). The *Arabidopsis* FILAMENTOUS FLOWER gene is required for flower formation. *Development* 126, 2715-26.

Cheng, Y., Dai, X., y Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the *YUCCA* flavin monooxygenases controls the formation of floral organs y vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20, 1790-1799.

Clemente, T. (2006). *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). *Methods Mol. Biol.* 343, 143-154.

Clough, S. J., y Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.

Coen, E.S., y Meyerowitz, E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37.

Colombo, M., Brambilla, V., Marcheselli, R., Caporali, E., Kater, M., y Colombo, L. (2010). A new role for the *SHATTERPROOF* genes during *Arabidopsis* gynoecium development. *Dev. Biol.* 337, 294-302.

Bibliografía

- Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E., y Lund, O.S.** (2004). Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant J.* 40, 622-31.
- Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martínez, A., Jepson, I., Tsiantis, M., y Moore, I.** (2005). New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. *Plant J.* 41, 899-918.
- Crawford, B. C. W., Ditta, G., y Yanofsky, M. F.** (2007). The *NTT* gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 17, 1101–1108.
- Crawford, B. C. W., y Yanofsky, M. F.** (2011). *HALF FILLED* promotes reproductive tract development and fertilization efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 138, 2999–3009.
- Curtis, M. D., y Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for highthroughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133, 462–469.
- Davidson, E. H., y Levine, M. S.** (2008). Properties of developmental gene regulatory networks. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20063–20066.
- Davies, B., Motte, P., Keck, E., Saedler, H., Sommer, H., y Schwarz-Sommer, Z.** (1999). *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two Antirrhinum MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* 18, 4023–4034.
- Davila-Velderrain, J., Martínez-García, J. C., y Álvarez-Buylla, E. R.** (2016). Dynamic network modelling to understand flowering transition and floral patterning. *J. Exp. Bot.* 67, 2565–2572.
- De Folter, S., Immink, R.G.H., Kieffer, M., Parenicová, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M., Davies, B., y Angenent, G.C.** (2005) Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell.* 17, 1424-1433.
- De Lucas, M., y Brady, S. M.** (2013). Gene regulatory networks in the Arabidopsis root. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 50–55.

Dinesh-Kumar, S. P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M., y Liu, Y. (2003). Virus-induced gene silencing. *Methods Mol. Biol.* 236, 287–294.

Dreni, L., Pilatone, A., Yun, D., Erreni, S., Pajoro, A., Caporali, E., Zhang, D., y Kater, M.M. (2011). Functional analysis of all AGAMOUS subfamily members in rice reveals their roles in reproductive organ identity determination and meristem determinacy. *Plant Cell.* 23, 2850–2863.

Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., y Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community Nucleic Acids Research Advance Access. *Nucl. Acids Res.* 38, 64-70.

Eklund, D. M., Cierlik, I., Ståldal, V., Claes, A. R., Vestman, D., Chandler, J., y Sundberg, E. (2011). Expression of Arabidopsis *SHORT INTERNODES/STYLISH* family genes in auxin biosynthesis zones of aerial organs is dependent on a GCC boxlike regulatory element. *Plant Physiol.* 157, 2069–2080.

Eklund, D. M., Ståldal, V., Valsecchi, I., Cierlik, I., Eriksson, C., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Sundström, J.F., Thelander, M., Ezcurra, I., y Sundberg, E. (2010a). The *Arabidopsis thaliana* *STYLISH1* protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *Plant Cell.* 22, 349–363.

Eklund, D. M., Thelander, M., Landberg, K., Ståldal, V., Nilsson, A., Johansson, M., Valsecchi, I., Pederson, E.R., Kowalczyk, M., Ljung, K., Ronne, H., y Sundberg, E. (2010b). Homologues of the *Arabidopsis thaliana* *SHI/STY/LRP1* genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 137, 1275–1284.

Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M.F., Yanofsky, M.M., y Colombo, L. (2003). MADS-Box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 15, 2603–2611.

Ferrándiz, C., y Fourquin, C. (2014). Role of the FUL-SHP network in the evolution of fruit morphology and function. *J. Exp. Bot.* 65, 4505–4513.

Bibliografía

Ferrándiz, C., Fourquin, C., Prunet, N., Scutt, C., Sundberg, E., Trehin, C., y Viallette-Guiraud A.C. (2010). Carpel development. *Adv. Bot. Res.* 55, 1–74.

Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., y Yanofsky, M. F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 127, 725–734.

Fourquin, C., y Ferrándiz, C. (2012). Functional analyses of AGAMOUS family members in *Nicotiana benthamiana* clarify the evolution of early and late roles of C-function genes in eudicots. *Plant J.* 71, 990–1001.

Fourquin, C., y Ferrándiz, C. (2014). The essential role of *NGATHA* genes in style and stigma specification is widely conserved across eudicots. *New Phytol.* 202, 1001–1013.

Fourquin, C., Primo, A., Martínez-Fernández, I., Huet-Trujillo, E., y Ferrándiz, C. (2014). The *CRC* orthologue from *Pisum sativum* shows conserved functions in carpel morphogenesis and vascular development. *Ann. Bot.* 114, 1535–1544.

Fourquin, C., Vinauger-Douard, M., Chambrier, P., Berne-Dedieu, A., y Scutt, C. P. (2007). Functional conservation between *CRABS CLAW* orthologues from widely diverged angiosperms. *Ann. Bot.* 100, 651–657.

Fourquin, C., Vinauger-Douard, M., Fogliani, B., Dumas, C., y Scutt, C. P. (2005). Evidence that *CRABS CLAW* and *TOUSLED* have conserved their roles in carpel development since the ancestor of the extant angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4649–4654.

Fridborg, I., Kuusk, S., Robertson, M., y Sundberg, E. (2001). The Arabidopsis protein SHI represses gibberellin responses in Arabidopsis and barley. *Plant Physiol.* 127, 937–948.

Girin, T., Paicu, T., Stephenson, P., Fuentes, S., Körner, E., O'Brien, M., Sorefan, K., Wood, T.A., Balanzá, V., Ferrándiz, C., Smyth, D.R., y Østergaard, L. (2011) *INDEHISCENT* and *SPATULA* interact to specify carpel and valve margin tissue and thus promote seed dispersal in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 3641–3653.

Gomariz-Fernández, A., Sánchez-Gerschon, V., Fourquin, C., y Ferrándiz, C. (2017). The Role of *SHI/STY/SRS* genes in organ growth and carpel development is

conserved in the distant eudicot species *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. *Front. Plant Sci.* 8, 814.

Gomez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M.M., Angenent, G.C., y Sablowski, R. (2005) Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* 132, 429-438.

Gremski, K., Ditta, G., y Yanofsky, M. F. (2007). The *HECATE* genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134, 3593–3601.

Groszmann, M., Bylstra, Y., Lampugnani, E.R., y Smyth, D.R. (2010). Regulation of tissue-specific expression of *SPATULA*, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 61, 1495- 1508.

Groszmann, M., Paicu, T., Alvarez, J.P., Swain, S.M., y Smyth, D.R. (2011). *SPATULA* and *ALCATRAZ*, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for *Arabidopsis* gynoecium and fruit development. *Plant J.* 68, 816-829.

