



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología

“Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo
del fruto y su relación con las vías reguladas por
auxinas”

Maria Luisa Navarrete Gómez

Directora:

Cristina Ferrándiz Maestre

Valencia, 2011



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

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo del fruto y su relación con la vías reguladas por auxinas” ha sido realizada por María Luisa Navarrete Gómez, en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), y constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a treinta de marzo de dos mil once.

Fdo. Cristina Ferrándiz Maestre

Resúmenes

El gineceo es, probablemente, el órgano floral más complejo. Se compone de diferentes tejidos y tipos celulares que, una vez fertilizados los óvulos, proporcionan el principal componente estructural del fruto. Además de su gran importancia económica, el fruto representa una innovación clave de las Angiospermas, responsable en gran medida de su éxito evolutivo, ya que proporciona protección a las semillas en desarrollo y asegura su posterior dispersión. Por todo ello, son numerosos los estudios que se han llevado a cabo con la finalidad de conocer las bases genéticas de la diferenciación y la diversidad morfológica del fruto.

En *Arabidopsis* se han identificado muchos de los genes necesarios para la morfogénesis del fruto y la formación de los tejidos necesarios para la dispersión de las semillas, aunque en la mayoría de los casos no se conocen con precisión las rutas genéticas implicadas en estos procesos. Por ello es importante ampliar los estudios genéticos y moleculares encaminados a desvelar las interacciones funcionales entre los genes implicados, así como identificar nuevos factores con funciones clave en la morfogénesis del gineceo.

En la presente tesis se ha llevado a cabo la caracterización funcional de la pequeña subfamilia de factores de transcripción NGATHA (NGA) de *Arabidopsis*, y se ha estudiado el papel que desempeñan estos factores en las rutas genéticas responsables de la morfogénesis del gineceo. Los resultados obtenidos han contribuido a mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos genéticos y moleculares implicados en este proceso.

Para la caracterización funcional de los genes NGA se han identificado y caracterizado mutantes de pérdida de función para cada uno de estos loci, y se han generado y analizado combinaciones múltiples de estas mutaciones. Estos estudios han puesto de manifiesto el papel esencial que los genes NGA desempeñan en la morfogénesis de los tejidos apicales del gineceo en *Arabidopsis*, y en particular en la especificación del estilo y del estigma. El análisis de los patrones de expresión temporal y espacial de los genes NGA muestra que su expresión tiene lugar en dominios que experimentan una proliferación activa y coincide, en general, con regiones que acumulan niveles altos de auxinas.

Para profundizar en la relación entre los genes NGA y las rutas de señalización de auxinas se han realizado diferentes análisis, como el estudio de las respuestas clásicas a auxinas en los mutantes nga, la caracterización del efecto fenotípico de las auxinas y de inhibidores del transporte de auxinas en estos mutantes, y el análisis de expresión de genes implicados en la biosíntesis de auxinas, como los genes YUCCA (YUC), en los mutantes nga. Los resultados obtenidos indican que los fenotipos observados en el gineceo de los mutantes nga probablemente son debidos a una menor síntesis de auxinas en la región apical del gineceo como consecuencia de la falta de inducción de los genes YUC en este dominio. Por tanto, los factores NGA parecen estar implicados en la biosíntesis de auxinas a través de la regulación de los genes YUC. Además de las auxinas, los genes NGA podrían regular respuestas a brasinosteroides en la raíz, ya que se ha demostrado la interacción física entre las proteínas NGA y BRX.

Así mismo, se ha llevado a cabo un exhaustivo análisis genético para determinar el papel de los genes NGA en las rutas que dirigen la morfogénesis del gineceo. Los estudios realizados con combinaciones múltiples de mutantes, tanto de pérdida como de ganancia de función, junto con análisis de expresión, han hecho posible una mejor comprensión del papel y de la posición de los genes NGA en estas rutas. Del análisis fenotípico de los mutantes correspondientes y de la similitud de sus patrones de expresión se deduce que los factores de transcripción de la familia STY/SHI tienen funciones similares en este proceso a las de los factores NGA, pese a no estar relacionados estructuralmente. En este trabajo se muestra que estas dos familias probablemente no se regulan mutuamente, sino que actúan de manera cooperativa sobre dianas comunes. Además se muestra que STY1 y NGA3 no interactúan de forma directa a nivel de proteína, siendo necesaria la presencia de un tercer factor. CRABS CLAW, perteneciente a la familia YABBY, ha sido identificado como este tercer factor al menos en un determinado contexto. Los resultados obtenidos indican que un posible trímero NGA/STY1/CRC sería el responsable específico de la formación del estilo.

Se muestra también que los genes NGA participan en la regulación de genes que dirigen la formación de la zona de dehiscencia y la apertura del fruto y que también parecen tener un papel en la formación de las regiones apicales del gineceo. Los análisis genéticos realizados indican que los factores NGA podrían estar implicados en la inducción de genes de la zona de dehiscencia como SHATTERPROOF (SHP) o INDEHISCENT (IND) e interferir con la activación del gen de identidad de valva FRUITFULL (FUL). Este efecto diferencial en la regulación de SHP/IND y FUL podría depender de la formación de complejos proteicos de los factores NGA con YABBY3 y posiblemente otros factores YABBY.

El gineceu és, probablement, l'òrgan floral més complex. Es compon de diferents teixits i tipus cel·lulars que, un cop fertilitzats els òvuls, proporcionen el principal component estructural del fruit. A més de la seua gran importància econòmica, el fruit representa una innovació clau de les Angiospermes, responsable en gran mesura del seu èxit evolutiu, ja que proporciona protecció a les llavors en desenvolupament i assegura la seua posterior dispersió. Per tot això, són nombrosos els estudis que s'han dut a terme amb la finalitat de conèixer les bases genètiques de la diferenciació i la diversitat morfològica del fruit.

En *Arabidopsis* s'han identificat molts dels gens necessaris per a la morfogènesi del fruit i la formació dels teixits necessaris per a la dispersió de les llavors, en la majoria dels casos no es coneixen amb precisió les rutes genètiques implicades en aquests processos. Per això és important ampliar els estudis genètics i moleculars encaminats a desvetllar les interaccions funcionals entre els gens implicats, així com identificar nous factors amb funcions clau en la morfogènesi del gineceu.

En la present tesi s'ha dut a terme la caracterització funcional de la xicoteta subfamília de factors de transcripció NGATHA (NGA) d'*Arabidopsis*, i s'ha estudiat el paper que exerceixen aquests factors en les rutes genètiques responsables de la morfogènesi del gineceu. Els resultats obtinguts han contribuït a millorar el coneixement dels mecanismes genètics i moleculars implicats en aquest procés.

Per a la caracterització funcional dels gens NGA s'han identificat i caracteritzat mutants de pèrdua de funció per a cada un d'aquests loci, i s'han generat i analitzat combinacions múltiples d'aquestes mutacions. Aquests estudis han posat de manifest el paper essencial que els gens NGA exerceixen en la morfogènesi dels teixits apicals del gineceu en *Arabidopsis*, i en particular en l'especificació de l'estil i l'estigma. L'anàlisi dels patrons d'expressió temporal i espacial dels gens NGA mostra que la seua expressió té lloc en dominis que experimenten una proliferació activa i coincideix, en general, amb regions que acumulen nivells alts de auxines.

Per aprofundir en la relació entre els gens NGA i les rutes de senyalització de auxines s'han realitzat diferents anàlisis, com l'estudi de les respostes clàssiques a auxines en els mutants *nga*, la caracterització de l'efecte fenotípic de les auxines i d'inhibidors del transport de auxines en aquests mutants, i l'anàlisi d'expressió de gens implicats en la biosíntesi de auxines, com els gens YUCCA (YUC), en els mutants *nga*. Els resultats obtinguts indiquen que els fenotips observats en el gineceu dels mutants *nga* probablement són deguts a una menor síntesi de auxines a la regió apical del gineceu com a conseqüència de la falta d'inducció dels gens YUC en aquest domini. Per tant, els factors NGA semblen estar implicats en la biosíntesi de auxines a través de la regulació dels gens YUC. A més de les auxines, els gens NGA podrien regular respostes a brassinoesteroides en l'arrel, ja que s'ha demostrat la interacció física entre les proteïnes NGA i BRX.

Així mateix, s'ha dut a terme un exhaustiu anàlisi genètic per a determinar el paper dels gens NGA en les rutes que dirigeixen la morfogènesi del gineceu. Els estudis realitzats amb combinacions múltiples de mutants, tant de pèrdua com de guany de funció, juntament amb anàlisis d'expressió, han fet possible una millor comprensió del paper i de la posició dels gens NGA en aquestes rutes. De l'anàlisi fenotípic dels mutants corresponents i de la similitud dels seus patrons d'expressió es dedueix que els factors de transcripció de la família STY / SHI tenen funcions similars en aquest procés a les dels factors NGA, tot i no estar relacionats estructuralment. En aquest treball es mostra que aquestes dues famílies probablement no es regulen mútuament, sinó que actuen de manera cooperativa sobre dianes comuns. A més es mostra que STY1 i NGA3 no interaccionen de forma directa a nivell de proteïna, i és necessària la presència d'un tercer factor. CRABS CLAW, pertanyent a la família YABBY, ha sigut identificat com este tercer factor, almenys en un determinat context. Els resultats obtinguts indiquen que un possible trímer NGA/STY1/CRC seria el responsable específic de la formació de l'estil.

Es mostra també que els gens NGA participen en la regulació dels gens que dirigeixen la formació de la zona de dehiscència i l'obertura del fruit i que també pareixen tindre un paper en la formació de les regions apicals del gineceu. Les anàlisis genètiques realitzades indiquen que els factors NGA podrien estar implicats en la inducció de gens de la zona de dehiscència com SHATTERPROOF (SHP) o INDEHISCENT (IND) i interferir amb l'activació del gen d'identitat de valva FRUITFULL (FUL). Aquest efecte diferencial en la regulació de SHP /IND i FUL podria dependre de la formació de complexos proteics dels factors NGA amb YABBY3 i possiblement altres factors YABBY.

The gynoecium is probably the most complex floral organ, composed of many different tissues and cell types, and, after fertilization of the ovules, provides the major structural component of the fruit. In addition to its huge economic importance, the fruit represents a key innovation of the Angiosperms, greatly responsible of their evolutionary success, since it provides protection for the developing seeds and ensures their dispersal. For these reasons, there is an incredible wealth of studies directed to unravel the genetic basis for fruit patterning and its morphological diversity.

Many of the genes required for fruit morphogenesis and seed dispersal have been identified in *Arabidopsis*, although, in most cases, the precise architecture of the genetic pathways involved is still far from understood. To get further insights on these questions, it is essential to expand the genetic and molecular studies directed to unravel the functional interactions among these genes, as well as to identify new factors with key roles in gynoecium morphogenesis still uncharacterized.

In this thesis, the functional characterization of the small NGATHA (NGA) subfamily of transcription factors of *Arabidopsis* has been carried out. Moreover, the position and role of the NGA factors in the genetic routes directing gynoecium morphogenesis has been studied. The results obtained have allowed to increase our knowledge on the genetic and molecular mechanisms of gynoecium patterning in *Arabidopsis*.

Functional characterization of the NGA genes has been performed by identifying and characterizing loss-of-function mutants in each loci, as well as through the generation of multiple combinations of these mutations. This work has revealed the essential role of the NGA genes in the morphogenesis of the apical tissues of the *Arabidopsis* gynoecium, in particular directing the specification of the style and the stigma. Spatial and temporal patterns of expression of the NGA genes have been determined. In general, NGA genes appear to be expressed in domains undergoing active proliferation, and showing, in general, an overlap with domains that accumulate auxin.

To obtain further insights on the relationship of the NGA genes and the auxin signaling pathways, different experiments were performed, such as the study of classic auxin responses in the *nga* mutants, the characterization of the phenotypic effect of auxin or auxin transport inhibitors in these mutants, or the expression analysis of genes involved in auxin biosynthesis, namely the YUCCA (YUC) genes, in *nga* mutants. Our results indicate that the gynoecium phenotypes of *nga* mutants are likely produced by the reduced synthesis of auxin in the apical region of the gynoecium, as a consequence of a failure to upregulate YUC genes in this domain. Therefore, NGA factors appear to be involved in auxin biosynthetic routes through YUC regulation. In addition to auxin, NGA genes may regulate brassinosteroid responses in the root, since physical interaction of NGA and BRX proteins has been revealed.

Genetic analyses of the role of NGA genes in the genetic pathways directing gynoecium morphogenesis has been carried out extensively. Multiple combinations of loss and gain-of-function mutants, as well as expression studies have allowed to better understand the role and position of the NGA genes in these routes. The unrelated STY/SHI family of transcription factors have similar roles to NGA genes as revealed by the phenotypes of the corresponding mutants and the similarity of their expression patterns. This work has shown that both families likely do not regulate each other, but act on common targets cooperatively. In this thesis, it has been shown that STY1 and NGA3 are not able to interact directly at the protein level unless a third factor, CRABS CLAW (CRC), belonging to the YABBY family, is present. Our results indicate that a putative NGA/STY1/CRC trimer is specifically responsible of style formation.

NGA genes have also been shown to participate in the regulation of genes directing dehiscence zone formation and fruit shattering, which also appear to have a role in apical gynoecium patterning. Genetic analyses indicate that NGA factors could be mediating the upregulation of dehiscence zone genes, such as SHATTERPROOF or INDEHISCENT, while interfering with the activation of the valve identity gene FRUITFULL. This differential effect on the regulation of SHP/IND and FUL could be mediated by the formation of protein complexes of NGA factors with YABBY3 and possibly other YABBY factors.

Índice.

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

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

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

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

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

Índice de tablas y figuras.

Páginas

Introducción.

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

Resultados.

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

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

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

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

ABREVIATURAS

%:	por ciento
°C:	grados centígrados
μF:	microfaradios
μg:	microgramos
μl:	microlitros
μM:	micromolar
Ω:	ohmios.
aa:	aminoácidos.
Amp ^r :	resistencia a ampicilina.
DNA:	ácido desoxirribonucleico.
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero.
ARNi:	ARN de interferencia
Basta:	glufosinato de amonio.
BCIP:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate.
BSA:	Sérum de albumina bovina.
CaMV 35S:	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.
cDNA:	DNA complementario.
cm:	centímetros.
Col-0:	ecotipo Columbia.
C-terminal:	carboxilo terminal.
DMSO:	dimetil sulfóxido.
DNasa:	desoxirribonucleasa.
dNTP:	desoxinucleósidos trifosfato.
DIG:	digoxigenina.
EDTA:	etilen-diamino-tetraacetato sódico.
EMS:	etilmetanosulfonato.
EST:	“expressed sequence tags”.
et al.:	y otros.
Fig.:	figura.
g:	gramos.
GFP:	proteína verde fluorescente (“green fluorescent protein”).
IAA:	ácido indolacético.
Kan ^r :	resistencia a kanamicina.
kb:	kilobases.
kg:	kilogramos.
lacZ:	β-galactosidasa.
LB:	medio Luria-Bertani.
Ler:	ecotipo Landsberg, portador de la mutación erecta.
m/v:	masa por volumen.
m:	metros.
M:	molar.
MES:	ácido 4-morfolino-etano-sulfónico.
mg:	miligramos.
min:	minutos.
ml:	mililitros.
mm:	milímetros.
mM:	milimolar.

MS:	medio de Murashige y Skoog.
NBT:	Nitro blue tetrazolium.
ng:	nanogramos.
NLS:	señal de localización nuclear (“Nuclear Localization Signal”).
nM:	nanomolar.
NPA:	ácido 1-N-naphtylphtalamico.
pág.:	página.
PAT:	transporte polar de auxinas (“Polar Auxin Transport”).
pb:	pares de bases.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (“Polimerase Chair Reaction”).
pp:	páginas.
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real.
RNasa:	ribonucleasa.
rpm:	revoluciones por minuto.
RLU:	unidades relativas de luz (“Relative Light Units”).
RT-PCR:	retrotranscripción seguida de PCR.
SAM:	meristemo apical del tallo (“Shoot Apical Meristem”).
SDS:	n-dodecil sulfato sódico.
seg:	segundos.
SEM:	microscopía electrónica de barrido (“Scanning Electron Microscopy”).
TAE:	Tris-acético-EDTA.
TBE:	Tris-borato-EDTA.
TE:	Tris-EDTA.
TER:	terminador.
Tetr ^r :	resistencia a tetraciclina.
tRNA:	RNA de transferencia.
U:	unidades.
UV:	ultravioleta.
v/v:	volumen por volumen.
V:	voltios.
W:	vatios.
WT:	silvestre.
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico.