Groszmann, M., Paicu, T., Smyth, D.R. (2008). Functional domains of *SPATULA*, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 55, 40-52.

Heijmans, K., Ament, K., Rijpkema, A. S., Zethof, J., Wolters-Arts, M., Gerats, T., y Vandebussche, M. (2012). Redefining C and D in the petunia ABC. *Plant Cell* 24, 2305–2317.

Heisler, M., Atkinson, A., Bylstra, Y., Walsh, R., y Smyth, D. (2001). *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* 128, 1089-1098.

Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M.D., Karunairetnam, S., Gleave, A.P., y Laing, W.A. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods.* 18, 1-13.

Hewitt, Y. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. farnham. *Commonwealth Agricultural Bureau.*

Bibliografia

- Hileman, L.C., Drea, S., Martino, G., Litt, A., e Irish, V.F.** (2005). Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant J.* 44, 334-341.
- Ikeda, M., y Ohme-Takagi, M.** (2009). A novel group of transcriptional repressors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 50, 970-975.
- Ikeuchi, M., Yamaguchi, T., Kazama, T., Ito, T., Horiguchi, G., y Tsukaya, H.** (2011). *ROTUNDIFOLIA4* regulates cell proliferation along the body axis in Arabidopsis shoot. *Plant Cell Physiol.* 52, 59-69.
- Immink, R.G., Gadella, T.W. Jr., Ferrario, S., Busscher, M., y Angenent, G.C.** (2002a). Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2416-2421.
- Ishikawa, M., Ohmori, Y., Tanaka, W., Hirabayashi, C., Murai, K., Ogihara, Y., Yamaguchi, T., y Hirano, H.Y.** (2009). The spatial expression patterns of *DROOPINGLEAF* orthologs suggest a conserved function in grasses. *Genes Genet. Syst.* 84, 137-146.
- Islam, M. A., Lütken, H., Haugslie, S., Blystad, D.R., Torre, S., Rolcik, J., Rasmussen, S.K., Olsen, J.E., y Clarke, J.L.** (2013). Overexpression of the *AtSHI* gene in poinsettia, *Euphorbia pulcherrima*, results in compact plants. *PLoS ONE* 8, e53377.
- Kaufmann, K., Pajoro, A., y Angenent, G.C.** (2010). Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nat. Rev. Genet.* 11, 830-42.
- Kim, S. G., Lee, S., Kim, Y. S., Yun, D. J., Woo, J. C., y Park, C. M.** (2010). Activation tagging of an Arabidopsis *SHI-RELATED SEQUENCE* gene produces abnormal anther dehiscence and floral development. *Plant Mol. Biol.* 74, 337-351.
- Koncz, C., y Schell, J.** (1986). The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genetics* 204, 383-396.
- Krizek, B.A. y Fletcher, J.C.** (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat. Rev. Genet.* 6, 688-698.

- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K.** (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Long, J. A., Fridborg, I., y Sundberg, E.** (2002). *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development. *Development* 129, 4707–4717.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Magnus Eklund, D., y Sundberg, E.** (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J.* 47, 99–111.
- Larsson, E., Franks, R. G., y Sundberg, E.** (2013). Auxin and the *Arabidopsis thaliana* gynoecium. *J. Exp. Bot.* 64, 2619–2627.
- Larsson, E., Roberts, C. J., Claes, A. R., Franks, R. G., y Sundberg, E.** (2014). Polar auxin transport is essential for medial versus lateral tissue specification and vascular-mediated valve outgrowth in Arabidopsis gynoecia. *Plant Physiol.* 166, 1998–2012.
- Lee, J.Y., Baum, S. F., Oh, S.-H., Jiang, C.-Z., Chen, J.C., y Bowman, J. L.** (2005). Recruitment of *CRABS CLAW* to promote nectary development within the eudicot clade. *Development* 132, 5021–5032.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., y Yanofsky, M.F.** (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404 ,766-770.
- Liljegren, S.J., Roeder, A.H.K., Kempin, S.A., Gremski, K., Østergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K., y Yanofsky, M.F.** (2004) Control of fruit patterning in Arabidopsis by *INDEHISCENT*. *Cell* 116 ,843-853.
- Lucero, L.E., Uberti-Manassero, N.G., Arce, A.L., Colombatti, F., Alemano, S.G., y Gonzalez, D.H.** (2015). *TCP15* modulates cytokinin and auxin responses during gynoecium development in Arabidopsis. *Plant J.* 84, 267-282.
- Marsch-Martinez, N., y de Folter, S.** (2016). Hormonal control of the development of the gynoecium. *Curr. Opin. Plant Biol* 29, 104–114.
- Marsch-Martínez, N., Zúñiga-Mayo, V.M., Herrera-Ubaldo, H., Ouwerkerk, P.B.F., Pablo-Villa, J., Lozano-Sotomayor, P., Greco, R., Ballester, P., Balanzá, V., Kuijt, S.J.H., Meijer, A.H., Pereira, A., Ferrándiz, C. y de Folter, S.** (2014). The

Bibliografía

NTT transcription factor promotes replum development in Arabidopsis fruits. *Plant J.* 80, 69–81.

Mara, C.D., Huang, T., e Irish, V.F. (2010). The Arabidopsis floral homeotic proteins APETALA3 and PISTILLATA negatively regulate the *BANQUO* genes implicated in light signaling. *Plant Cell.* 22, 690-702.

Martínez-Fernández, I., Sanchís, S., Marini, N., Balanza, V., Ballester, P., Navarrete-Gómez, M., Oliveira, A.C., Colombo, L., y Ferrándiz, C. (2014). The effect of *NGATHA* altered activity on auxin signaling pathways within the Arabidopsis gynoecium. *Front. Plant Sci.* 5, 210.

Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., y Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12, 345–364.

Moubayidin, L., y Østergaard, L. (2014). Dynamic control of auxin distribution imposes a bilateral-to-radial symmetry switch during gynoecium development. *Curr. Biol.* 24, 2743–2748.

Narita, N.N., Moore, S., Horiguchi, G., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Goodrich, J., y Tsukaya, H. (2004). Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38, 699-713.

Navarrete-Gómez, M.L. (2011) Análisis funcional de los genes reguladores del desarrollo del fruto y su relación con las vías reguladas por auxinas. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.

O'Maoileidigh, D. S., Graciet, E., y Wellmer, F. (2014). Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytol.* 201, 16–30.

Orashakova, S., Lange, M., Lange, S., Wege, S., y Becker, A. (2009). The *CRABSCLAW* ortholog from California poppy (*Eschscholzia californica*, Papaveraceae), *EcCRC*, is involved in floral meristem termination, gynoecium differentiation and ovule initiation. *Plant J.* 58, 682–693.

Pabón-Mora, N., Ambrose, B. A., y Litt, A. (2012). Poppy *APETALA1/FRUITFULL* orthologs control flowering time, branching, perianth identity, and fruit development. *Plant Physiol.* 158, 1685–1704.

- Pabón-Mora, N., Wong, G. K., y Ambrose, B. A.** (2014). Evolution of fruit development genes in flowering plants. *Front. Plant Sci.* 5, 300.
- Pan, I. L., McQuinn, R., Giovannoni, J. J., y Irish, V. F.** (2010). Functional diversification of *AGAMOUS* lineage genes in regulating tomato flower and fruit *Development . J. Exp. Bot.* 61, 1795–1806.
- Pelaz, S., Tapia-López, R., Álvarez-Buylla, E.R., Yanofsky, M.F.** (2001). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 11 ,182-184.
- Pfannebecker, K. C., Lange, M., Rupp, O., y Becker, A.** (2017a). An evolutionary framework for carpel developmental control genes. *Mol. Biol. Evol.* 34, 330–348.
- Pfannebecker, K. C., Lange, M., Rupp, O., y Becker, A.** (2017b). Seed plant specific gene lineages involved in carpel development. *Mol. Biol. Evol.* 34, 925–942.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E., y Yanofsky, M.F.** (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424 ,85-88.
- Rajani, S., y Sundaresan, V.** (2001) The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* 11, 1914-1922.
- Ratcliff, F., Martín-Hernández, A. M., y Baulcombe, D. C.** (2001). Technical advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 25, 237–245.
- Reddy, G.V.** (2014). Fluorescence activated cell sorting of shoot apical meristem cell types. *Methods Mol Biol.* 1110, 315-321.
- Redeí, G.P.** (1962) Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 47, 443-460.
- Reyes-Olalde, J. I., Zúñiga-Mayo, V. M., Chávez-Montes, R. A., Marsch-Martínez, N., y de Folter, S.** (2013). Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends Plant Sci.* 18, 644–655.
- Robles, P., y Pelaz, S.** (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 633-643.
- Saitou, N., y Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.

Bibliografía

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual 2nd de. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sawa, S., Ito, T., Shimura, Y. y Okada, K.** (1999a). *FILAMENTOUS FLOWER* controls the formation and development of arabidopsis inflorescences y floral meristems. *Plant Cell* 11, 69-86.
- Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E.H., y Okada, K.** (1999b). *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of Arabidopsis, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes Dev.* 1, 1079–1088.
- Schena, M., y Yamamoto, K.R.** (1988). Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast. *Science.* 19, 965-967.
- Schuster, C., Gaillochet, C., Lohmann, J.U.** (2015) Arabidopsis *HECATE* genes function in phytohormone control during gynoecium development. *Development* 142,3343-3350.
- Scutt, C. P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Finet, C. y Dumas, C.** (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *J. Exp. Bot.* 57, 2143-2152.
- Siegfried, K.R., Eshed, Y., Baum, S.F., Otsuga, D., Drews, G.N., y Bowman, J.L.** (1999). Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development.* 126, 4117-4128.
- Sohlberg, J. J., Myrenas, M., Kuusk, S., Lagercrantz, U., Kowalczyk, M., Sandberg, G., y Sundberg, E.**(2006). *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. *Plant J.* 47, 112–123.
- Soltis, D.E., Chanderbali, A.S., Kim, S., Buzgo, M., y Soltis, P.S.** (2007) The ABC model and its applicability to basal angiosperms. *Annals of Botany* 100, 155-163.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S.J., Ljung, K., Robles, P., Galván-Ampudia, C.S., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, M.F., y Østergaard, L.** (2009) A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 459 ,583-586.
- Ståldal, V., Cierlik, I., Chen, S., Landberg, K., Baylis, T., Myrenas, M., Sundström, J.F., Eklund, D.M., Ljung, K., y Sundberg, E.**(2012). The *Arabidopsis thaliana*

transcriptional activator *STYLISH1* regulates genes affecting stamen development, cell expansion and timing of flowering. *Plant Mol. Biol.* 78, 545–559.

Ståldal, V., Sohlberg, J., Eklund, D., Ljung, K., y Sundberg, E. (2008). Auxin can act independently of *CRC*, *LUG*, *SEU*, *SPT* and *STY1* in style development but not apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. *New Phytol.* 180, 798–808.

Sundberg, E., y Østergaard, L. (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1:a001628.

Theissen, G. (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol.* 4, 75-85.

Theissen, G. y Melzer, R. (2007) Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Annals of Botany* 100 ,603-619.

Theissen, G. y Saedler, H. (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature* 409 ,469-471.

Tian, C., y Jiao, Y. (2015). A systems approach to understand shoot branching. *Curr. Plant Biol.* 3–4, 13–19.

Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W., y Su, Z. (2017). agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucl. Acids Res.* gkx382.

Trigueros, M. (2008). Análisis funcional de los factores de transcripción *TOWER-OF-PISA1* y *TOWER-OF-PISA2* y su implicación en el desarrollo del gineceo de Arabidopsis. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.

Trigueros, M., Navarrete-Gómez, M., Sato, S., Christensen, S. K., Pelaz, S., Weigel, D., Yanofsky, M.F., y Ferrándiz, C. (2009). The *NGATHA* genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium. *Plant Cell* 21, 1394–1409.

Vialette-Guiraud, A. C., Andres-Robin, A., Chambrier, P., Tavares, R., y Scutt, C. P. (2016). The analysis of gene regulatory networks in plant evo-devo. *J. Exp. Bot.* 67, 2549–2563.

Wege, S., Scholz, A., Gleissberg, S., y Becker, A. (2007). Highly efficient virus-induced gene silencing (VIGS) in California Poppy (*Eschscholzia californica*): an evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model plants. *Ann. Bot.* 100, 641–649.

Bibliografía

- Weigel, D. y Meyerowitz, E.M.** (1994). Morphology and development of *leafy* mutants. In: Bowman JL (ed) *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. Springer, New York, pp 206-211.
- Wen, J., Lease, K.A., y Walker, J.C.** (2004). DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters Arabidopsis development. *Plant J.* 37, 668-77.
- Wen, J., y Walker, J.** (2006). DVL peptides are involved in plant development. In: JK Abba, ed, *Handbook of Biologically Active Peptides*. Burlington: Academic Press, 17–22.
- Yamada, T., Yokota, S. Y., Hirayama, Y., Imaichi, R., Kato, M., y Gasser, C. S.** (2011). Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of *YABBY* genes in angiosperms. *Plant J.* 67, 26–36.
- Yamaguchi, T., Nagasawa, N., Kawasaki, S., Matsuoka, M., Nagato, Y., y Hirano, H. Y.** (2004). The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 16, 500–509.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., y Meyerowitz, E.M.** (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346, 35-39.
- Yellina, A. L., Orashakova, S., Lange, S., Erdmann, R., Leebens-Mack, J., y Becker, A.** (2010). Floral homeotic C function genes repress specific B function genes in the carpel whorl of the basal eudicot California poppy (*Eschscholzia californica*). *Evodevo* 1, 13.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., y Sheen, J.** (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565-72.
- Youssef, H. M., Eggert, K., Koppolu, R., Alqudah, A. M., Poursarebani, N., Fazeli, A., Sakuma, S., Tagiri, A., Rutten, T., Govind, G., Lundqvist, U., Graner, A., Komatsuda, T., Sreenivasulu, N., y Schnurbusch, T.**(2017). VRS2 regulates hormone-mediated inflorescence patterning in barley. *Nat. Genet.* 49, 157–161.
- Yuo, T., Yamashita, Y., Kanamori, H., Matsumoto, T., Lundqvist, U., Sato, K., Ichii, M., Jobling, S.A., y Taketa, S.** (2012). A *SHORT INTERNODES (SHI)* family

transcription factor gene regulates awn elongation and pistil morphology in barley. *J. Exp. Bot.* 63, 5223–5232.