Introducción

1. La flor de *Arabidopsis*.

En la flor de *Arabidopsis* los órganos florales están dispuestos en cuatro anillos concéntricos o verticilos (fig.1-A y B); en el primer verticilo, se disponen cuatro sépalos, en el segundo verticilo, cuatro pétalos blancos en posiciones alternas con respecto a los sépalos; en el tercer verticilo, seis estambres, que consisten en un filamento y una antera en su extremo distal, donde se produce el polen; y en el cuarto verticilo se encuentra el órgano reproductor femenino, el gineceo, el cual está compuesto por dos carpelos fusionados. El gineceo contiene los óvulos que, tras la fertilización, darán lugar a las semillas.

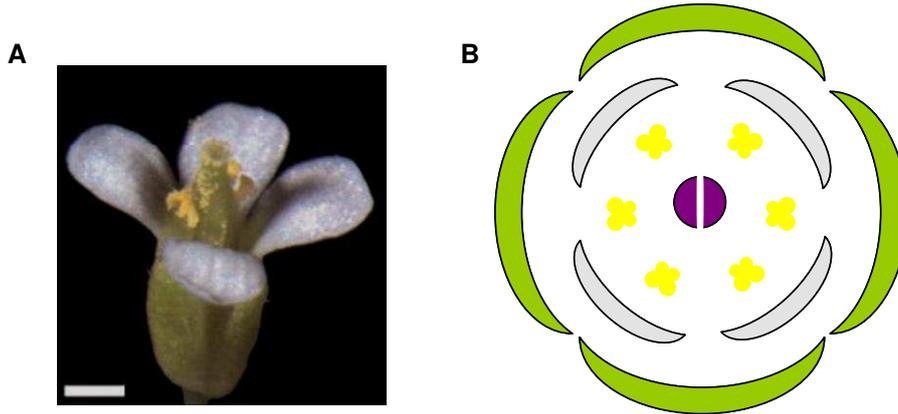


Figura 1. Flor de *Arabidopsis*. (A) Fotografía a bajo aumento de una flor, donde se pueden observar los cuatro verticilos florales. (B) Diagrama floral. Cada uno de los órganos florales se representa de un color. Sépalos (verde), pétalos (gris), estambres (amarillo) y carpelo (morado).

El gineceo es probablemente el órgano más complejo de la planta, dado que está formado por muchos tipos celulares y tejidos diferentes. Tiene un papel fundamental en la continuidad de la especie, ya que está implicado en la recepción y germinación del polen, asegurando la fertilización de los óvulos. Tras la fertilización de los óvulos el gineceo pasa a denominarse fruto. Se trata de una estructura especializada en proteger las semillas durante su desarrollo y dispersarlas cuando estén maduras.

El fruto de *Arabidopsis*, al final de su maduración, se seca y abre permitiendo así la diseminación de las semillas. Para que se produzca la dehiscencia del fruto es necesario que tenga lugar la diferenciación de varios tipos celulares especializados que contribuyen a la apertura de la silicua cuando alcanza la madurez (Robles y Pelaz 2005; Roeder y Yanofsky; 2005; Ferrándiz et al., 1999). El fruto seco y dehiscente de *Arabidopsis thaliana*, también llamado silicua, es representativo de más de tres mil especies de la familia de las brassicáceas.

2. Desarrollo floral.

Tanto el desarrollo floral como la morfogénesis del gineceo han sido descritos en detalle. Smyth et al. (1990) dividieron el desarrollo temprano de la flor de *Arabidopsis* desde el inicio hasta la antesis en 13 estadios. Esta división ha sido utilizada como referencia para describir el efecto de numerosas mutaciones en genes de *Arabidopsis*. Ferrándiz et al. (1999), basándose en estos estadios, describieron los

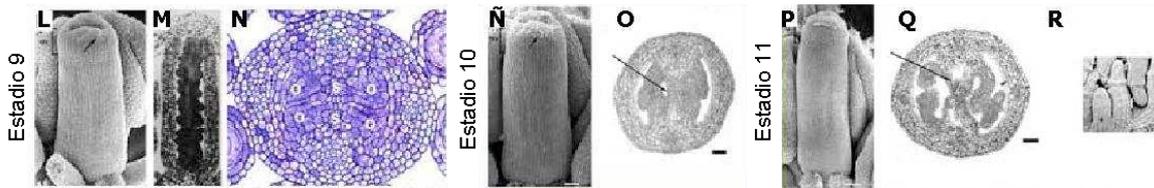
principales cambios que tienen lugar durante el desarrollo del gineceo añadiendo observaciones realizadas por otros autores (fig. 2).

En líneas generales, el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis* se inicia con la formación, en el centro de la flor, de un primordio que aparece alrededor del estadio 5 (Smyth et al., 1999). Posteriormente se forma una invaginación central y el primordio se elonga como un cilindro hueco (estadio 6 al 8). En estadios posteriores se forman dos protuberancias meristemáticas internas en posición medial que se desarrollan hacia el interior del gineceo, y que darán lugar a la placenta y los óvulos. Estas protuberancias se fusionan a lo largo del centro del gineceo para formar una pared denominada septum. Poco antes de antesis se termina de cerrar la zona apical y se empiezan a diferenciar los tejidos localizados en esta región. En antesis, momento en el que tiene lugar la apertura de la flor y la dehiscencia de las anteras para liberar el polen, los tejidos necesarios para la maduración y dehiscencia del fruto ya están presentes, aunque seguirán desarrollándose después de la fructificación (Bowman et al., 1999; Roeder y Yanosfky, 2005).

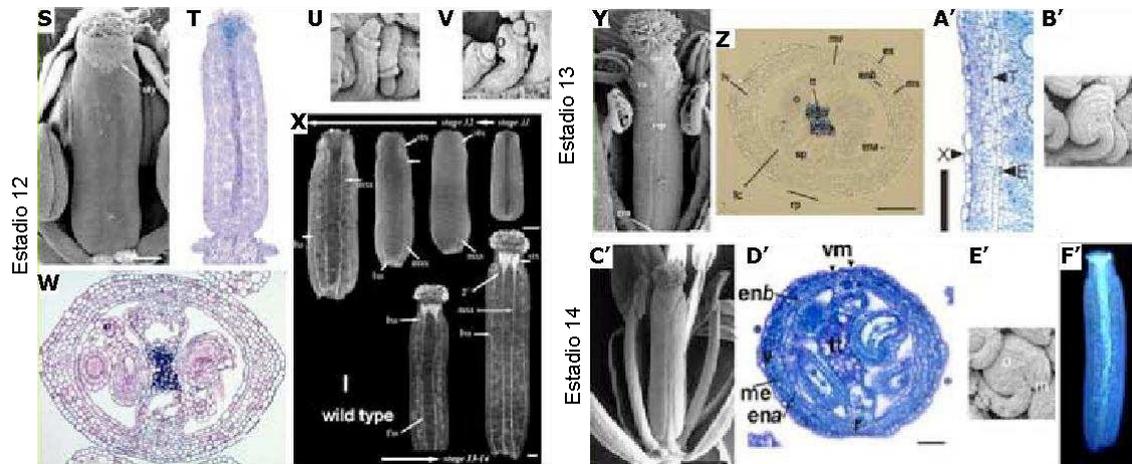
En la figura 2 se describen los estadios del desarrollo floral en *Arabidopsis*, indicándose los cambios morfológicos que marcan el inicio de cada estadio y los cambios en el desarrollo del gineceo que llevan asociado (adaptado de Roeder y Yanosfky, 2005).

Estadio	Cambio morfológico	Desarrollo del gineceo
1	Aparición del meristemo floral	
2	Formación del meristemo floral y separación del meristemo inflorescente.	
3	Aparición de los primordios de sépalos.	
4	Los sépalos sobrepasan el meristemo floral.	
5	Aparición de los primordios de pétalos y estambres.	
6	Los sépalos envuelven la yema floral.	Aparece el primordio del gineceo.
7	Los estambres elongan al formarse el pedúnculo basal.	El primordio del gineceo elonga y se desarrolla como un cilindro hueco.
8	Formación de los lóculos de los estambres.	Aparición de la placenta. Los haces vasculares mediales se diferencian.

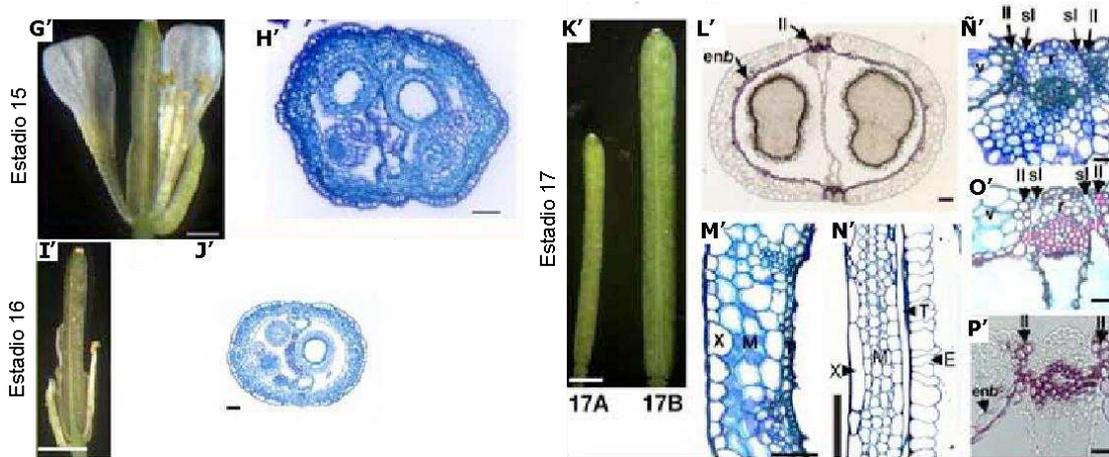
- | | | |
|----|--|---|
| 9 | Los pétalos desarrollan un pedúnculo basal. | Aparecen los primordios de los óvulos. En la pared del carpelo se diferencian el exocarpo, mesocarpo y endocarpo. Aparecen los haces vasculares laterales. |
| 10 | Los pétalos crecen al nivel de los estambres cortos. | Se cierra el gineceo en el extremo apical. Se forma el septum. |
| 11 | Aparecen las papilas estigmáticas. | Diferenciación de la epidermis del estilo y de las dos capas del endocarpo. Ramificación de los haces vasculares mediales en el extremo distal del gineceo. Los óvulos desarrollan el funículo. |



- | | | |
|----|--|--|
| 12 | Los pétalos crecen al nivel de los estambres largos. | Crecimiento general. Diferenciación del tracto transmisor. |
| 13 | Antesis. | Tiene lugar la polinización. |
| 14 | Las anteras largas sobrepasan el estigma. | Tienen lugar la fertilización. Surcos visibles a ambos lados del replum. |



- | | | |
|-----|--|---|
| 15 | El estigma crece sobrepasando las anteras largas. | Lignificación del xilema. |
| 16 | Sépalos y pétalos degeneran. | Expansión general. |
| 17A | Todos los órganos florales senescen a excepción del fruto. | Formación de la capa de separación del margen de la valva. Desarrollo de la cutícula externa del exocarpo; las células del endocarpo b (enb) forman el esclerénquima. |
| 17B | La silicua alcanza su tamaño final. | Comienza la lignificación del enb y de la zona de lignificación del margen de la valva. |



- 18 Las silicuas se vuelven amarillas.
 - 19 Dehiscencia de las valvas.
 - 20 Dispersión de las semillas.
- Degeneración del ena, el enb se lignifica completamente y el mesocarpo se seca.

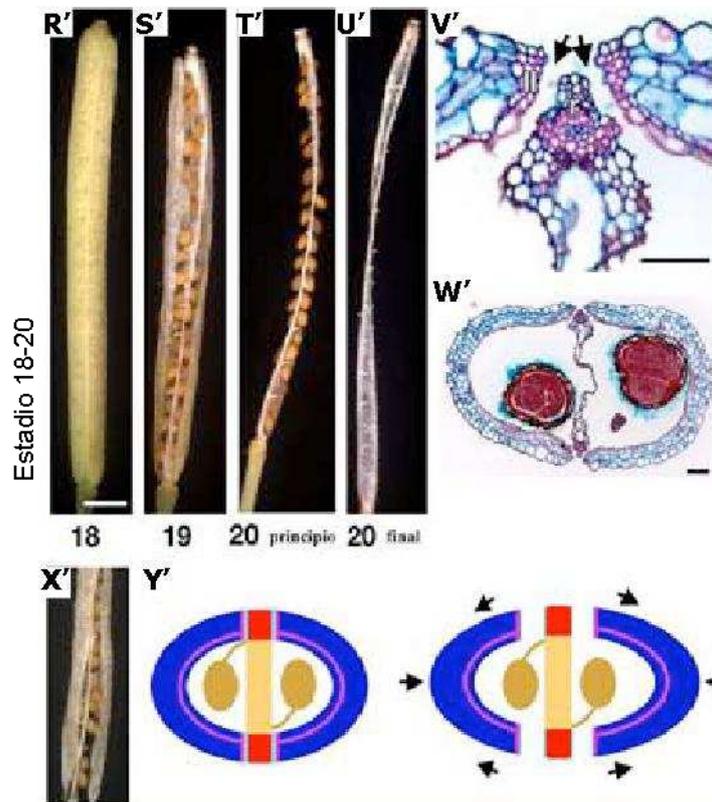


Figura 2. Estadios del desarrollo del gineceo y del fruto de *Arabidopsis*. Se pueden observar fotografías de microscopio electrónico de barrido, cortes histológicos, fotografías de campo oscuro o fotografías in vivo del gineceo de *Arabidopsis* a lo largo de sus diferentes estadios de desarrollo. También se hace referencia a los cambios morfológicos que marcan el inicio en cada uno de ellos. Modificado a partir de Roeder y Yanosfky (2005).

3. Estructura del fruto de *Arabidopsis*.

En el gineceo maduro (estadio 13 o antesis) se pueden diferenciar distintas regiones a lo largo de los diferentes ejes del desarrollo. En el eje apical-basal, de la parte superior a la base, se diferencian las siguientes partes: el estigma, una capa unicelular de células epidérmicas especializadas que forman las papilas estigmáticas;

un estilo corto y compacto; el ovario, que contiene los óvulos y que ocupa la mayor parte de la longitud del gineceo; y el ginóforo, una estructura corta y similar a un pedicelo, que une el ovario a la base de la flor (fig. 3-A).