Zawaski, C., Kadmiel, M., Ma, C., Gai, Y., Jiang, X., Strauss, S. H., Busov, V.B.(2011). *SHORT INTERNODES*-like genes regulate shoot growth and xylem proliferation in *Populus*. *New Phytol.* 191, 678–691.

Zhai, Z., Jung, H.I, y Vatamaniuk, O.K. (2009). Isolation of protoplasts from tissues of 14-day-old seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *J Vis Exp.* 17, 1149.

Zúñiga-Mayo, V.M., Marsch-Martínez, N. y de Folter, S. (2012). JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 71, 314–326.



ANEXOS



ANEXO I: Genes diana que varían su expresión al inducir conjuntamente STY y NGA en fondo silvestre y fondo *crc*.

Dianas activadas en fondo STY-GR GR-NGA/wt y reprimidas en

STY-GR GR-NGA/*crc*

LOCUS	NOMBRE	FUNCIÓN MOLECULAR
AT3G07090	---	Putativa tiolpeptidasa
AT1G26800	---	Unión de iones cinc
AT1G19250	FMO1	Actividad monooxigenasa
AT1G74310	HSP101	Actividad ATPasa
AT1G30070	---	---
AT5G54165	---	---
AT5G59720	HSP18,2	Enlace proteico
AT5G52640	HSP90,1	Unión a ATP Unión a proteínas
AT1G67360	LDAP1/ SRP1	---
AT5G05410	DREB2A	Unión de ADN de la región reguladora de la transcripción
AT5G25450	---	Transporte de electrones mitocondriales
AT5G35320	---	Actividad monooxigenasa
AT2G19310	---	---
AT1G14200	---	Unión de iones cinc
AT1G66080	---	---
AT1G52560	---	---
AT3G16050	PDX1.2	Actividad de heterodimerización de proteínas
AT3G63350	AT-HSFA7B	Factor de transcripción
AT3G24500	MBF1C	Factor de transcripción
AT5G12110	---	Actividad del factor de elongación de la traducción
AT3G12580	HSP70	Unión de ATP
AT2G46240	BAG6	Unión a chaperonas
AT5G48570	ROF2	Unión de calmodulina
AT4G21320	HSA32	Actividad catalítica
AT1G16030	Hsp70b	Unión de ATP
AT2G20560	---	Unión de proteínas desplegadas
AT2G26150	HSFA2	Factor de transcripción
AT4G12400	---	Unión (en general)
AT2G32120	HSP70T-2	Unión de ATP
AT4G27670	HSP21	---
AT1G54050	---	---
AT1G71000	---	---
AT1G07400	---	---
AT5G37670	---	---
AT4G25200	HSP23,6-	---

AT5G12020	HSP17,6II	---
AT3G51910	HSFA7A	Factor de transcripción
AT1G59860	---	Unión a proteína
AT3G46230	HSP17,4	Unión a proteína
AT4G10250	ATHSP22,0	---
AT5G12030	HSP17,6A	Unión de proteínas desplegadas
AT2G29500	---	---
AT1G53540	---	---
AT3G12050	---	Activador de ATPasa, unión de chaperonas
AT5G64510	---	---
AT1G33160	EG455649	---
AT1G03070	---	Unión a Glutamato
AT5G56030	HSP81-2	Unión de ATP, Unión a proteínas
AT3G09350	Fes1A	Unión a la proteína Hsp70
AT4G24415	AK226543	---
AT3G49580	LSU1	---
AT4G29905	---	---
AT1G17870	EGY3	Actividad metalopeptidasa
AT1G07350	---	Unión a nucleótido
AT3G08970	ATERDJ3A	Actividad oxidoreductasa
AT4G23493	---	---
AT5G47610	---	Unión de iones cinc
AT3G10020	AT3G10020	---
AT2G07722	AT2G07722	---
AT2G01010	TA25786_3702	---
AT2G25510	AT2G25510	---
AT4G27657	AT4G27657	---

Dianas reprimidas en fondo STY-GR GR-NGA/wt y activadas en STY-GR GR-NGA/crc

LOCUS	NOMBRE	FUNCIÓN MOLECULAR
AT2G45580	CYP76C3	Unión a oxígeno e ión hierro
AT4G30140	CDEF1	Actividad hidrolasa
AT3G48520	CYP94B3	Unión a oxígeno e ión hierro
AT2G24210	TPS10	Actividad de myrcenesintasa, actividad (E) - beta - ocimenosintasa
AT1G61680	TPS14	Actividad de S-linaloolsintasa
AT1G30710	---	Actividad portadora de electrones, actividad oxidorreductasa, actividad catalítica
AT4G37800	XTH7	Actividad hidrolasa
AT5G20390	---	Actividad hidrolasa
AT4G33860	---	Actividad hidrolasa
AT5G23270	STP11	Transportador transmembrana de carbohidratos
AT3G55870	---	Actividad oxo-ácido-liasa y antranilatosintasa
AT1G54070	---	---
AT1G54070	---	---
AT3G44250	CYP71B8	Actividad portadora de electrones y monooxigenasa, unión a iones de hierro y oxígeno
AT3G49110	PRXCA	Actividad peroxidasa. Involucrado en la elongación celular
AT1G53830	PME2	Actividad pectinesterasa
AT1G66120	AAE11	Actividad catalítica
AT1G14280	PKS2	---
AT2G29340	---	Actividad oxidorreductasa y catalítica
AT1G65875	NP184114	---
AT1G30795	---	---
AT5G63450	CYP94B1	Actividad portadora de electrones y monooxigenasa, unión a iones de hierro y oxígeno
AT1G20190	EXPA11	Ivolucrado en la modificación de la pared celular en el crecimiento celular multidimensional
AT1G70720	---	Actividad inhibidora de la pectinesterasa, Actividad pectinesterasa
AT5G50040	---	Actividad inhibidora de la pectinesterasa, Actividad pectinesterasa
AT3G10320	---	
AT3G02100	---	Actividad transferasa de grupos glicosilo
AT4G36820	---	Calcio uniporter
AT5G45950	---	Actividad hidrolasa
AT1G14420	AT59	Actividad pectatoliasa
AT5G28690	---	---
AT1G01980	ATSEC1A	Actividad portadora de electrones, oxidorreductasa y catalítica
AT3G01530	MYB57	Factor de transcripción
AT1G66210	---	Unión idéntica a proteínas, Actividad endopeptidasa de tipo serina
AT1G48020	PME11	Actividad inhibidora de la pectinesterasa
AT3G28810	---	---
AT5G12960	---	Actividad catalítica
AT1G17540	---	Actividad quinasa
AT3G05610	---	Actividad inhibidora de la enzima, Actividad pectinesterasa
AT1G05580	CHX23	Actividad proton e hidrógeno antiporter
AT2G24450	FLA3	---
AT5G39400	PTEN1	Actividad fosfatasa
AT5G48140	---	Actividad poligalacturonasa
AT3G54800	---	Unión a lípidos