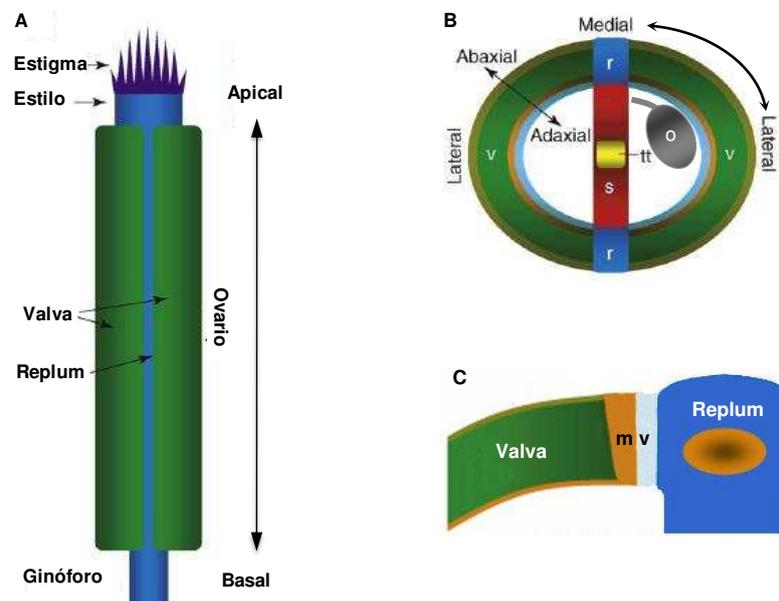


Figura 3. Estructura del gineceo de *Arabidopsis thaliana*. (A) Dibujo esquemático del gineceo de *Arabidopsis* y la distribución de los tejidos a lo largo del eje apical-basal, así como de otros tejidos señalados. (B) Esquema de una sección transversal del gineceo de *Arabidopsis*. Se señalan en colores distintos los tipos celulares presentes en las valvas (v): epidermis (verde oliva), mesófilo (verde), y endocarpo, diferenciándose el endocarpo a (marrón) y el endocarpo b (azul). En posición medial se señala el replum (r) (azul), el septum (s) (rojo), el tracto transmisor (tt) (amarillo) y los óvulos (o) (gris). Las orientaciones medio-lateral y abaxial-adaxial están indicadas. (C) Detalle esquemático de la región valva-margen de la valva (mv)-replum. Se señala en el margen de la valva la capa de lignificación (marrón) y la capa de separación (en azul claro). Modificado de Ostergaard, 2009.

En una sección transversal del ovario podemos ver la distribución de los tejidos a lo largo del eje medio-lateral: las valvas, en posición lateral, corresponden a las paredes de los dos carpelos y terminando en 2 o 3 filas de células más pequeñas que forman un hundimiento longitudinal llamado margen de la valva. En posición central o medial, es decir, en la zona donde se fusionan los carpelos, se encuentran internamente el septum, placenta y óvulos y externamente el replum. Los tejidos apicales (estilo y estigma) son de origen medial, como los que se acaban de nombrar, aunque sólo ocupen posiciones apicales y muestren simetría radial. El tracto transmisor, tejido especializado que facilita el crecimiento del tubo polínico, discurre a lo largo de toda la longitud del gineceo, comenzando en el estigma y continuando a través del centro del estilo y el septum.

Todos estos tejidos muestran polaridad adaxial-abaxial. Así pues, en la zona medial del ovario se encuentra el replum en posición abaxial, formando una estrecha capa entre los márgenes de la valva, mientras que septum, tracto transmisor, placenta y óvulos son adaxiales. Las valvas, en posición lateral, también muestran polaridad abaxial-adaxial, lo cual se refleja en las diferentes capas celulares que las constituyen (ver más abajo) (fig. 3-B) (Balanzá et al., 2006).

Tras la fecundación de los óvulos, las células del ovario se dividen y expanden, el fruto se alarga y se diferencian una serie de tipos celulares distintos, que permiten la maduración óptima y la dispersión de las semillas (Ferrándiz et al. 1999; Ferrándiz, 2002). Así, el fruto maduro consta fundamentalmente de un ovario elongado (Vivian-Smith y Koltunow, 1999). Internamente, la silicua consta de dos

cavidades o lóculos separados por un septum. Externamente se aprecian las valvas, el replum y los márgenes de las valvas (fig. 3-C) (Robles y Pelaz, 1999). Las valvas están constituidas por seis capas celulares: la epidermis externa o exocarpo, con células alargadas y estomas intercalados; tres capas de tejido fotosintético o mesocarpo; y el endocarpo, conformado por dos capas celulares, el endocarpo a o epidermis interna, y el endocarpo b o esclerénquima de apoyo (fig. 3-B). El replum es la acanaladura central que hay entre las valvas y corresponde a la parte externa del septum. El tercer componente estructural del fruto son los márgenes de las valvas, que se encuentran entre las valvas y el replum, y que al alcanzar la madurez se convierten en la zona de dehiscencia. Los márgenes de las valvas son visibles como una constricción en la frontera entre estas dos zonas, a consecuencia de la expansión más lenta de sus células durante la maduración del fruto. La diferenciación de tejidos requerida para la dehiscencia del fruto es, junto con el desarrollo de las semillas en el interior de la silicua, el principal proceso de desarrollo que ocurre durante el desarrollo del fruto en *Arabidopsis* (Robles y Pelaz, 1999). La zona de dehiscencia comprende una capa de células pequeñas que constituyen la zona de separación y que definen un plano longitudinal de ruptura a ambos lados del replum, y una zona adyacente de células lignificadas (fig. 3-C). El endocarpo b, la capa de células interna contigua a la epidermis, también se lignifica. Estas dos regiones de células lignificadas suministran, cuando el fruto maduro se seca, tensiones mecánicas que facilitan la apertura de la silicua (Ferrándiz, 2002). Una vez abierta la silicua, las semillas se desprenden por la fuerza mecánica del viento, la lluvia o el contacto físico.

4. Factores genéticos que controlan el desarrollo del gineceo.

4.1- De hoja a carpelo.

Los estudios genéticos y moleculares llevados a cabo en *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* y *Petunia hybrida* a partir de mutantes homeóticos, es decir, mutantes que presentaban la transformación de un tipo de órgano en otro distinto, permitieron postular un modelo ampliamente aceptado hoy en día, el modelo ABC, que permite explicar las interacciones genéticas que confieren la identidad de los distintos órganos florales (Bowman et al., 1991; Coen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994; Krizek y Fletcher, 2005; Theissen y Melzer, 2007). El modelo postula la existencia de tres funciones (A, B y C), según el cual la actividad combinada o individual de los productos de estos tres tipos de funciones especifica la identidad de los distintos órganos florales: la función A sola especifica los sépalos; las funciones A+B especifican los pétalos; B+C da lugar a estambres; y la función C sola da lugar a los carpelos (fig. 4). Este modelo explicaría los fenotipos de los mutantes homeóticos encontrados. Así, mutantes en la clase A, como es el caso de los mutantes *apetala2* (*ap2*) de *Arabidopsis*, darán lugar a transformaciones homeóticas en los dos primeros verticilos, diferenciándose carpelos en lugar de sépalos, y estambres en lugar de pétalos. Los mutantes de clase B, como son *pistillata* (*pi*) y *apetala3* (*ap3*) de *Arabidopsis*, presentarán sépalos en lugar de pétalos y carpelos en lugar de estambres. Finalmente, en los mutantes de clase C, como *agamous* (*ag*) en *Arabidopsis*, se producirá el cambio de identidad de estambres a pétalos y de carpelos a sépalos. La función C es además necesaria para la determinación del meristemo floral, de modo que en los mutantes correspondientes, se producen estructuras de flor-dentro-de-flor. Se ha propuesto, además de las funciones mencionadas, la existencia de dos funciones suplementarias, la D y la E. La función D especificaría la identidad de óvulo, como

una función reproductiva separada del desarrollo de los carpelos y de aparición posterior a la determinación de éstos. La función E correspondería a aquellos genes cuya expresión sería requerida en todos los verticilos florales, en combinación con las funciones A, B y C. Los mutantes que carecen de la función E, como es el caso de los mutantes múltiples *sepallata* (*sep*) de *Arabidopsis*, desarrollan órganos de tipo foliar en lugar de órganos florales. Es por ello que el modelo actual de la identidad de órganos florales se denomina más comúnmente como el modelo ABCE. Debido a que las proteínas correspondientes a las funciones homeóticas A, B, C y D forman complejos proteicos cuaternarios, el modelo también ha sido denominado por algunos autores como el modelo del cuarteto (Honma y Goto, 2000; Theissen y Saedler, 2001).

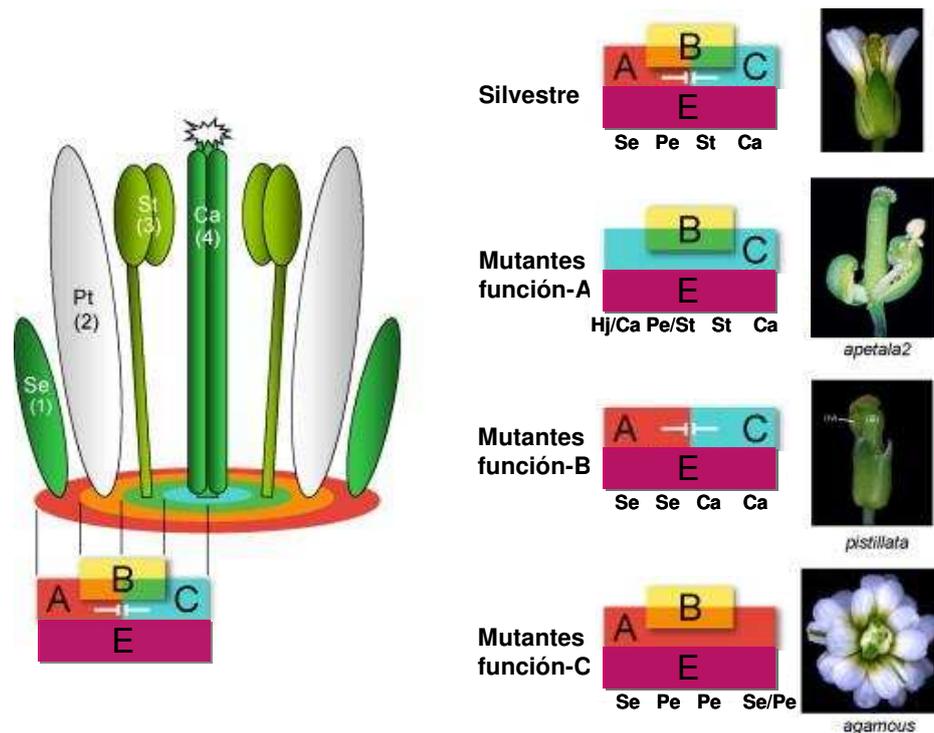


Figura 4. Modelo ABCE. Representación gráfica del modelo ABCE. La expresión única o aditiva de los genes homeóticos A, B o C repercute en la identidad del órgano floral. De modo que cuando se expresan los genes A y E darán lugar a sépalos (Se), si se expresan conjuntamente con los genes B, se formarán los pétalos (Pt), cuando se expresan los genes B, C y E, se forman los estambres (St) y cuando únicamente se expresan los genes C y E se formará el carpelo (Ca). A la derecha de la imagen se muestran algunos ejemplos de transformaciones homeóticas para cada una de las funciones. (Hj, hoja).

A pesar de su papel esencial en la especificación de la identidad del carpelo, AG no es el único factor implicado. De hecho, en el doble mutante *ap2 ag*, se desarrollan órganos con características carpeloides en el primer verticilo floral (Bowman et al., 1991). Esta observación llevó a proponer que factores adicionales podían especificar, al menos parcialmente, la identidad del carpelo en una ruta independiente de AG. Estos factores fueron identificados como los genes MADS-box SHATTERPROOF 1 (SHP1) y SHP2, que están principalmente implicados en la especificación de la identidad del margen de la valva (Liljegren et al., 2000, ver sección 4.2.c). En el cuádruple mutante *ap2 ag shp1 shp2* no se forma ninguna estructura carpeloide. Estudios de complementación han demostrado que las proteínas SHP y AG son muy similares a nivel funcional y que el hecho de que tengan

funciones diferentes durante el desarrollo del carpelo es debido, principalmente, a sus diferentes patrones de expresión (Pinyopich et al., 2003).

Otros dos factores de transcripción que parecen ser necesarios para el desarrollo del carpelo son los codificados por el gen de tipo bHLH (basic helix-loop-helix) SPATULA (SPT) y el gen de tipo YABBY (YAB) CRABS CLAW (CRC), los cuales parecen actuar por debajo de AG/SHP. Como ya se ha descrito, en el cuádruple mutante *ap2 ag shp1 shp2* no se forma ninguna estructura carpeloide y lo mismo ocurre con la pérdida de función de SPT y CRC en un fondo *ap2 ag* (Alvarez y Smyth, 1999), demostrando que estos dos genes son necesarios para el desarrollo de ciertos tejidos del gineceo. 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). Sin embargo, el principal fenotipo asociado con mutaciones *spt* son defectos en el desarrollo de los tejidos marginales del carpelo (Alvarez y Smyth, 1999). Por otro lado, CRC se expresa de modo específico en nectarios y carpelo. En el mutante *crc*, los nectarios están ausentes, el gineceo es más corto y ancho que en el silvestre y aparece parcialmente sin fusionar en la zona apical (Bowman y Smyth, 1999). En el doble mutante *crc spt*, el gineceo está completamente sin fusionar y presenta una reducción considerable en el número de óvulos y de los tejidos estilar y estigmático (Alvarez y Smyth, 1999). Apoyando la idea de que CRC y SPT intervienen en la función de identidad de carpelo junto con AG/SHP, Alvarez y Smyth (1999) mostraron que CRC y SPT estaban también implicados en otros aspectos de la actividad AG, como la determinación del meristemo floral.

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. CRC ha sido identificado como una diana directa de AG (Gomez-Mena et al., 2005). Sin embargo, se conoce menos sobre la activación de SPT.

4.2- Organización del carpelo.

Una vez que la identidad de órgano ha sido especificada, el primordio del gineceo se divide en diferentes dominios. Durante los primeros estadios del desarrollo se especifican la organización adaxial-abaxial y medio-lateral, y más tarde, cuando el primordio forma un cilindro, se define la polaridad apical-basal.

a) Organización adaxial-abaxial.

La organización adaxial-abaxial hace referencia a la diferenciación entre dominios externos (abaxiales) e internos (adaxiales) del carpelo. Estos dominios son equivalentes al lado inferior y superior de la hoja, y el establecimiento de dicha polaridad implica mecanismos genéticos similares a los que tienen lugar en las hojas. Por tanto, la interacción antagonista encontrada en hojas entre los genes HD-ZIPIII, que definen el dominio adaxial, y los genes KANADI (KAN)/YAB, que definen el dominio abaxial, también existe en el gineceo. Los genes HDZIPIII están expresados, como cabría esperar, en el dominio adaxial del gineceo. Sin embargo, la inactivación de estos genes o su actividad ectópica parece tener un menor efecto en el desarrollo del carpelo que en el de la hoja, indicando que quizás sean necesarios factores adicionales para establecer la polaridad adaxial en el gineceo (Dinneny et al., 2006; McConnell y Barton, 1998). Recientemente, JAGGED (JAG) y NUBBIN (NUB) han sido identificados como posibles factores implicados en el desarrollo del dominio adaxial del carpelo (Dinneny et al., 2006). Así pues, mientras JAG se expresa en todos

los órganos laterales con un patrón no polar, NUB se expresa únicamente en la zona adaxial de hojas, estambres y carpelos. El mutante sencillo *nub* no presenta ningún fenotipo obvio, pero el doble mutante *jag nub* presenta afectado el crecimiento de los órganos florales, y los carpelos y estambres están abaxializados. En el dominio abaxial del carpelo, como ocurre durante la formación de la hoja, los genes KAN, los factores de respuesta a auxinas ETTIN (ETT) y AUXIN RESPONSE FACTOR4 (ARF4), y los genes YAB, tales como FILAMENTOUS FLOWER (FIL), YABBY 3 (YAB3) y CRC, se expresan desde estadios muy tempranos del desarrollo (Siegfried et al., 1999; Kerstetter et al., 2001; Pekker et al., 2005; Bowman y Smyth, 1999). Estos genes son muy redundantes en su actividad abaxial, de modo que aunque los mutantes sencillos de la mayoría de ellos muestran fenotipos de adaxialización muy débiles, las combinaciones de mutantes muestran defectos importantes en la polaridad, invirtiéndose la distribución de los tejidos. Así por ejemplo, en los mutantes *crc kan1*, *kan1 kan2* o *ett arf4*, el tracto transmisor y los óvulos se forman en el exterior del gineceo (Eshed et al., 1999; Pekker et al., 2005).

b) Organización medio-lateral.