AT5G04180	ACA3	Actividad carbonato deshidratasa, Unión a iones cinc
AT3G17060	---	Actividad pectinesterasa
AT1G11770	---	Actividad portadora de electrones y oxidoreductasa, Unión a FAD, Actividad catalítica
AT1G60740	---	Actividad oxidoreductasa y antioxidante
AT1G51250	---	---
AT1G35310	MLP168	---
AT2G26850	---	---
AT4G24640	APPB1	Actividad inhibidora de la pectinesterasa, Actividad pectinesterasa
AT2G16730	BGAL13	Actividad beta-galactosidasa
AT3G20580	COBL10	---
AT4G25780	---	---
AT3G52600	CWINV2	Actividad hidrolasa



Dianas activadas en fondo STY-GR GR-NGA/wt y que no varían en fondo STY-GR GR-NGA/crc

LOCUS	NOMBRE	FUNCIÓN MOLECULAR
AT4G21650	---	Unión idéntica a proteínas, Actividad endopeptidasa de tipo serina
AT1G47610	---	Unión a nucleótido
AT3G22540	---	---
AT4G32208	Hsp70	---
AT1G59730	TH7	---
AT4G31910	---	Actividad transferasa
AT3G14360	---	Actividad triacilglicerol lipasa
AT3G62700	MRP10	Actividad ATPasa, acoplada al movimiento transmembrana de sustancias
AT2G22680	WAVH1	Actividad de ubiquitina-proteína ligasa, unión a proteínas, unión a iones de cinc
AT3G55710	---	Actividad transferasa
AT3G26760	---	Actividad oxidoreduc-tasa y catalítica
AT1G53543	---	---
AT5G56030	HSP81-2	Unión a ATP
AT5G59310	LTP4	Unión a lípidos
AT4G22020	TC371919	---
AT4G21320	HSA32	Actividad catalítica
AT1G14260	---	Actividad de ubiquitina-proteína ligasa, Unión a proteínas y a iones de cinc
AT1G72660	---	Unión a GTP
AT5G38980	---	---
AT5G15160	BNQ2	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT4G09530	---	---
AT2G42320	---	---
AT5G05220	---	---
AT1G69690	TCP15	Factor de transcripción
AT5G28030	DES1	Unión del fosfato de piridoxal, Actividad cisteína sintasa y catalítica
AT4G12900	---	Actividad catalítica
AT5G60630	---	---
AT1G22160	---	---
AT5G61660	---	---
AT4G08150	KNAT1	Factor de transcripción
AT1G18330	EPR1	Factor de transcripción
AT1G67365	ASY1	---
AT1G49320	USPL1	---
AT5G28020	CYSD2	Actividad cisteína sintasa
AT5G63660	PDF2.5	---
AT2G22460	---	---
AT2G35950	EDA12	---
AT5G05220	---	---
AT4G27520	E---DL2	Actividad portadora de electrones, Unión de iones de cobre
AT5G57785	---	---
AT1G68780	---	Unión a proteína
AT1G75430	BLH11	Factor de transcripción
AT3G10190	---	Unión a ión calcio

AT1G75750	GASA1	---
AT4G13540	---	---
AT3G17130	---	Actividad inhibidora de la pectinesterasa, Actividad pectinesterasa
AT3G14360	---	Actividad triacilglicerol lipasa
AT3G54390	---	Factor de transcripción
AT5G11320	YUC4	Actividad oxido-reductasa y monooxigenasa
AT3G28270	---	---



Dianas reprimidas en fondo STY-GR GR-NGA/wt y que no varían en fondo

STY-GR GR-NGA/crc

LOCUS	NOMBRE	FUNCIÓN MOLECULAR
AT3G53232	RTFL1	Familia de las proteínas DVL
AT1G51820	---	Actividad quinasa
AT2G35930	PUB23	Actividad ubiquitina-proteína ligasa
AT1G43160	RAP2.6	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT2G36690	AT2G36690	Actividad oxido-reductasa
AT1G80130	---	Unión
AT5G46350	WRKY8	Factor de transcripción
AT5G49690	---	Actividad transferasa
AT3G53160	UGT73C7	Actividad UDP –glicosil-transferasa
AT3G15450	---	---
AT4G25110	MC2	Actividad de la endo-peptidasa tipo cisteína
AT4G31800	WRKY18	Factor de transcripción
AT2G46450	CNGC12	Unión a nucleótidos cíclicos, Actividad de canales catiónicos
AT1G19550	---	Actividad glutatión deshidro-genasa (ascorbato)
AT1G27020	---	---
AT3G49780	PSK4	Factor del crecimiento
AT1G03850	GRXS13	Actividad disulfuro oxido-reductasa de proteínas
AT5G49520	WRKY48	Factor de transcripción
AT1G76930	EXT4	Constituyente estructural de la pared celular
AT4G24975	---	---
AT4G16740	TPS03	Actividad (E)-beta-ocimenesintasa
AT1G29440	SAUR63	---
AT3G46880	---	---
AT3G50260	CEJ1	Factor de transcripción
AT5G47220	ERF2	Factor de transcripción
AT3G19615	---	---
AT1G29510	SAUR68	---
AT2G36770	---	Actividad de UDP –glicosil-transferasa
AT5G49700	---	---
AT1G53180	---	---
AT2G41880	GK-1	Actividad guanilato quinasa
AT3G25180	CYP82G1	Actividad portadora de electrones y mono-oxigenasa, Unión a oxígeno e iones de hierro
AT3G30775	ERD5	Actividad prolina des-hidrogenasa
AT5G56540	AGP14	---
AT2G22760	---	Factor de transcripción
AT4G25490	CBF1	Factor de transcripción
AT3G28420	---	---
AT1G53980	---	---
AT5G64750	ABR1	Factor de transcripción
AT2G43820	UGT74F2	Actividad de UDP –glicosil-transferasa
AT2G30550	---	Actividad triacilglicerol lipasa
AT4G18430	RABA1e	Unión a GTP
AT3G26830	PAD3	Actividad mono-oxigenasa, Unión al oxígeno
AT2G27500	---	Unión a cationes, Actividad hidrolasa y catalítica

AT4G34770	---	---
AT2G29440	GSTU6	Actividad de la glutatión transferasa
AT1G29450	---	---
AT3G15370	EXPA12	---
AT1G36640	---	---
AT2G30600	---	Unión a proteína
AT3G12203	scpl17	Actividad carboxipeptidasa de tipo serina
AT3G18950	---	Unión a nucleótido
AT5G59530	---	Transferencia de grupos glicosilo
AT2G30400	OPF2	---
AT1G35350	---	---
AT2G20880	ERF53	Factor de transcripción
AT5G37600	GSR1	Actividad glutamato - amoníaco ligasa, Unión a iones de cobre
AT3G63380	---	Actividad ATPasa
AT3G62930	---	Actividad disulfurooxidoreductasa de la proteína
AT1G10140	---	---
AT5G62040	BFT	Unión de fosfatidil-etanolamina
AT1G74080	MYB122	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT5G54470	BBX29	Factor de transcripción, Unión a ión cinc
AT5G61590	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT4G16000	---	---
AT3G09940	MDHAR	Actividad NADH
AT1G69920	GSTU12	Actividad de la glutatión transferasa
AT3G25730	EDF3	Factor de transcripción
AT2G46640	---	---
AT1G21890	---	---
AT2G38240	---	Actividad oxidoreductasa
AT1G51805	---	Actividad serina / treonina quinasa de proteína
AT4G15680	---	Actividad de arsenatoredutasa (glutaredoxina) y disulfuro de proteína oxidoreductasa
AT5G16170	---	---
AT2G18700	TPS11	Transferencia de grupos glicosilo
AT4G24040	TRE1	Actividad alfa-trehalasa
AT1G43910	---	Actividad ATPasa, Unión a nucleótido
AT1G52830	IAA6	Factor de transcripción
AT2G36220	---	---
AT3G47090	---	Actividad serina / treonina quinasa de proteína
AT2G30840	---	Actividad de 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa
AT1G68320	MYB62	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT3G24518	HSFC1	---
AT3G16800	---	Actividad serina / treonina fosfatasa de la proteína y catalítica
AT4G15670	---	Actividad de arsenatoredutasa (glutaredoxina)
AT4G08770	Prx37	Actividad portadora de electrones y peroxidasa
AT1G10585	---	Factor de transcripción
AT2G01850	EXGT-A3	Actividad hidrolasa, actuando sobre enlaces glicosilo
AT3G25780	AOC3	Actividad aleno-óxido ciclasa
AT5G56980	---	---
AT4G22980	---	---
AT4G21870	---	---
AT1G10070	BCAT-2	Actividad de las aminoácidos transaminasas de cadena ramificada y catalítica

AT5G46330	FLS2	Actividad serina / treonina quinasa de proteína, Unión a proteína
AT4G29740	CKX4	Actividad de la citoquinina deshidrogenasa y amina oxidasa
AT4G18540	---	---
AT1G66700	PXMT1	Actividad metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina
AT4G18205	---	---
AT4G38840	---	---
AT3G59900	ARGOS	---
AT4G13790	---	---
AT1G74010	---	Actividad estricoidinasintasa
AT3G47210	---	---
AT4G35160	---	Actividad metiltransferasa y dimerización de proteína
AT3G06070	---	---
AT2G28510	---	Factor de transcripción
AT1G69530	EXPA1	---
AT1G69880	TH8	---
AT4G17460	HAT1	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT1G13670	---	---
AT2G21210	---	---
AT4G25410	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT2G29470	GSTU3	Actividad de la glutatión transferasa
AT4G15120	---	---
AT3G47110	---	Actividad serina / treonina quinasa de proteína, Unión a ATP
AT2G18860	---	Unión a proteína
AT3G50310	MAPKKK20	Actividad serina / treonina quinasa de proteína, Unión a ATP
AT1G77530	---	Actividad de O-metiltransferasa
AT2G28085	---	---
AT2G43510	TH1	Actividad inhibidora de la endopeptidasa de tipo serina
AT5G17300	RVE1	Factor de transcripción
AT2G22850	bZIP6	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT1G68360	---	Factor de transcripción
AT4G21400	CRK28	Actividad quinasa
AT1G15670	---	---
AT1G62300	WRKY6	Factor de transcripción
AT4G18197	PUP7	Actividad transportadora de purina transmembrana
AT1G51850	---	Actividad quinasa
AT2G39510	---	---
AT3G15500	NAC3	Factor de transcripción
AT2G17880	---	Unión a proteínas de choque térmico
AT2G15080	RLP19	Unión a proteína, Actividad quinasa
AT4G27300	---	Actividad quinasa
AT2G39200	MLO12	Unión a calmodulina
AT1G32900	---	Transferencia de grupos glicosilo
AT4G19810	---	Actividad quitinasa, hidrolasa y catalítica
AT4G10380	NIP5;1	Actividad transportadora de boro, de arsenito transmembrana y canal de agua
AT2G37900	---	Actividad transportadora
AT4G15700	---	Actividad disulfurooxidoreductasa de la proteína
AT5G05440	PYL5	Unión a proteína
AT3G52490	---	Unión a proteína
AT1G07500	---	---

AT1G05420	OFPI2	---
AT1G15580	IAA5	Factor de transcripción
AT5G57220	CYP81F2	Actividad portadora de electrones y monooxigenasa, Unión a iones hierro y a oxígeno
AT4G22470	---	Unión a lípidos
AT1G02230	NAC004	Factor de transcripción
AT5G53780	---	---
AT4G23700	CHX17	Actividad antiportadora de protones
AT5G28237	---	Actividad piridoxal fosfato, triptófano sintasa y catalítica
AT2G40330	PYL6	---
AT5G44050	---	Actividad transportadora
AT1G76680	OPR1	Actividad de la 12-oxofitodienoato reductasa
AT3G28610	---	Actividad ATPasa y nucleósido-trifosfatasa
AT2G34500	CYP710A1	Actividad de esteroides desaturasa C-22 y unión a oxígeno
AT3G57020	---	Actividad estripectidinasintasa
AT1G66940	---	---
AT3G28600	---	Actividad ATPasa y nucleósido-trifosfatasa
AT1G25560	TEM1	Factor de transcripción
AT4G36110	SAUR9	---
AT4G02810	FAF1	---
AT5G47370	HAT2	Factor de transcripción, Actividad represora de la transcripción, Unión a DNA
AT4G25990	CIL	---
AT3G09950	---	---
AT5G13700	PAO1	Unión a FAD, Actividad poliamina oxidasa
AT3G62960	---	Actividad disulfurooxidoreductasa de la proteína
AT5G55930	OPT1	Actividad del transportador oligopeptídico
AT2G47270	---	Factor de transcripción
AT4G33770	---	Actividad inositol o fosfatidilinositol quinasa
AT1G02860	NLA	Actividad ubiquitina-proteína ligasa
AT1G57590	---	Actividad carboxilesterasa
AT3G52450	PUB22	Actividad ubiquitina-proteína ligasa
AT1G64405	---	---
AT1G76680	OPR1	Actividad de la 12-oxofitodienoato reductasa
AT5G28610	---	---
AT4G28040	---	---
AT4G37730	bZIP7	Factor de transcripción
AT4G35165	---	---
AT4G23060	IQD22	Unión a calmodulina
AT5G57760	---	---
AT2G33020	RLP24	Unión a proteína, Actividad quinasa
AT5G43180	---	---
AT1G77120	ADH1	Actividad alcohol deshidrogenasa
AT1G77525	---	---
AT2G01300	---	---
AT1G61260	---	---
AT3G01470	HB-1	Factor de transcripción, Unión a DNA, Homodimerización de proteínas
AT5G52570	BCH2	Actividad beta-anillo hidroxilasa caroteno
AT1G50610	---	Actividad serina / treonina quinasa de proteína, Unión a ATP
AT1G44830	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT3G25560	NIK2	Actividad serina / treonina quinasa de proteína, Unión a ATP y a proteína