Durante la morfogénesis del gineceo, ya desde estadios tempranos del desarrollo, se establece la polaridad en el eje medio-lateral del gineceo, cuya consecuencia es la división del primordio del gineceo en dominios laterales y mediales (fig. 3 B). El dominio lateral del gineceo dará lugar a las valvas, mientras que a partir del dominio medial se desarrollarán los tejidos marginales localizados en la zona donde se fusionan los carpelos. A lo largo del eje medio-lateral se desarrollan dos tipos de tejidos: en la zona medial se forma un nuevo meristemo llamado cresta medial, a partir de la cual se generan todos los tejidos necesarios para la función reproductiva del gineceo, es decir, placenta y septum, así como el estilo y estigma en la zona apical; los dominios laterales, por el contrario, se desarrollan como tejidos diferenciados. De acuerdo con esto, un conjunto de genes implicados en el mantenimiento del meristemo apical del tallo (SAM, "Shoot Apical Meristem"), como es el caso de los factores KNOX y de los genes CUP-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1) y CUC2, se expresan de forma específica en la región medial, donde parecen ser necesarios para el desarrollo de los tejidos marginales (fig. 5-A). Ishida et al. (2000) analizaron el gineceo de plantas *cuc1 cuc2*. Estas plantas mostraban defectos en el desarrollo de los tejidos marginales y no se formaba el septum. Scofield et al. (2007) usaron líneas ARNi inducibles para estudiar el efecto de la reducción de la actividad del factor KNOX I SHOOT MERISTEMLESS (STM) en el desarrollo del gineceo. En algunos casos, el meristemo floral aborta antes de formarse los carpelos. Sin embargo, en otros casos el gineceo llega a formarse aunque este no presenta septum y muestra una reducción de los tejidos marginales, formándose una estructura sin fusionar. Por otro lado, la expresión de genes que reprimen el estado indiferenciado, y así promueven el desarrollo del primordio lateral, está restringida a los dominios laterales del gineceo. Así, los genes YAB, JAG/NUB y ASYMMETRIC LEAVES1/2 (AS1/2) se expresan específicamente en la región lateral del gineceo joven (Alonso-Cantabrana et al., 2007; Bowman y Smyth, 1999; Dinneny et al., 2006; Siegfried et al., 1999). Todo esto indica que las rutas genéticas que mantienen los límites entre el SAM y los primordios laterales parecen tener funciones similares en la organización medio-lateral del gineceo (fig. 5) (Alonso-Cantabrana et al., 2007; Dinneny et al., 2005; Ragni et al., 2008).

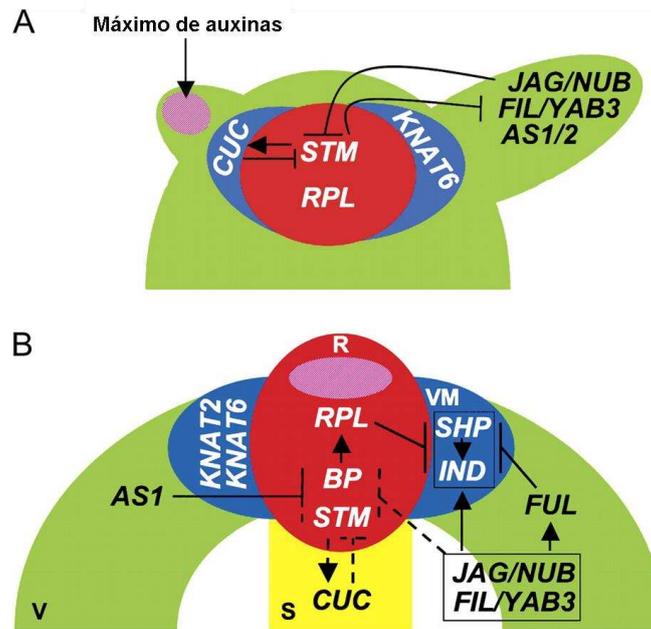


Figura 5. Comparación entre las relaciones genéticas que controlan la identidad del SAM y la organización medio-lateral del gineceo de *Arabidopsis*. (A) Rutas genéticas en el SAM (corte longitudinal). Los genes implicados en el mantenimiento de la indeterminación del SAM como *STM* y *RPL* se expresan en las células meristemáticas (rojo), antagónicamente con los genes *AS*, *YAB* y *JAG* que se expresan en el primordio foliar en desarrollo (verde). El máximo de auxinas (rosa) precede a la formación del primordio foliar, y limita con los genes *CUC* y *KNAT6* que marcan el límite externo del conjunto de células meristemáticas (azul). (B) Rutas genéticas en el eje medio-lateral del gineceo (corte transversal). Genes asociados al meristemo como *STM*, *RPL* y *BP* se expresan en la región medial del replum (rojo), antagónicamente a los genes *AS*, *JAG* y *YAB* que se expresan en la valva (verde). *KNAT2* y *KNAT6* se expresan en el margen de la valva (azul), estableciendo el límite entre valva y replum, donde los genes de la zona de dehiscencia *SHP* e *IND* también serán activados. *CUC* se expresa en el septum (amarillo, S). El máximo de auxinas se localiza en el replum (rosa, R) mientras que el mínimo de auxinas está en el margen de la valva (azul, VM). (V) valva. (S) septum. Las líneas continuas indican interacciones genéticas que se han demostrado y las discontinuas posibles interacciones. Modificado de Girin *et al.*, 2009.

Dinneny *et al.* (2005) demostraron que *JAG*, *FIL* y *YAB3* juegan un papel importante en el desarrollo de la valva en el gineceo, puesto que parecen ser necesarios para la activación diferencial de factores del margen de la valva y valva en las regiones correspondientes (fig. 6, ver sección 4.2.c). Alonso-Cantabrana *et al.* (2007) mostraron que en el desarrollo del gineceo del mutante *as1*, o en plantas que sobreexpresan el gen *KNOX I BREVIPEDICELLUS (BP1)*, el replum se expande y las valvas son más estrechas. Estos autores concluyeron que *AS1* tiene un papel específico en la formación de la valva, mediando la represión de los genes *KNOX I* y otros factores que dirigen el desarrollo del replum en este dominio. Propusieron un modelo en el que un gradiente de *FIL/JAG/YAB3* con un máximo lateral, y la actividad de *AS1* están presentes en la valva, mientras que un gradiente *KNOX I REPLUMLESS (RPL)* con un máximo medial está presente en el replum. De acuerdo con este modelo, estos dos gradientes tendrían acciones opuestas y definirían el desarrollo del margen de la valva en la región donde ambos solapan (fig. 6 B).

Otro factor que parece tener un papel importante en la organización del gineceo es la fitohormona auxina. Ha sido propuesto que durante el desarrollo del carpelo se establece un gradiente de auxinas que controla la distribución de tejidos a lo largo del eje apical-basal (Nemhauser *et al.*, 2000) (Ver sección 4.2.e). Más

recientemente se ha propuesto que las auxinas podrían tener un papel importante en el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial y medio-lateral. Como se ha mencionado antes, ETT y ARF4, ambos factores de respuesta a auxinas, están implicados en la especificación del dominio abaxial. Además, la inactivación de los genes YUCCA (YUC), los cuales codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de auxinas, o PINOID (PID), el cual codifica un regulador del transporte de auxinas, transforman el gineceo en una estructura similar a un cilindro, con simetría radial (Bennet et al., 1995; Cheng et al., 2006). Por otro lado, en plantas con el transporte polar alterado, el replum se expande y las valvas se reducen en anchura (Bennet et al., 1995; Nemhauser et al., 2000). Más recientemente, se ha demostrado que un máximo de auxinas está presente en el replum, mientras que en las valvas los niveles de esta hormona son bajos (Sorefan et al., 2009). Por lo tanto, parece que la auxinas, además de su papel central en el establecimiento de la polaridad apical-basal del gineceo, están también implicadas en la organización de los ejes abaxial-adaxial y medio-lateral.

c) Desarrollo del dominio lateral del carpelo.

Los dominios laterales del primordio del gineceo dan lugar a las valvas, las cuales forman la pared del ovario, y los márgenes de la valva, que forman el límite entre replum y valva (fig. 3-C). El margen de la valva posteriormente se diferencia en la zona de dehiscencia, por donde tiene lugar la apertura del fruto al final de su desarrollo. AG ha sido propuesto como un factor necesario para especificar la identidad de la valva, basado en el fenotipo del doble mutante *ap2 ag*, el cual presenta órganos carpeloides en el primer verticilo floral que no muestran la organización celular típica de la valva (Bowman et al., 1991). La especificación del margen de la valva y la formación de la zona de dehiscencia han sido muy estudiadas durante los últimos años, y la mayoría de los factores implicados en este proceso han sido identificados (fig. 6) (Dinneny y Yanofsky, 2005; Ferrandiz, 2002; Girin et al., 2009). Los genes SHP dirigen la identidad del margen de la valva. En el doble mutante *shp1 shp2* no se forma la zona de dehiscencia y el fruto maduro no se abre (Liljegren et al., 2000). Fenotipos similares se observan en plantas en que los genes INDEHISCENT (IND) o ALCATRAZ (ALC), que codifican factores de transcripción tipo bHLH, han sido inactivados (Liljegren et al., 2004; Rajani y Sundaresan, 2001). La expresión de SHP está restringida al margen de la valva por la acción del gen MADS-box FRUITFULL (FUL) en la valva, y de RPL en el replum (Ferrandiz et al., 2000b; Gu et al., 1998; Roeder et al., 2003). Posteriormente, en un estrecho dominio entre estos tejidos, compuesto por 3-4 capas de células, SHP activa a IND y ALC, ambos necesarios para la formación de la zona de dehiscencia (Liljegren et al., 2000; Liljegren et al., 2004; Rajani y Sundaresan, 2001). En mutantes *ful*, SHP, IND y ALC se expresan ectópicamente en la valva y, como resultado, pequeñas células lignificadas, que normalmente son específicas de la zona de dehiscencia, se desarrollan en este tejido. Como consecuencia, los frutos *ful* no elongan y se rompen de forma prematura. En mutantes *rpl*, el replum está reducido en anchura y el margen de la valva se expande hacia la zona medial como consecuencia de la expresión ectópica de los genes del margen de la valva. Basándose en análisis genéticos, Dinneny et al (2005) propusieron un modelo en el cual la actividad conjunta de FIL, YAB3 y JAG activaría la transcripción de los genes FUL y SHP en la valva y en el margen de la valva, respectivamente. En los mutantes de pérdida de función *fil yab3 jag* observaron una reducción importante de la expresión de FUL mientras que la

expresión de SHP parecía expandida. Este resultado sugería que la activación de SHP y FUL quizás requiriera niveles diferentes de la actividad de FIL, YAB3 y JAG. Así pues según el modelo propuesto, altos niveles de la actividad FIL/YAB/JAG activarían la expresión de FUL en la valva, mientras que la activación de SHP en el margen de la valva requeriría una actividad menor de este grupo. Además, estos autores demostraron que en el replum la proteína RPL reprimía la actividad del conjunto FIL/YAB/JAG, previniendo así la activación de SHP. En el mutante *rpl*, en el que se produce la expansión del margen de la valva se observa la expresión ectópica de FIL en este tejido medial. Además, en los dobles mutantes *fil rpl* y *jag rpl* se rescata parcialmente el desarrollo del replum, demostrando que la actividad ectópica de JAG y FIL en el replum es la responsable del fenotipo del mutante *rpl*. Por lo tanto, estos autores indican que el efecto de RPL sobre SHP podría ser, al menos en parte, indirecto, y mediado por la represión de FIL y JAG, dos activadores de la expresión de SHP.

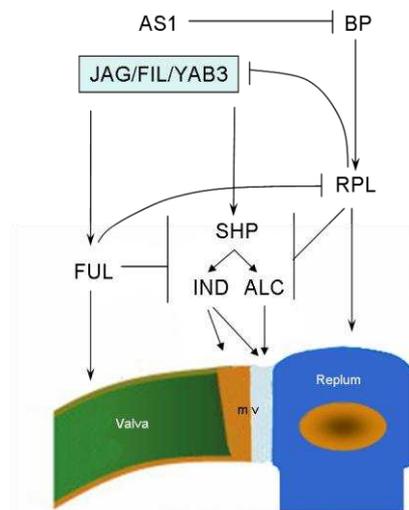


Figura 6. Modelo de las interacciones genéticas que dirigen la especificación de las valvas, el margen de valva y el replum.

Los tres dominios se especifican por gradientes opuestos de factores antagonistas; los factores de la valva (*FIL/JAG*) y los factores del replum (genes *KNOX* como *BP*). Modificado de Ostergaard, 2009.

Las auxinas también están implicadas en el desarrollo de los dominios laterales del gineceo. Sorefan et al. (2009) mostraron que es necesario un mínimo de auxina local para la diferenciación de la zona de dehiscencia en el fruto de *Arabidopsis*. Estos autores demostraron que IND está implicado en la formación de este mínimo de auxinas al controlar la dirección del transporte de auxinas mediante la relocalización del transportador de auxinas PINFORMED (PIN) (Michniewicz y Friml, 2007). SPT, el cual ha sido propuesto como mediador de la señalización por auxinas en el desarrollo apical-basal, también se expresa en la zona de dehiscencia del fruto (Heisler et al., 2001), donde parece estar regulado por IND (Groszmann et al., 2008). Aunque la expresión de SPT sugiere que este factor podría tener un papel en la formación de la zona de dehiscencia, los mutantes *spt* no presentan defectos en la dehiscencia, quizás por su posible redundancia funcional con otros factores.

d) Desarrollo de los tejidos marginales del carpelo.

Los tejidos marginales del carpelo se forman a partir de la región medial del primordio del gineceo, localizados en la zona donde se fusionan los carpelos (fig. 3-B). A partir de la cresta meristemática localizada en posición medial se desarrollará la placenta, septum, tracto transmisor, estilo y estigma (Bowman et al., 1999).

Son muchos los genes implicados en el desarrollo de los tejidos marginales (fig. 8). La mayoría de ellos son funcionalmente redundantes, y únicamente en mutantes múltiples pueden observarse fenotipos severos en el desarrollo del carpelo.

Entre estos genes, AINTEGUMENTA (ANT), LEUNIG (LUG), SEUSS (SEU) y FIL son los más importantes en el desarrollo de los tejidos marginales del carpelo. Mientras los mutantes sencillos de estos genes presentan efectos relativamente leves en el dominio medial, en combinaciones de mutantes el gineceo pierde completamente los tejidos marginales. En mutantes *lug*, el gineceo aparece parcialmente sin fusionar en la zona apical, y también presenta defectos en el desarrollo del septum y de los óvulos (Chen et al., 2000; Liu y Meyerowitz, 1995). El gineceo de los mutantes sencillos *ant* y *seu* presenta defectos similares, aunque más débiles, al de los mutantes *lug* (Franks et al., 2002; Krizek et al., 2000). En el doble mutante *ant lug* el gineceo consiste en dos estructuras similares a las valvas con células del estilo en la parte superior, pero no se forma la placenta, óvulos, septum ni tejido estigmático (Liu et al., 2000). Defectos similares en el crecimiento del carpelo se han descrito en los dobles mutantes *lug seu*, *ant seu*, *fil ant* y *fil lug* (Azhakanandam et al., 2008; Chen et al., 1999; Franks et al., 2002; Nole-Wilson y Krizek, 2006). Se ha demostrado que estos cuatro genes participan en la represión de AG en los dos primeros verticilos florales (Chen et al., 1999; Franks et al., 2002; Krizek et al., 2000; Liu y Meyerowitz, 1995). LUG y SEU codifican co-represores transcripcionales que pueden interactuar para formar un complejo regulador (Elliott et al., 1996; Sridhar et al., 2004). A partir de toda esta información, se ha sugerido que ANT, LUG, SEU y FIL forman un complejo multimérico implicado en el desarrollo de los tejidos marginales en el gineceo (Azhakanandam et al., 2008; Nole-Wilson y Krizek, 2006).

Los genes SHP han sido mencionados por su importancia en la especificación de la identidad del carpelo y la diferenciación del margen de la valva. Un estudio reciente ha indicado que estos genes también están implicados en el desarrollo del estilo y estigma (Colombo et al., 2010). El gineceo del cuádruple *ant crc shp1 shp2* pierde casi por completo los tejidos marginales, recordando éstos a los de los dobles mutantes *ant lug* o *fil ant*. Así, los genes SHP parecen actuar en un complicado y hasta el momento no del todo entendido mecanismo regulador que controla la mayoría de eventos que dirigen la organización y especificación de los tejidos en el gineceo.

SPT se expresa en el dominio medial siendo uno de los principales factores implicados en la diferenciación de los tejidos en esta zona. En los mutantes *spt* el tracto transmisor no se forma y otros tejidos marginales como estilo, estigma y septum están reducidos (Alvarez y Smyth, 1999). SPT ha sido propuesto como mediador de la señalización por auxinas ya que la inhibición química del transporte polar de auxinas (PAT, "Polar Auxin Transport") rescata, al menos parcialmente, los defectos en el estilo del mutante *spt* (Heisler et al., 2001). Junto con SPT, otros tres genes bHLH, HECATE1 (HEC1), HEC2 y HEC3, están implicados en la formación del tracto transmisor (Gremski et al., 2007). Se ha observado que las proteínas HEC interactúan físicamente con SPT en un ensayo de doble híbrido de levadura y quizás funcionen junto con SPT en la activación o represión de genes diana situados por debajo. Es más, los fenotipos de sobreexpresión de los genes HEC sugieren que están implicados en la señalización mediada por auxinas (Gremski et al., 2007). Un nuevo factor de identidad del tracto transmisor, llamado NO TRANSMITTING TRACT (NTT), ha sido recientemente caracterizado. NTT codifica una proteína tipo dedo de zinc C_2H_2/C_2H_2 (Crawford et al., 2007). En el mutante *ntt*, el tubo polínico no puede

crecer de forma eficiente debido a la pérdida total del tracto transmisor, y como consecuencia, la fertilidad es muy reducida.

e) Establecimiento de la polaridad apical-basal.

Las auxinas son una de las principales hormonas implicadas en la organización apical-basal del gineceo. Mutaciones en genes como PID y PIN, los cuales están implicados en el transporte polar de auxinas, dan lugar a defectos en la organización apical-basal, produciendo un aumento de las regiones apical y basal y una reducción importante en el tamaño del ovario (Bennet et al., 1995; Okada et al., 1991). Defectos similares se han observado en mutantes de pérdida de función de los factores de respuesta a auxinas MONOPTEROS (MP/ARF5) o ETT/ARF3 (Przemeck et al., 1996; Sessions et al., 1997; Sessions y Zambryski, 1995). Basándose en estas y otras evidencias genéticas, Nemhauser et al. (2000) propusieron que la organización apical-basal del gineceo era dependiente de un gradiente de auxinas presente en el primordio del mismo. Las auxinas serían sintetizadas en el extremo apical del gineceo y transportadas basalmente, formando un gradiente decreciente. De acuerdo con esta hipótesis, altos niveles de auxinas inducirían la diferenciación de estilo y estigma, niveles intermedios darían lugar a la formación del ovario y bajos niveles al ginóforo basal (fig. 7). La acumulación de auxinas en la parte apical del gineceo es, así mismo, consecuencia de una síntesis de auxinas en este dominio (Aloni et al., 2006).

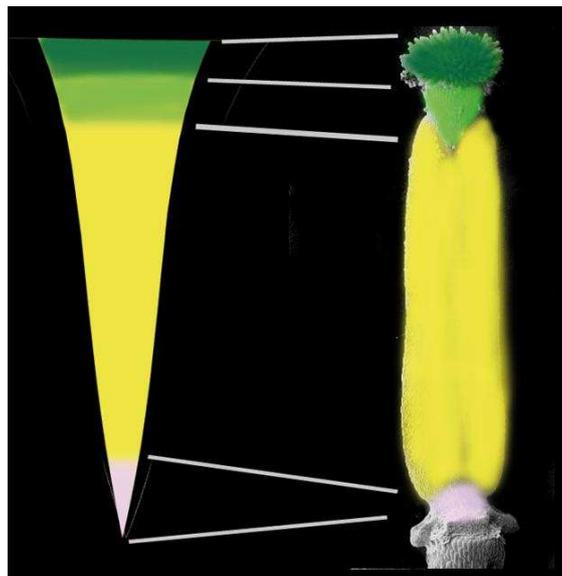


Figura 7. Modelo de la organización apical-basal del gineceo basado en la hipótesis del gradiente de auxinas. Los niveles de auxinas serían altos en la región apical (verde), intermedios en la región central (amarillo) y bajos en la zona basal (blanco). Modificado de Alabadí *et al.*, 2009.

De acuerdo con este modelo, la inhibición del transporte polar de auxinas en el gineceo daría lugar a la acumulación de auxinas en la parte apical y una disminución de las mismas en las regiones basales, produciéndose un cambio en los límites entre los diferentes tejidos que se forman a lo largo del eje apical-basal. El reciente descubrimiento de que los genes YUC, que codifican enzimas claves en la ruta de biosíntesis de auxinas, están activos en la zona apical del gineceo apoya este modelo, ya que podría ser la supuesta fuente de auxinas para este gradiente. De hecho, cuando

son mutados, se produce una alteración importante en la organización apical-basal del gineceo (Cheng et al., 2006).

Como se ha descrito antes, SPT es un factor de transcripción tipo bHLH implicado en la organización apical-basal del gineceo así como en la especificación de los tejidos en posición medial (Heisler et al., 2001). En los mutantes *spt* el tracto transmisor no se forma y el estilo y el estigma están reducidos (Alvarez y Smyth, 1999). El fenotipo observado en el estilo puede ser rescatado tras un tratamiento con un inhibidor del transporte de auxinas, como el ácido 1-N-naphtylphtalamico (NPA), que en teoría podría provocar la acumulación de auxinas en la zona apical, lo cual sugiere que SPT podría mediar de alguna manera la sensibilidad a auxinas (Nemhauser et al., 2000).

El factor de respuesta a auxinas ETT ha sido propuesto como un factor importante para la correcta distribución e interpretación del gradiente de concentración de auxinas (Nemhauser et al., 2000). El gineceo de mutantes *ett* y el de plantas silvestres tratadas con NPA muestran fenotipos muy similares, con un incremento de las regiones apicales (estilo y estigma) y basal (ginóforo), a costa de una reducción en el tamaño del ovario. La hipótesis que explica este fenotipo es que en los mutantes *ett* la respuesta a auxinas está alterada, interpretándose de manera errónea las concentraciones de la misma. De hecho, se ha sugerido que el tamaño del ovario está controlado por la respuesta específica de ETT a niveles intermedios de auxinas (Heisler et al., 2001; Sessions et al., 1997; Sessions y Zambryski, 1995). Como ETT reprime la expresión de SPT y HEC, los cuales promueven la diferenciación del tracto transmisor, estilo y estigma (Alvarez y Smyth, 1999; Gremski et al., 2007; Heisler et al., 2001), la actividad de ETT en la zona intermedia reprimiría localmente el programa de desarrollo apical. Así pues, las mutaciones *spt* son epistáticas a *ett*, suprimiendo el desarrollo ectópico de los tejidos adaxial y apical observado en los mutantes *ett* (Heisler et al., 2001).

El desarrollo del ginóforo quizás esté restringido al extremo basal del gineceo por la actividad de la proteína dedo de zinc KNUCKLES (KNU), a través del mantenimiento o establecimiento del límite del tejido en esta localización (Payne et al., 2004).

Otro conjunto de factores que promueven el desarrollo de los tejidos en el dominio apical del gineceo son los miembros de la familia SHI/STY, que codifican para activadores transcripcionales tipo dedo de zinc. STYLISH1 (STY1) es el único factor que muestra fenotipo como mutante sencillo. El mutante *styl1* muestra defectos sutiles en el desarrollo del estilo (Kuusk et al., 2002). Este fenotipo aumenta gradualmente conforme se añaden mutaciones en otros miembros de la familia SHI/STY. Así pues, mutantes múltiples *shi/sty* muestran una importante reducción en los tejidos estigmático y estilar, el septum no se forma correctamente y la zona apical del gineceo no se cierra completamente. Este fenotipo es similar al observado en los mutantes *lug*. Sin embargo, se ha demostrado que la mutación *lug* es epistática sobre *styl1*, y que la expresión de STY esta reducida en los mutantes *lug*. Por tanto, los factores STY quizás actúen por debajo de LUG para mediar la formación de los tejidos marginales (Kuusk et al., 2006). La actividad de STY1 ha sido ligada a las auxinas, ya que STY1 es un activador directo de YUC4, un gen de biosíntesis de auxinas (fig. 8) (Eklund et al., 2010; Sohlberg et al., 2006). Recientemente, se ha descrito la familia de genes NGATHA (NGA), sobre los cuales se centra esta tesis. Los genes NGA codifican factores transcripcionales con un dominio B3 implicados en el desarrollo del estilo (Alvarez et al., 2009; Trigueros et al., 2009; este trabajo).

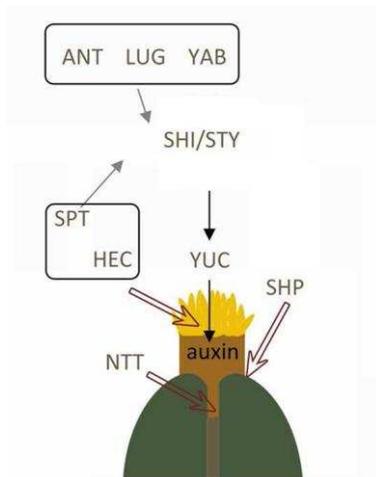


Figura 8. Interacciones genéticas implicadas en la diferenciación de la zona apical del gineceo. Las flechas en negro indican interacciones apoyadas experimentalmente mientras que las flechas grises indican posibles interacciones. Las cajas indican posibles complejos proteicos.

A pesar de que el modelo del gradiente de auxinas explica bien la organización apical-basal del gineceo, no hay una evidencia directa de la existencia de tal gradiente. Únicamente se ha demostrado la existencia de un máximo de auxinas en el ápice del gineceo mediante el análisis de la expresión de marcadores de auxinas sintéticas en el gineceo de *Arabidopsis*, pero no se han conseguido cuantificar niveles inferiores (Benková et al., 2003; Aloni et al., 2006). Por tanto, los hipotéticos niveles de auxinas intermedios y bajos del ovario y ginóforo todavía no han sido demostrados. Además, se ha sugerido recientemente que el extremo basal del gineceo quizás se caracteriza por ser el máximo de un gradiente opuesto de citoquininas (Ostergaard, 2009). Las citoquininas están normalmente implicadas en funciones antagonistas a las de las auxinas (Shani et al., 2006). Así pues, se ha propuesto que las citoquininas tendrían una concentración máxima en la base del gineceo, estableciéndose tres territorios hormonales distintos donde niveles altos de auxinas y bajos de citoquininas promueven el desarrollo de los tejidos apicales, niveles bajos de auxinas y de citoquininas especifican el ovario y niveles bajos de auxinas y altos de citoquininas serían necesarios para la formación del ginóforo en la base (fig. 9), aunque los estudios que anovan este modelo son, por ahora, muy escasos.

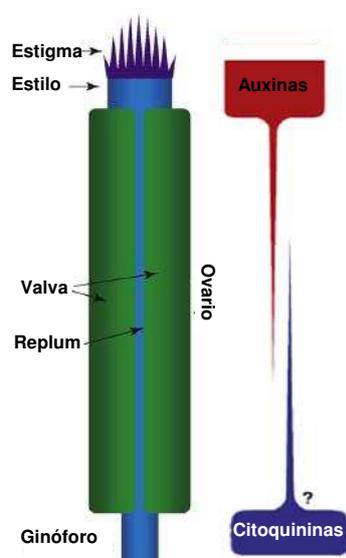


Figura 9. Esquema del gineceo de *Arabidopsis*. Se representa la probable distribución de auxinas y la hipotética distribución de citoquininas en rojo y azul, respectivamente. Modificado de Ostergaard, 2009.

f) Cambios tras la fertilización del fruto.

Después de la fertilización tiene lugar el desarrollo del fruto y las semillas. Durante el desarrollo del fruto se produce una notable elongación del ovario y la diferenciación de toda una serie de tejidos a lo largo del margen del carpelo. En aquellos gineceos que no son fertilizados no tiene lugar la elongación ni el desarrollo de las semillas. El desarrollo del fruto que se produce después de la fertilización parece estar relacionado con una señal hormonal inducida por la fertilización de los óvulos, y algunos datos sugieren que la señalización por auxinas participa en este proceso (Dorcey et al., 2009; Goetz et al., 2006; Vivian-Smith et al., 2001). Una pieza clave que apoya este supuesto es que el mutante de pérdida de función del gen *ARF8* da lugar a la formación de un fruto partenocárpico (Goetz et al., 2006; Vivian-Smith et al., 2001).

Durante el desarrollo del fruto, el margen de la valva se diferencia en una banda estrecha formada por una capa de lignificación y una capa de separación, contribuyendo ambas a la apertura del fruto (ver sección 4.2.c). Los reguladores claves en la especificación del margen de la valva han sido identificados (Ferrandiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2004; Roeder et al., 2003) y se han descrito previamente (ver sección 4.2.c). Recientemente se ha demostrado que un mínimo local de auxinas, generado por el factor de identidad del margen de la valva *IND*, es necesario para la formación de la capa de separación (fig. 5-B) (Sorefan et al., 2009). Así, tanto los máximos como los mínimos locales de auxinas parecen contribuir de un modo esencial a la activación de programas de desarrollo específicos durante el desarrollo del fruto.

5. Nuevos factores de transcripción implicados en el desarrollo del gineceo: los genes *NGA*.

Los genes *NGA* están incluidos en la superfamilia de proteínas con dominio B3 de *Arabidopsis*. El dominio B3 (número de acceso en Pfam 02362) es un dominio de unión a DNA, el cual se ha caracterizado en un gran número de factores de transcripción de plantas. El dominio B3 no es un dominio específico de angiospermas sino que también está presente en genes de gimnospermas, helechos, musgos, hepáticas y algas verdes. Los primeros dominios B3 se identificaron como una región de unos 120 residuos aminoacídicos altamente conservada, cercana al extremo C-terminal en las proteínas *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3)* de *Arabidopsis* y *VIVIPAROUS 1 (VP1)* de maíz (Giraudat et al., 1992). Muchas de las proteínas que contienen dominios B3 se han clasificado funcionalmente como factores de respuesta hormonales, en concreto a ácido abscísico y a auxinas, fitohormonas con un papel importante en procesos de desarrollo como el crecimiento de las plantas y la maduración de las semillas (McCarty et al., 1989; Ulmasov et al., 1997).

La superfamilia B3 de *Arabidopsis* consta de 118 genes agrupados en 6 familias génicas. Las familias *LAV (LEAFY COTILEDON2 (LEC2)- ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3)-VAL)*, *ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR)*, *RAV (RELACIONADO CON ABI3 Y VP1)* y *REM (REPRODUCTIVE MERISTEM)* son las más representativas (Swaminathan et al., 2008) (fig. 10).