AT4G13790	SAUR25	---
AT5G67310	CYP81G1	Actividad portadora de electrones y monooxigenasa, Unión a oxígeno, hemo e iones de hierro
AT5G01740	NTF2	---
AT5G64770	RGF9	---
AT3G11680	---	Transporte de aluminio
AT2G21880	RAB7A	Unión a GTP
AT3G17110	---	---
AT4G36570	RL3	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT1G08500	ENODL18	Actividad portadora de electrones, Unión a iones de cobre
AT1G10990	---	---
AT3G48360	BT2	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT1G61120	TPS04	Actividad (E, E) -gerililalinosintasa
AT4G32300	SD2-5	Unión a carbohidratos, Actividad quinasa
AT3G06490	MYB108	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT2G27690	CYP94C1	Actividad de ácidos grasos (omega-1) -hidroxilasa, Unión de oxígeno
AT2G27505	---	---
AT5G59080	---	---
AT1G71140	---	Actividad transportadora
AT3G26200	CYP71B22	Actividad portadora de electrones y monooxigenasa, Unión a oxígeno, hemo e iones de hierro
AT5G64190	---	---
AT1G56650	PAP1	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT5G05965	---	---
AT1G75450	CKX5	Actividad de la citoquinina deshidrogenasa
AT1G72450	JAZ6	---
AT4G06746	RAP2.9	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT1G02610	---	Unión a proteína e iones cinc
AT5G12010	---	---
AT4G17245	---	Unión a proteína e iones cinc
AT1G71880	SUC1	Transportador transmembrana de carbohidratos
AT5G54300	---	---
AT2G34610	---	---
AT1G61800	GPT2	Transporte transmembrana de Glucosa-6-fosfato
AT1G21050	---	---
AT4G16515	RGF6	---
AT4G21840	MSRB8	Actividad de péptido-metionina- (S) -S-óxido-reductasa
AT2G43000	NAC042	Factor de transcripción
AT5G51070	ERD1	Actividad nucleósido-trifosfatasa y ATPasa, Unión a nucleótidos, proteínas y ATP
AT4G21200	GA2OX8	Actividad giberelina-2-beta-dioxigenasa
AT5G38240	---	Actividad serina / treonina quinasa de proteína, Unión a ATP
AT3G49120	PRXCB	Actividad peroxidasa
AT2G21220	---	Unión a calmodulina
AT4G33420	---	Portador de electrones, Actividad peroxidasa
AT5G37600	GSR 1	Actividad glutamato - amoníaco ligasa, Unión a iones de cobre
AT4G37770	ACS8	Actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa
AT3G53450	---	---
AT5G13330	Rap2.6L	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT1G77380	AAP3	Actividad del transportador transmembrana de aminoácidos
AT3G47500	CDF3	Factor de transcripción, Unión a DNA y a proteína
AT3G51060	STY1	Factor de transcripción, Actividad de heterodimerización de proteínas

AT2G33780	---	---
AT5G51190	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT3G16530	---	Unión a carbohidrato
AT5G08350	---	---
AT3G30775	ERD5	Actividad prolina deshidrogenasa
AT1G04370	ERF14	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT5G26340	MSS1	Transportador de carbohidrato transmembrana
AT3G57760	---	Actividad de la proteína tirosina quinasa
AT3G63110	IPT3	Actividad transferasa, Unión a ATP
AT1G31490	---	Actividad transferasa y amina oxidasa, Unión a iones cobre y quinona
AT4G23550	WRKY29	Factor de transcripción
AT1G29460	---	---
AT2G45570	CYP76C2	Actividad portadora de electrones y monooxigenasa, Unión a oxígeno, hemo e iones de hierro
AT4G16730	TPS02	Actividad liasa, Unión a iones de magnesio
AT1G78850	---	Unión a azúcares
AT3G32980	---	Actividad portadora de electrones y peroxidasa, Unión hemo
AT3G60290	---	Actividad oxidoreductasa
AT3G12320	---	---
AT4G38850	SAUR15	---
AT4G18170	WRKY28	Factor de transcripción
AT1G32910	---	Actividad transferasa
AT3G49620	DIN11	Actividad oxidoreductasa, Unión a iones de hierro
AT5G40450	RBB1	---
AT1G71520	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT4G21680	NRT1.8	Actividad transportadora
AT5G65165	SDH2-3	Actividad portadora de electrones y succinato deshidrogenasa
AT3G13660	---	---
AT4G27310	---	Factor de transcripción, Unión a iones cinc
AT3G50650	---	Factor de transcripción
AT1G15380	---	Actividad lactoilglutaciónliasa
AT3G25760	AOC1	Actividad aleno-óxido ciclasa
AT1G17420	LOX3	Actividad oxidoreductasa
AT1G31770	ABCG14	Actividad ATPasa
AT1G09540	MYB61	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT5G20250	DIN10	Actividad hidrolasa
AT2G26380	---	Unión a proteína
AT5G44380	---	Actividad oxidoreductasa y catalítica, Unión a FAD
AT4G32880	HB-8	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT5G65790	MYB68	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT2G30540	---	Actividad disulfurooxidoreductasa de la proteína
AT1G65390	PP2-A5	Unión a carbohidratos
AT3G62150	PGP21	Actividad ATPasa
AT3G22820	---	---
AT3G15356	---	Unión a carbohidratos
AT1G07430	HAI2	Actividad serina / treonina fosfatasa de proteína y catalítica
AT3G44830	---	Actividad transferasa
AT2G41800	TEB	---
AT4G25480	DREB1A	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT2G18196	---	Unión a iones metálicos

AT3G23430	PHO1	---
AT3G24520	HSFC1	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT1G01490	---	Unión a iones metálicos
AT4G29610	---	Actividad hidrolasa y catalítica, Unión a iones cinc
AT3G62690	ATL5	Unión a proteínas y a iones cinc
AT1G35200	NP306627	---
AT3G14440	NCED3	Actividad 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
AT3G53260	PAL2	Actividad fenilalanina amoniaco-liasa
AT5G21960	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT2G34960	CAT5	Actividad transportadora transmembrana de aminoácidos catiónicos
AT1G61360	---	Unión a carbohidratos
AT1G18140	LAC1	Actividad de lacasa
AT1G22400	UGT85A1	Actividad transferasa de grupos hexosilo
AT1G77520	---	Actividad de O-metiltransferasa
AT5G16080	CXE17	Actividad hidrolasa
AT1G68740	PHO1;H1	---
AT1G09240	NAS3	Actividad de nicotianaminasintasa
AT2G38310	PYL4	---
AT5G60950	COBL5	---
AT3G28007	---	---
AT5G57480	---	Actividad nucleósido-trifosfatasa y ATPasa, Unión a nucleótidos y a ATP
AT5G13750	ZIFL1	Actividad antiportadora de hidrógeno
AT5G22300	NIT4	Actividad nitrilo hidratasa, nitrilasacioalanina y nitrilasa
AT4G18340	---	Actividad hidrolasa y catalítica, Unión a cationes
AT5G43175	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT3G27500	---	Unión a proteína y a iones cinc
AT5G51810	GA20OX2	Actividad giberelina 20-oxidasa
AT4G15530	PPDK	Actividad quinasa
AT2G38290	AMT2	Transportador transmembrana de amonio
AT3G04070	NAC047	Factor de transcripción
AT5G23350	---	---
AT1G67810	SUFE2	Activador enzimático
AT5G24540	BGLU31	Actividad hidrolasa y catalítica, Unión a cationes
AT3G06020	---	---
AT5G50720	HVA22E	---
AT3G07460	---	---
AT4G15690	---	Actividad arsenatereductasa (glutaredoxina) y disulfurooxidoreductasa proteínica
AT3G13650	---	---
AT4G01750	RGXT2	Actividad de UDP - xilosiltransferasa
AT1G80120	---	---
AT3G56500	---	---
AT4G35180	LHT7	Transportador transmembrana de aminoácidos
AT1G09350	GoS3	Transferencia de grupos hexosilo y glicosilo
AT1G47890	RLP7	Unión a proteína, Actividad quinasa
AT2G30990	---	---
AT1G36622	---	---
AT1G07150	MAPKKK13	Actividad serina / treonina quinasa de proteína, Unión a ATP
AT4G28140	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
AT5G17860	CAX7	Actividad transportadora de sodio