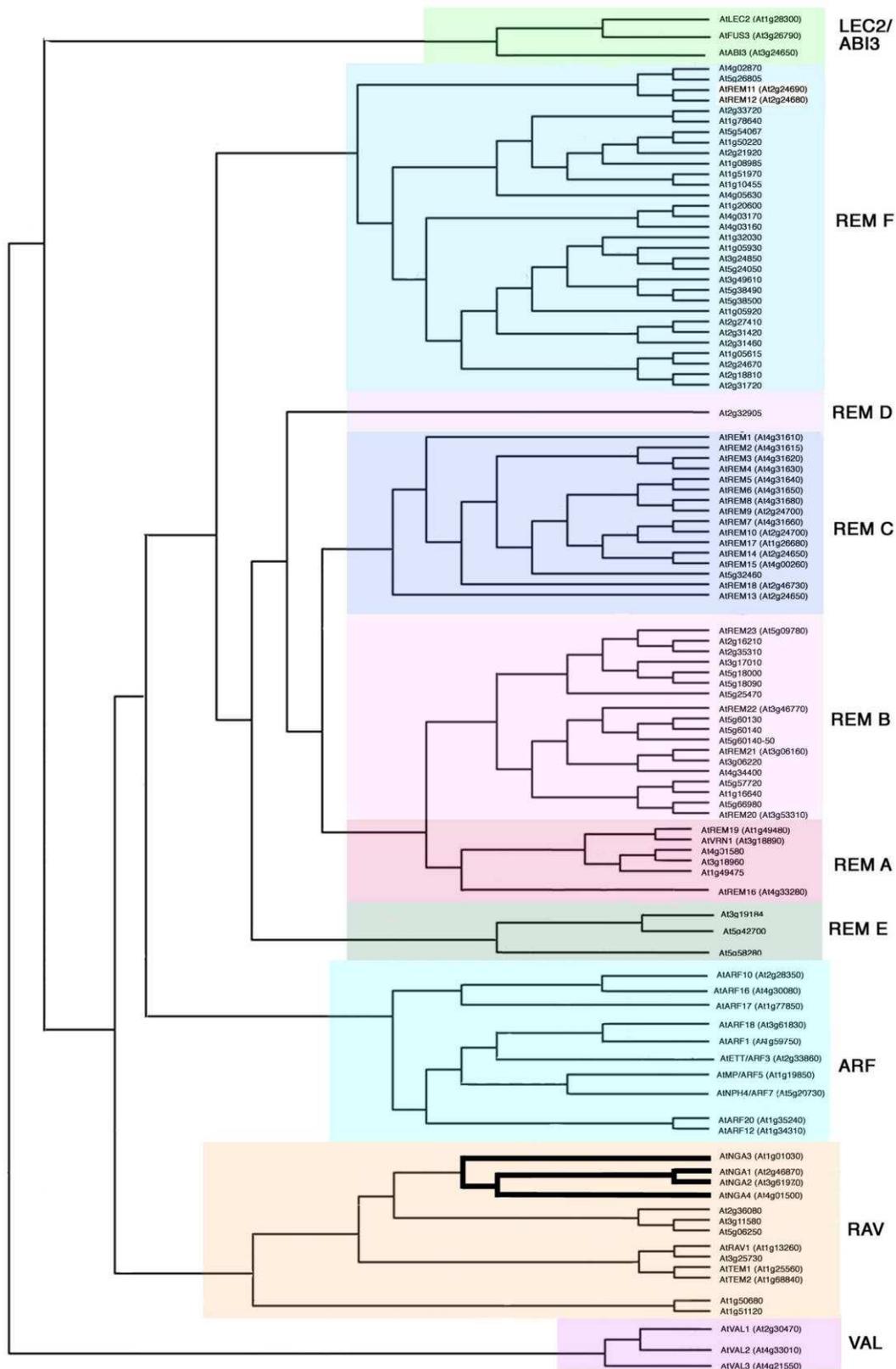


Figura 10. Árbol filogenético de la superfamilia B3 de *Arabidopsis*. Se representan con diferentes colores cada una de las familias que la componen., resaltando en negro las ramas correspondientes a los genes *NGA*. Modificado de Swaminathan *et al.*, 2008.

La familia ARF, compuesta por 23 miembros, es la más estudiada dentro de la superfamilia B3. Además del dominio B3, la mayoría de proteínas ARF contienen un

dominio central que posee actividad represora o activadora de la transcripción. La mayoría de las proteínas ARF contienen dos dominios adicionales en posición C-terminal, llamados dominio III y IV, que median la dimerización de las proteínas ARF consigo mismas o con las proteínas AUX-IAA (Ulmasov et al., 1999; Overvoorde y Okushima, 2005). La actividad de los ARFs está controlada por los AUX/IAA, genes de respuesta primaria a auxinas, que se unen a los ARFs bloqueando su capacidad de unión a DNA. En respuesta a las auxinas las proteínas AUX/IAA son degradadas mediante el mecanismo del complejo SCF^{TIR1} (Gray et al., 2001) permitiendo que los ARFs se unan a los AREs (Auxin-Response Elements) y medien la activación o represión transcripcional de los genes correspondientes. Existen un gran número de revisiones acerca de la función de los ARFs (Guilfoyle y Hagen, 2007; Liscum y Reed, 2002) y su filogenia (Remington et al., 2005; Wang et al., 2007; Liscum y Reed, 2002).

La familia RAV está formada por 13 genes. Los primeros miembros en ser identificados fueron los genes RAV1 y RAV2 (Related to ABI3/VP1), los cuales recibieron ese nombre por su homología con los genes ABI3 de *Arabidopsis* y VP1 de maíz (Kayaga et al., 1999). Seis de los miembros de esta familia poseen, además de un dominio B3, un dominio de unión a DNA del tipo APETALA2 (AP2) (Okamoto et al., 1997; Magnani et al., 2004; Kim et al., 2006). Algunos miembros de esta familia están relacionados con respuestas a brasinoesteroides (Mouchel et al., 2006; Vert et al., 2005) y a etileno (Alonso et al., 2003). Algunos genes de función conocida dentro de la familia RAV son el gen RAV1, que actúa como un regulador negativo del crecimiento y tiempo de floración y que está reprimido por brasinoesteroides (Hu et al., 2004; Zhao et al., 2008), y los genes TEMPRANILLO1 (TEM1) y TEM2 que controlan el tiempo de floración (Castillejo y Pelaz, 2008) Dentro de la familia RAV se encuentra un subgrupo constituido por cuatro genes denominados NGATHA (NGA1-NGA4) que han perdido el dominio AP2 (Alvarez et al., 2006).

En cuanto a la función de los genes que constituyen la superfamilia B3, tienen en común que dentro de las diferentes familias encontramos genes con funciones similares. Por ejemplo, en la señalización hormonal participan ABI3 (Giraudat et al., 1992), RAV1 (Hu et al., 2004) y la familia ARF (Guilfoyle y Hagen, 2007)); en el control del tiempo de floración TEM1-2 (Castillejo y Pelaz, 2008) y VRN1 (Levy et al., 2002); y en la polaridad y crecimiento de órganos ETT y ARF4 (Pekker et al., 2005).

Objetivos

Como se ha expuesto en la introducción, el correcto desarrollo del gineceo implica toda una serie de interacciones genéticas y moleculares, muchas de ellas aún desconocidas. En *Arabidopsis* se ha caracterizado recientemente una pequeña familia de factores de transcripción, la familia NGATHA, de la que previamente en el laboratorio se habían caracterizado los genes NGA3 y NGA4.

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización de los otros dos miembros de la familia, NGA1 y NGA2, y el estudio de la relación funcional entre los genes NGA y otros para los que se ha propuesto un papel en la morfogénesis del gineceo. Con todo ello se intentará proponer un modelo que integre a los genes NGA en las vías que regulan la diferenciación de los distintos tejidos del fruto. El abordaje de este objetivo general se ha realizado mediante los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar funcionalmente los genes NGA1 y NGA2 y determinar el grado de redundancia funcional de los cuatro genes de la familia.
2. Analizar el papel de los genes NGA en la morfogénesis del gineceo regulada por auxinas.
3. Intentar esclarecer algunas de las interacciones genéticas con otros genes necesarios para la correcta formación del gineceo.

Resultados

Capítulo 1. Caracterización de los genes *NGATHA*.

Hasta el momento se han identificado un gran número de genes que controlan la morfogénesis del gineceo, pero en la mayoría de los casos se sabe poco de las interacciones entre ellos y de cómo se organizan jerárquicamente las diferentes rutas genéticas en las que participan. En este trabajo, y siguiendo la línea de investigación del laboratorio, se han estudiado los genes de la familia NGA, concretamente se han caracterizado funcionalmente los genes NGA1 y NGA2 y se ha evaluado el grado de redundancia funcional de los cuatro genes de la familia tanto en el desarrollo del gineceo como en otros procesos del desarrollo de la planta.

En primer lugar se han caracterizado funcionalmente los genes NGA1 y NGA2. En el laboratorio ya se habían caracterizado los mutantes *nga3* y *nga4*, concretamente los alelos *nga3-1*, *nga3-2*, *nga3-3* y *nga4-3* (Trigueros, 2008; Trigueros et al., 2009). El mutante *nga3-3* presentaba un crecimiento desigual de las valvas, que hacía que el estilo creciera inclinado hacia uno de los lados mientras que el mutante *nga4-3* se caracterizaba por poseer un estilo más alargado que el fruto silvestre (fig. 11). Los defectos eran más severos en el doble mutante *nga3-3 nga4-3* lo cual indicaba una redundancia funcional entre ambos genes (fig. 11). Así mismo, el patrón de expresión de NGA3 y NGA4 es muy similar, expresándose ambos en el meristemo inflorescente así como en los primordios florales en estadios tempranos del desarrollo. A partir del estadio 6 del desarrollo floral la expresión queda limitada a la zona apical del carpelo, y es a partir del cierre del gineceo cuando la señal pasa a detectarse en estilo, estigma, óvulos y en la zona apical del tracto transmisor (Trigueros, 2008; Trigueros et al., 2009).

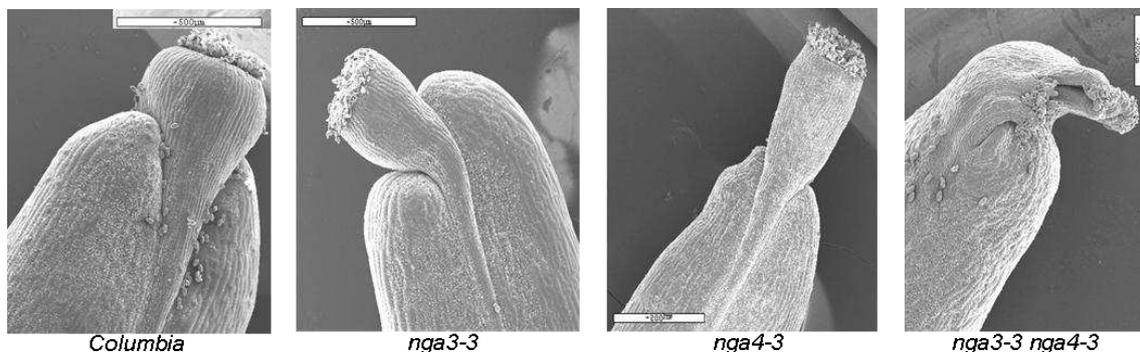


Figura 11. Fotografías del microscopio electrónico de barrido. De izquierda a derecha se puede observar la zona apical de un carpelo completamente elongado de *Columbia 0*, *nga3-3*, *nga4-3* y *nga3-3 nga4-3*.

Para estudiar si los genes NGA1 y NGA2 tenían funciones similares a las observadas para NGA3 y NGA4, se procedió a su caracterización mediante las siguientes aproximaciones experimentales:

1. Búsqueda de mutantes para los genes NGA1 y NGA2 y su caracterización fenotípica.
2. Generación del doble mutante *nga1 nga2*.
3. Análisis del patrón de expresión de los genes NGA1 y NGA2 y de su localización subcelular.

1.1. Búsqueda de mutantes de inserción para los genes *NGA1* y *NGA2*.

Para estudiar la función de los genes *NGA* en el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis* se buscaron mutantes de inserción para los genes *NGA1* y *NGA2* en diferentes colecciones públicas.

Para *NGA1* la única línea de inserción que se encontró pertenecía a la colección Wisconsin DsLox T-DNA (Woody et al., 2007). Según la información proporcionada por la base de datos correspondiente, se trataba de una línea con una inserción de T-DNA en la región 3'UTR del gen (fig. 12).

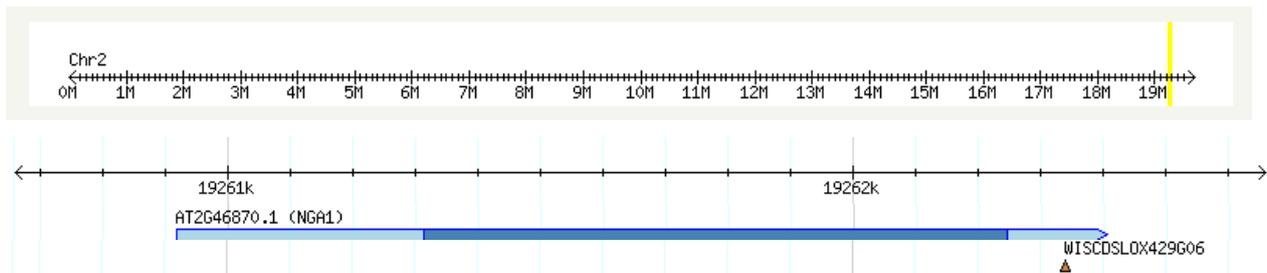


Figura 12. Mutante de inserción de T-DNA para *NGA1*. Diagrama de la localización de la inserción según la información disponible en el TAIR. En la parte superior se representa el cromosoma II del genoma de *Arabidopsis* y se indica la posición del gen dentro del mismo (línea amarilla). Debajo aparece una visión más detallada de la región donde se localiza el gen de interés. Concretamente se representan 2Kb del cromosoma donde se indica la región correspondiente al transcrito. La región codificante está representada en azul oscuro y las regiones 5'UTR y 3'UTR en azul claro. En la parte inferior se indica la localización predicha de la inserción (triángulo).

Para comprobar si la inserción se localizaba exactamente donde indicaba la información disponible en el TAIR se realizó una PCR a partir de DNA genómico con cebadores específicos del gen y del T-DNA. Se utilizaron los cebadores SS071, localizado en la región codificante, y oTOL2RWT, localizado por detrás de la inserción, que deberían amplificar el alelo silvestre y los cebadores p745, localizado en el extremo izquierdo (LB, "left border") del T-DNA, y el TOL2F, localizado por delante de la inserción, para amplificar el alelo mutante. Para este alelo también se utilizó la combinación oTOL2RWT y p745 esperando que, si la inserción era única y estaba en la orientación predicha, no debería amplificarse ninguna banda (fig 13). Con las dos combinaciones de cebadores utilizadas para el alelo mutante se obtenía producto de PCR de modo que decidimos analizar con más detalle la secuencia que aparecía en la base de datos. Cuando se apareaba dicha secuencia con la secuencia completa del gen *NGA1* el resultado era algo difícil de interpretar, ya que apareaba con dos zonas diferentes del gen en orientaciones opuestas, lo que hizo que se pensara que quizás había habido una inversión cromosómica, concretamente del fragmento del gen adyacente a la posición de la inserción.

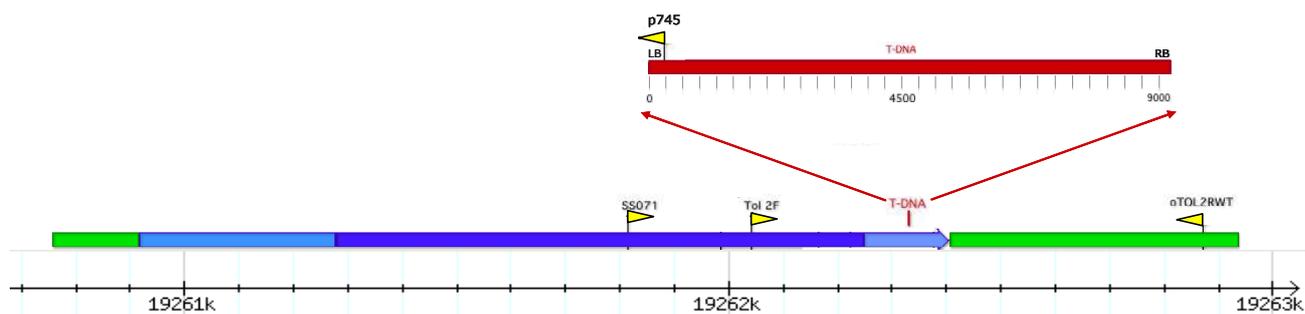
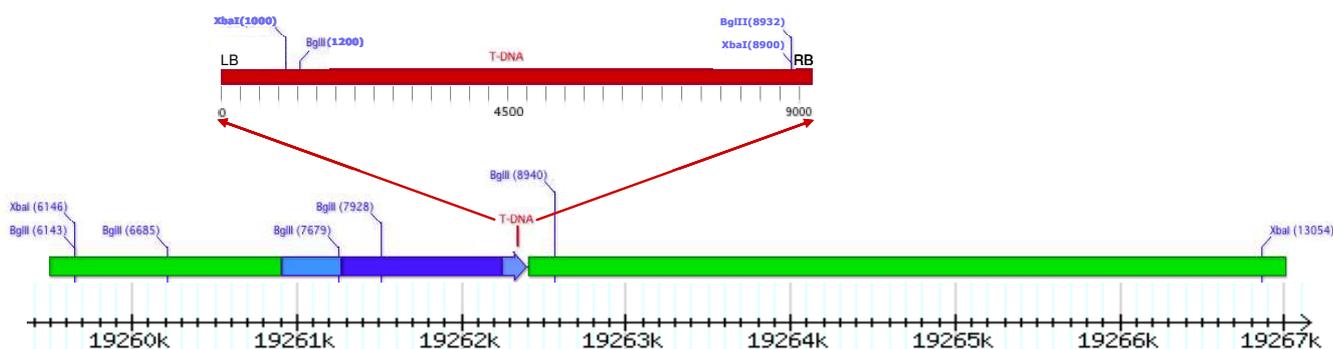


Figura 13. Localización de la inserción de T-DNA en el gen *NGA1*. Diagrama de la posición de los cebadores utilizados para determinar la localización de la inserción en la línea mutante. Se representan de arriba a abajo la inserción de T-DNA (en rojo) en la posición predicha por la base de datos, un fragmento del gen y aproximadamente 3Kb del cromosoma II. Dentro del gen la región codificante está representada en azul oscuro y las regiones 5'UTR y 3'UTR en azul claro. La localización y orientación de los cebadores utilizados para la PCR se indica con una flecha amarilla.

Para intentar esclarecer la naturaleza de la mutación se optó por hacer un análisis “Southern blot”, utilizando como sonda el cDNA completo de *NGA1*. Después de analizar diferentes opciones, las enzimas utilizadas para la digestión del DNA genómico fueron *XbaI* y *BglIII*, que, si la información del TAIR sobre la inserción era correcta, deberían generar los fragmentos indicados en la figura 14.



Enzimas utilizadas	Fragmentos esperados (pb)	
	Alelo silvestre	Alelo mutante
BglIII	1012	1982
	249	249
XbaI	6908	3564

Figura 14. Esquema de la posición donde cortan las enzimas de restricción utilizadas en el “Southern” para *NGA1*. Se indica las posiciones donde cortan las enzimas *XbaI* y *BglIII* tanto en el T-DNA como en la región genómica de *NGA1*. En la tabla se enumeran los tamaños de los fragmentos de DNA esperados, tras la digestión con cada enzima, que hibridan con la sonda del cDNA completo, en el caso de que la planta posea un alelo mutante o silvestre.

Los tamaños observados en el “southern” coincidían con los esperados, por tanto, la inserción del T-DNA no parecía haber dado lugar a una inversión o reorganización cromosómica. Además, los resultados del “southern” permitieron identificar plantas mutantes homocigotas y heterocigotas para la inserción. De las diferentes líneas utilizadas, la 3.5 (primer carril) era silvestre, la 5.4 (tercer carril) y la

6.4 (cuarto carril) eran homocigotas para la inserción (fig. 15) y las líneas 8.2 y 8.4 (quinto y sexto carril respectivamente) eran heterocigotas.

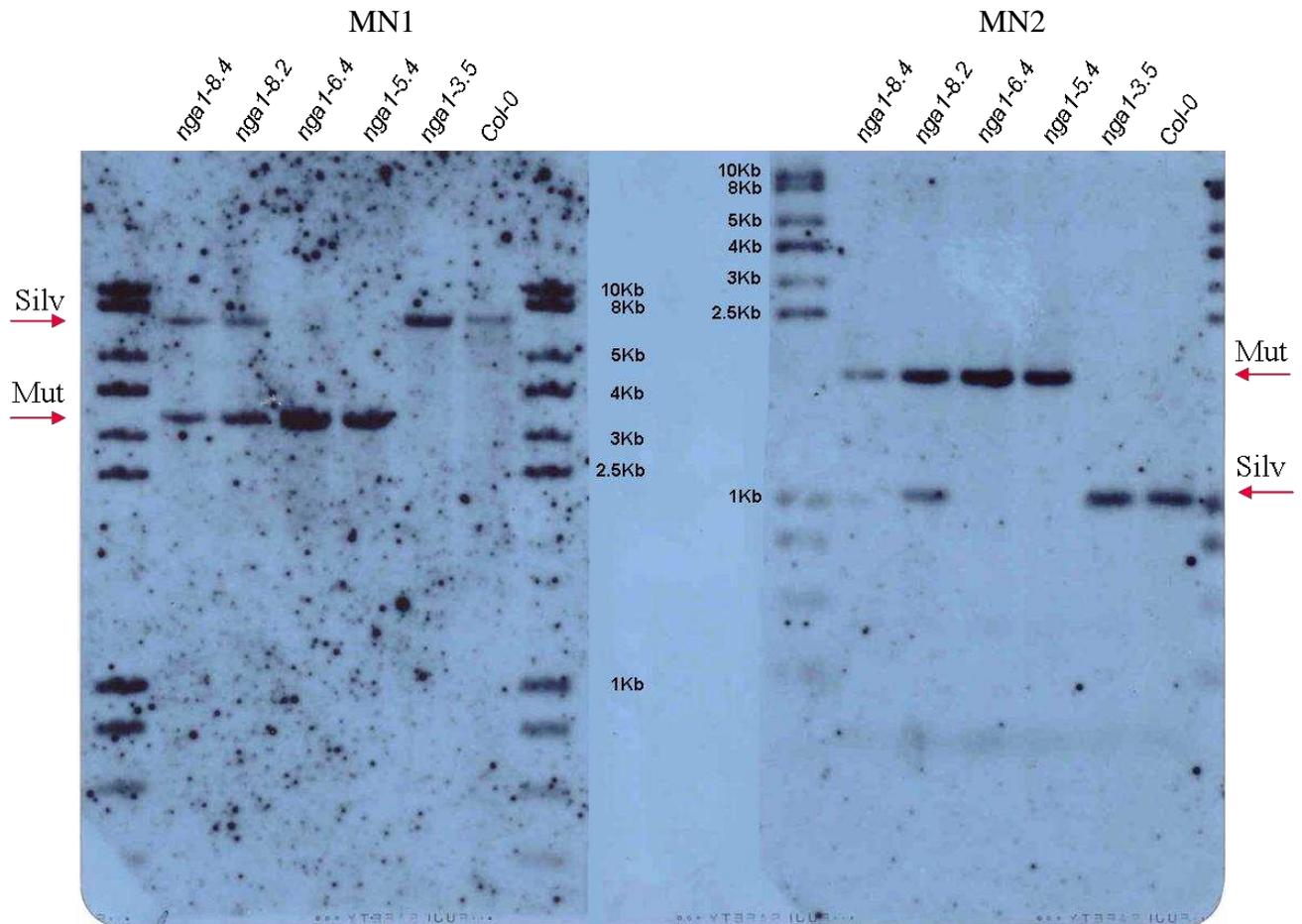
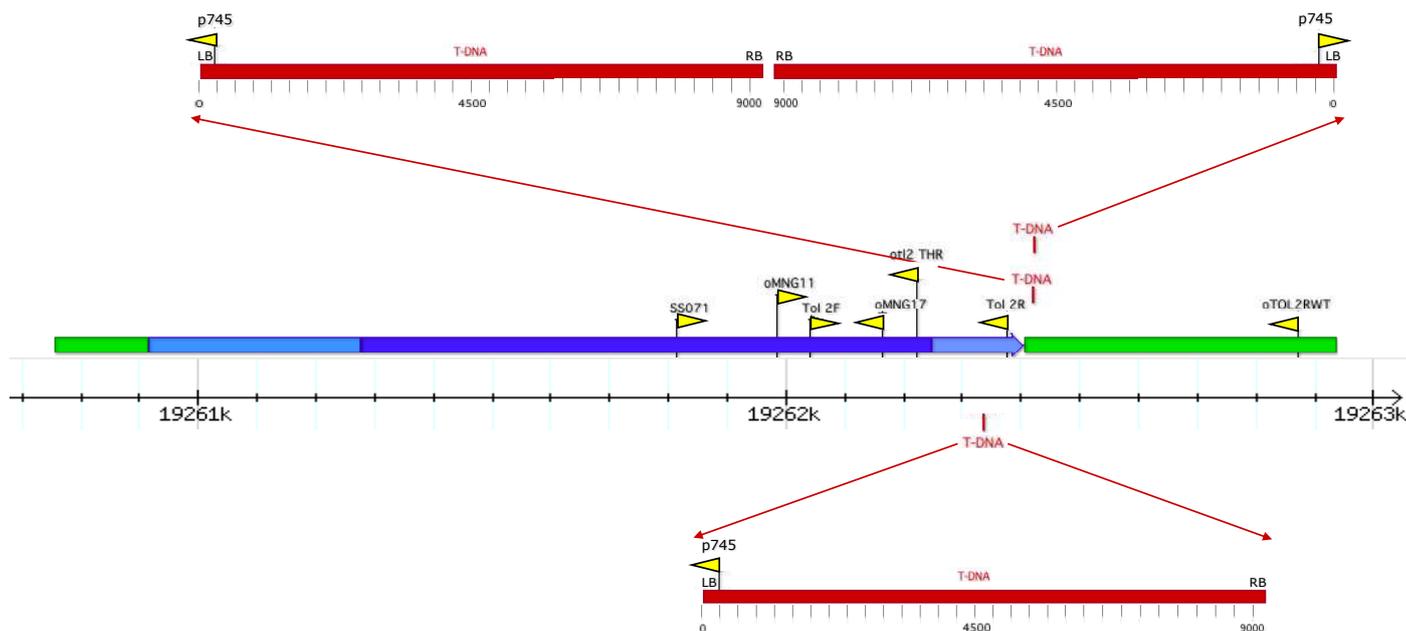


Figura 15. “Southern blot” para el mutante *nga1*. MN1: “Southern” realizado con DNA genómico digerido con la enzima de restricción *Xba*I. MN2: “Southern” realizado con DNA genómico digerido con la enzima de restricción *Bgl*II. En la parte superior se indican las líneas mutantes y en los laterales la localización de la banda esperada para el alelo silvestre y el mutante.

Para intentar resolver las aparentes contradicciones sobre la localización del T-DNA se llevaron a cabo diferentes PCRs con cebadores específicos del gen *NGA1* situados por delante y detrás de la localización predicha de la inserción y el cebador p745 localizado en el extremo LB del T-DNA (fig. 16). Para amplificar la región anterior a la inserción se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores: TOL2F y p745, SS071 y oMNG17, SS071 y otl2THR, SS071 y TOL2R y oMNG11 y p745, y para amplificar la región posterior a la inserción se utilizaron los cebadores p745 y oTOL2RWT. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados y apareados con la secuencia de *NGA1*. Se comprobó que la línea mutante contenía la inserción de dos T-DNA en tándem, que presentaban enfrentados los extremos derechos (RB, “right border”) (fig. 16). Los T-DNAs se localizaban 13pb por detrás de la 3’UTR más larga disponible en las bases de datos de ESTs. Este alelo se denominó *nga1-4*, para diferenciarlo de otros alelos mutantes de *nga1* caracterizados simultáneamente a la realización de esta tesis en el laboratorio del Dr. Yuval Eshed (Rehevet, Israel; Alvarez et al., 2009).



Cebador directo	Cebador reverso	Tamaño de la banda (pb)
TOL 2F	p745	433
SS071	oMNG17	358
SS071	otl2THR	410
SS071	TOL2R	572
oMNG11	p745	487
p745	oTOL2RWT	521

Figura 16. Mutante de inserción de T-DNA para *NGA1*. Diagrama donde se indica mediante una flecha amarilla la posición y orientación de los cebadores utilizados para determinar la localización de la inserción en el mutante. Además se representa en la parte superior la localización deducida a partir de los resultados de las inserciones del T-DNA (en rojo) así como su orientación y en la parte inferior la localización predicha por la base de datos. En la tabla se muestran las parejas de cebadores utilizados así como el tamaño de la banda amplificada que posteriormente se secuenció.

Una vez identificado el mutante homocigoto, y puesto que la inserción parecía estar por debajo de la región que se transcribe, se determinó el efecto de la inserción en la transcripción del gen *NGA1* mediante RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR. Para la RT-PCR semicuantitativa se utilizaron los cebadores oMNG32 y oMNG33 para amplificar el gen completo. En el caso de la qRT-PCR se utilizaron los oligos oMNG48 y oMNG49. Los resultados de la RT-PCR semicuantitativa parecían indicar que el nivel de transcrito en las líneas *nga1-4* era ligeramente más bajo que el de una planta silvestre. Mediante qRT-PCR se comprobó que efectivamente había una reducción en el nivel de ARNm en la línea mutante con respecto a la silvestre de aproximadamente un 23% (fig. 17), por lo que se podía esperar que el alelo *nga1-4* fuera un alelo débil.

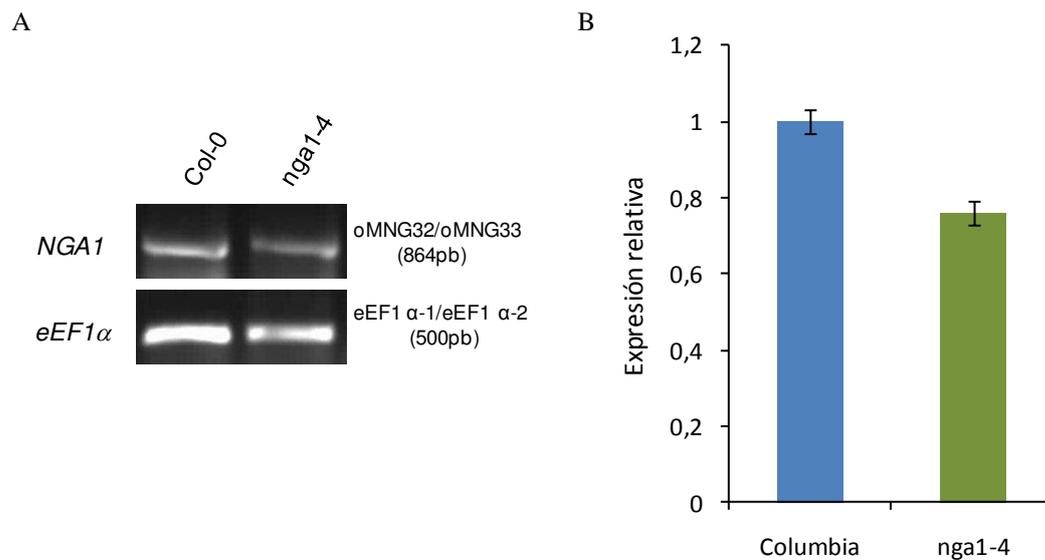


Figura 17. Análisis por RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR de los niveles de transcrito del gen *NGA1* en inflorescencias de *Columbia* y del mutante *nga1-4*. En cada panel se representan los niveles de expresión relativa a los niveles de expresión en plantas silvestres. **(A)** RT-PCR semicuantitativa. Como control interno se utiliza el *FACTOR DE ELONGACIÓN 1α*. A la izquierda se indica el gen amplificado y a la derecha los cebadores utilizados así como el tamaño del fragmento obtenido. **(B)** qRT-PCR. Como control interno se utiliza la *UBIQUITINA 21*. Se representan los niveles de expresión relativa a los niveles silvestres, con desviación estándar de muestras por triplicado.

Para *NGA2* se encontró en la colección SLAT (Tissier et al., 1999) una línea con una inserción de un elemento transponible tipo Spm defectivo (dSpm) en la posición 570pb de la región codificante (fig. 18). Este tipo de transposones han sido modificados para evitar la transposición del mismo dentro del genoma y así conseguir una inserción estable. Por la posición de la inserción en esta línea se podría esperar que la proteína completa no se tradujera.