AT3G60490	---	Factor de transcripción, Unión a DNA
-----------	-----	--------------------------------------

Dianas activadas en fondo STY-GR GR-NGA/*crc* y que no varían en fondo

STY-GR GR-NGA/*wt*

LOCUS	NOMBRE	FUNCIÓN MOLECULAR
AT5G39880	---	---
AT3G62230	---	---
AT5G50830	---	---
AT3G09530	EXO70H3	Unión a proteína
AT2G47030	VGDH1	Actividad inhibidora de la enzima y pectinesterasa

Dianas reprimidas en fondo STY-GR GR-NGA/*crcy* que no varían en fondo

STY-GR GR-NGA/*wt*

LOCUS	NOMBRE	FUNCIÓN MOLECULAR
AT2G36440	---	---
AT4G14630	GLP9	Unión de iones de manganeso, actividad de reserva de nutrientes
AT1G53620	---	---
AT3G21520	DMPI	---
AT1G13520	---	---
AT5G42530	---	---
AT1G33720	CYP76C6	Actividad portadora de electrones y monooxigenasa, Unión a oxígeno, hemo e iones de
AT2G07715	---	Componente estructural del ribosoma
AT1G52900	---	Receptor transmembrana
AT2G22795	---	---
AT3G28210	PMZ	Unión ión cinc
AT3G62190	---	Unión a proteína de choque térmico
AT2G01010	---	---
AT1G56660	---	---
AT3G10020	---	---
AT1G74710	EDS16	Actividad isoquorismatosintasa
AT2G25510	---	---
AT1G31580	ECS1	---

ANEXO II: Cebadores

Nombre	Secuencia	Propósito	Secuencia que aparece	Orientación
NbSTY1For	ATGTCTGGTTTTTTTACTACTAG	Amplificar CDS NbSRS-L1	NbSRS-L1	F
NbSTY1Rev	TTAAGGTCTTGGCGGTGGA	Amplificar CDS NbSRS-L1	NbSRS-L1	R
NbSTY2For	ATGGCTGGGTCTTTTCACTAG'	Amplificar CDS NbSRS-L2	NbSRS-L2	F
NbSTY2Rev	TCAAAATCTTGCAGGATGTG	Amplificar CDS NbSRS-L2	NbSRS-L2	R
NbSTY3For	ATGGCTGGGTCTTTTCACTAGG	Amplificar CDS NbSRS-L3	NbSRS-L3	F
NbSTY3Rev	TCAAGATCTTGCAGGAGGTGG	Amplificar CDS NbSRS-L3	NbSRS-L3	R
EcSTYFor	ATGGCAGGATTTTCACTAGGTGGA	Amplificar CDS EcSRS-L	EcSRS-L	F
EcSTYRev	TTATGATCTTGGTGGTGGGAAG	Amplificar CDS EcSRS-L	EcSRS-L	R
NbSTY1ProbeFor	GGATCCTTGAGTTTGAGAGCTGAT	Amplificar fragmento NbSRS-L1	NbSRS-L1 (438pb)	F
NbSTY1ProbeRev	TTAATAGGAGTTGGATATACCG	Amplificar fragmento NbSRS-L1	NbSRS-L1 (438pb)	R
NbSTY2Probe1For	ATGGCTGGGTCTTTTCACTAG	Amplificar fragmento NbSRS-L2	NbSRS-L2 (407pb)	F
NbSTY2Probe1Rev	GGATCCCTGCTCTTACAACAAGTC	Amplificar fragmento NbSRS-L2	NbSRS-L2 (407pb)	R

NbSTY2Probe2For	GGATCCTACTTGGGTTCCAGCAGC	Amplificar fragmento NbSRS-L2	NbSRS-L2 (537pb)	F
NbSTY2Probe2Rev	TCAAAATCTTGCAGGATGTG	Amplificar fragmento NbSRS-L2	NbSRS-L2 (537pb)	R
NbSTY3ProbeFor	ATGGCTGGGTTCTTTTCACTAG	Amplificar fragmento NbSRS-L3	NbSRS-L3 (536pb)	F
NbSTY3ProbeRev	AGAAGAACCACTTGGATGGATCC	Amplificar fragmento NbSRS-L3	NbSRS-L3 (536pb)	R
EcSTYProbeFor	ATGGCAGGATTTTCACTAGGTGGA	Amplificar fragmento EcSRS-L	EcSRS-L (294pb)	F
EcSTYProbeRev	GGATCCCTTGAAGATGATTCATCCGAAC	Amplificar fragmento EcSRS-L	EcSRS-L (294pb)	R
qNbSTY1For	AGTGGTGGGGGTATGAATTGTC	qRT-PCR NbSRS-L1	NbSRS-L1	F
qNbSTY1Rev	TTGGCACTGAAATCCTCTGC	qRT-PCR NbSRS-L1	NbSRS-L1	R
qNbSTY2For	ACCCACATACAAAGGGTTCG	qRT-PCR NbSRS-L2	NbSRS-L2	F
qNbSTY2Rev	CTTGGTTGCCACAATCTTGA	qRT-PCR NbSRS-L2	NbSRS-L2	R
qNbSTY3For	TGGTGGTGAACCAGTAGTGC	qRT-PCR NbSRS-L3	NbSRS-L3	F
qNbSTY3Rev	GATCTTGCAGGAGGTGGAAA	qRT-PCR NbSRS-L3	NbSRS-L3	R
qNbEF1For	GCACTGTGATTGATGCCCT	qRT-PCR NbSRS-L	EF1	F
qNbEF1Rev	GGACAGCACAGTCAGCTTGG	qRT-PCR NbSRS-L	EF1	R
qEcSTYFor	CCAAAACCCACCTCAAGAAA	qRT-PCR EcSRS-L	EcSRS-L	F

qEcSTYRev	CGAACCCGCGTTAGTACTTC -3'	qRT-PCR EcSRS-L	EcSRS-L	R
qEcACTFor	AAGAGCTCGAAACTGCCAAG	qRT-PCR EcSRS-L	ACTINA	F
qEcACTRev	CATCGGGAAGCTCGTAATTT'	qRT-PCR EcSRS-L	ACTINA	R
oSTY-GR F	GGCAATTTCCCGGCGGAGGTG	Genotipar STY1:GR	STY1:GR (743pb)	F
oSTY-GR R	CTCCACCCCAGAGCAAATGCC	Genotipar STY1:GR	STY1:GR (743pb)	R