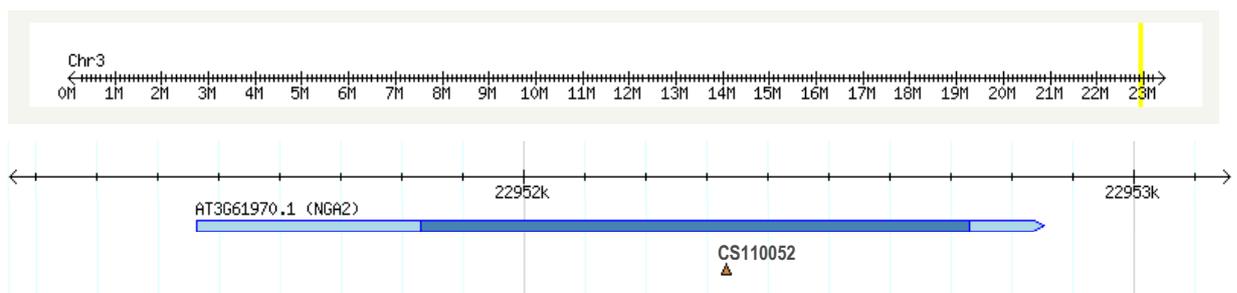


Figura 18. Mutante de inserción de elemento transponible tipo dSpm para *NGA2*. Diagrama de la localización de la inserción según la información disponible en el TAIR. En la parte superior se representa el cromosoma III del genoma de *Arabidopsis* y se indica la posición del gen dentro del mismo (línea amarilla). Debajo aparece una representación más detallada de la región donde se localiza el gen de interés, concretamente 2Kb del cromosoma y, bajo ella, la región correspondiente al transcrito, donde la región codificante está representada en azul oscuro y las regiones 5'UTR y 3'UTR en azul claro. En la parte inferior se indica la localización de la inserción (triángulo).

A partir de la información del TAIR se diseñaron los cebadores necesarios para la reacción de PCR. Con los cebadores oMNG14 y oMNG15 se amplificaba el alelo silvestre y con los cebadores EN8130 (cebador del transposon) y oMNG14 se

amplificaba el alelo mutante (fig.19). La posterior secuenciación de estos productos de PCR permitió comprobar (fig. 19) que el dSpm se localizaba en la base 572 (tomando como posición 1 la primera base del codón de inicio de la traducción), tal y como indicaba la información del TAIR. Además, también sirvió para genotipar las plantas de esta línea e identificar mutantes homocigotos. Este alelo se denominó *nga2-2*, para diferenciarlo del alelo mutante de *nga2* caracterizado simultáneamente a la realización de esta tesis en el laboratorio del Dr. Yuval Eshed (Rehevet, Israel; Alvarez et al., 2009).

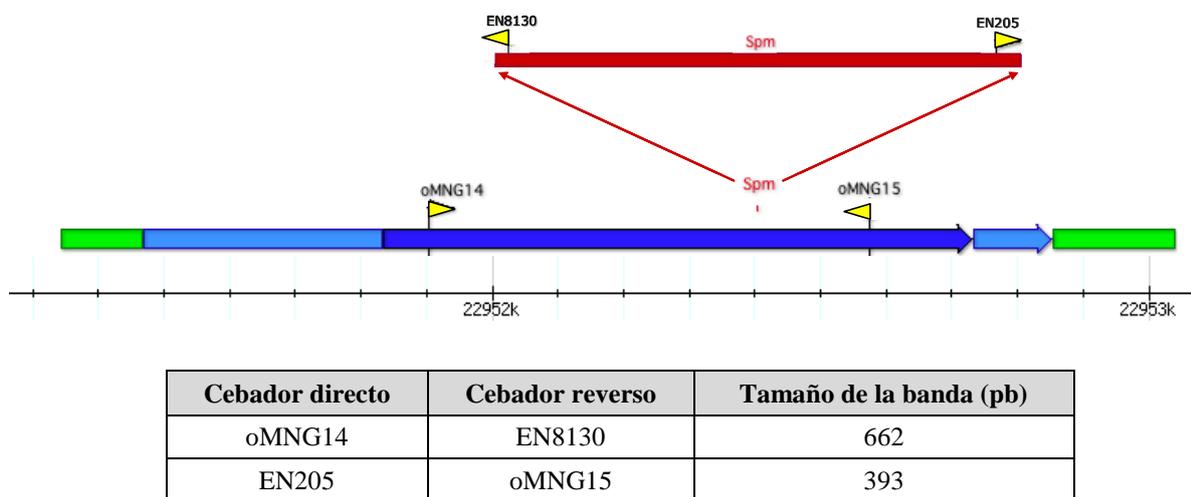


Figura 19. Mutante de inserción de elemento transponible tipo dSpm para *NGA2*. Diagrama de la posición de los cebadores utilizados para localizar la inserción en el mutante. Se representa un fragmento del gen, donde la posición en la región genómica se indica abajo. El transcrito se representa en azul, donde la región codificante aparece en azul oscuro y las UTRs en azul claro. La localización de los cebadores se indica con flechas amarillas. Además, se señala la localización del Spm (en rojo), orientación y posición de los cebadores utilizados para realizar la PCR.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis molecular del mutante homocigoto *nga2-2* para determinar el efecto de la inserción en la transcripción del gen. Este análisis se abordó mediante RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR. Para la RT-PCR semicuantitativa se utilizaron los cebadores oMNG29 y oMNG31 para estudiar el nivel de expresión del gen completo y los cebadores oMNG29 y oMNG30 para analizar si la región del gen anterior a la inserción se transcribía. En el caso de la qRT-PCR se utilizaron los cebadores oMNG46 y oMNG47 localizados en la región codificante posterior a la inserción. Cuando en la RT-PCR semicuantitativa se compararon los niveles de transcrito del silvestre y el mutante se comprobó que el ARNm completo no se transcribía pero sí la región anterior a la inserción y, por tanto, cabría esperar que diera lugar a una proteína truncada (fig. 20 A). Por ello, no se pudo confirmar que el mutante del que disponíamos fuera un mutante nulo, ya que no se sabía si la proteína truncada que probablemente se sintetizaba era funcionalmente activa. El análisis por qRT-PCR confirmó que el ARNm completo no se transcribía en la línea *nga2-2* (fig. 20 B).

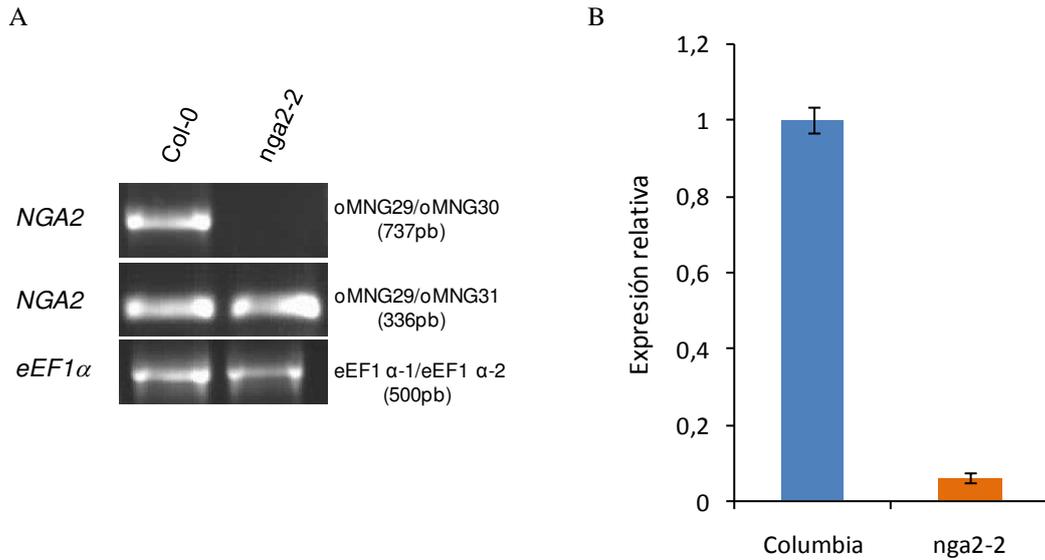


Figura 20. Análisis por RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR de los niveles de transcrito del gen *NGA2* en inflorescencias de *Columbia* y mutante *nga2-2*. (A) RT-PCR semicuantitativa. Como control interno se utiliza el *FACTOR DE ELONGACIÓN 1α*. A la izquierda se indica el gen amplificado y a la derecha los cebadores utilizados así como el tamaño del fragmento obtenido. La primera columna corresponde al transcrito completo y la segunda al fragmento anterior a la inserción. (B) qRT-PCR. Como control interno se utiliza la *UBIQUITINA 21*. Se representan los niveles de expresión relativa a los niveles silvestres, con desviación estándar de muestras por triplicado.

Teniendo en cuenta la localización de la inserción, en el mutante *nga2-2*, podríamos esperar que se tradujera una proteína truncada de 190 residuos, que corresponden a la región anterior a la inserción más 29 aminoácidos codificados por el elemento dSpm, en comparación con la proteína completa de 299 residuos (fig. 21) Esta proteína incluiría el dominio de unión a DNA tipo B3 pero no los motivos conservados que se localizan en posición C-terminal.

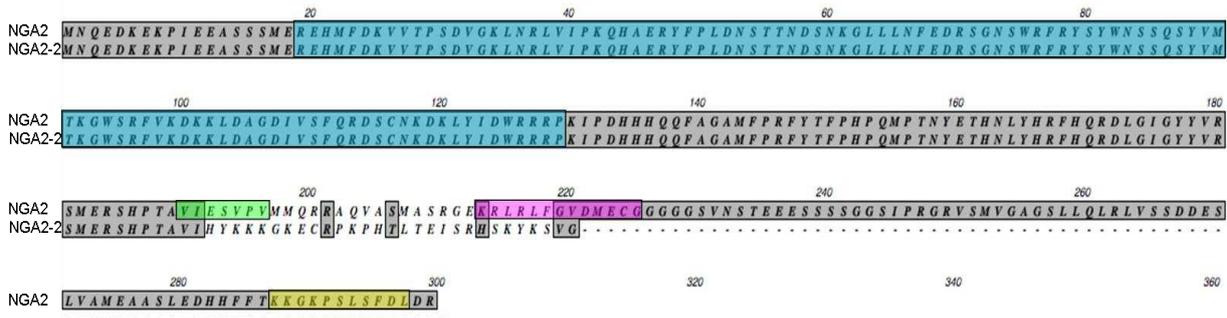


Figura 21. Alineamiento de la proteína completa de *NGA2* y la posible proteína truncada codificada por el alelo mutante *nga2-2*. Se señala en azul el dominio B3 y en verde, morado y amarillo los motivos conservados de la familia *NGA* en posición C-terminal.

En resumen, identificados un alelo mutante en el gen *NGA1*, y otro en el gen *NGA2*, se podía concluir que el alelo mutante *nga1-4* probablemente era un alelo muy débil, ya que únicamente se producía una ligera reducción en el nivel de expresión del gen *NGA1*. En el caso del alelo mutante *nga2-2* no se traducía la proteína entera pero era de esperar que codificara una proteína truncada la cual carecía de los motivos conservados situados en posición C-terminal.

1.2. Caracterización fenotípica de los mutantes *nga1-4* y *nga2-2*.

En el laboratorio ya se habían caracterizado los mutantes *nga3-3* y *nga4-3*. Estas líneas eran aparentemente iguales a las silvestres con la excepción de pequeños defectos observados en la formación de la zona apical del fruto. Al comparar los mutantes *nga1-4* y *nga2-2* con plantas silvestres no se observaron defectos aparentes ni en la morfología general de las mismas ni en el fruto. Sin embargo, se decidió estudiar con más detalle el desarrollo del gineceo.

Cuando se compararon los diez primeros frutos de los mutantes *nga1-4* y *nga2-2* con los de plantas silvestres Col-0 no se observaron diferencias significativas en cuanto a tamaño y forma. Únicamente cuando se estudió con detalle la zona apical del fruto, bien a la lupa o bien en el microscopio electrónico, se observaron defectos sutiles en la zona apical del mismo. Los frutos presentaban un estilo ligeramente más largo y estrecho acompañado en ocasiones, en el caso de *nga2-2*, de un crecimiento ligeramente desigual de las valvas (fig. 22).

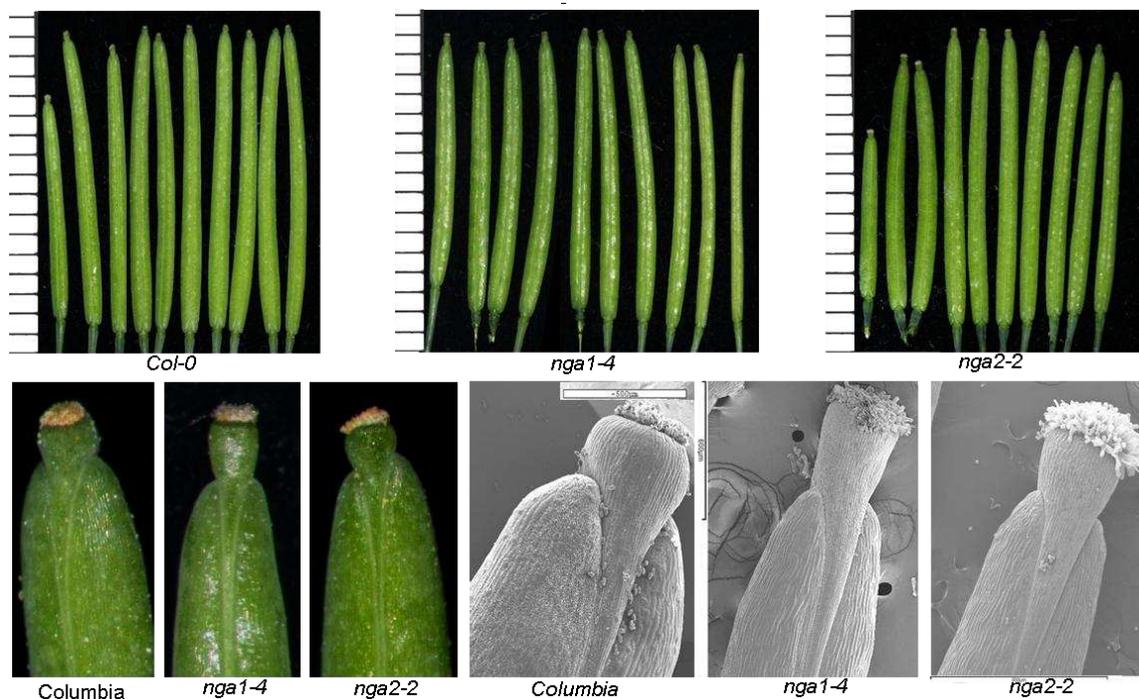


Figura 22. Caracterización fenotípica de los mutantes *nga1-4* y *nga2-2*. De izquierda a derecha se muestran los diez primeros frutos de plantas silvestres, *Columbia*, y de los mutantes *nga1-4* y *nga2-2*. Las unidades de la regla son mm. Los paneles inferiores muestran fotos más detalladas, tanto al microscopio electrónico de barrido como a la lupa, de la zona apical del fruto (estadio 17).

1.3. Estudio del patrón de expresión de los genes *NGA*.

En primer lugar, determinamos los niveles de expresión de los cuatro genes *NGA* en diferentes tejidos de la planta. Para ello, se analizaron los niveles de los ARNm correspondientes en raíz, tallo, hojas e inflorescencias de plantas silvestres mediante qRT-PCR. En la figura 23 se puede observar como todos los genes *NGA* se expresaban en todos los tejidos de la planta analizados. De entre ellos *NGA4*, era el que menos se expresaba en todos ellos y *NGA1* el que presentaba un nivel de expresión más elevado en inflorescencias. En todos los casos los niveles de expresión en inflorescencias eran superiores a los detectados en otras partes de la planta.

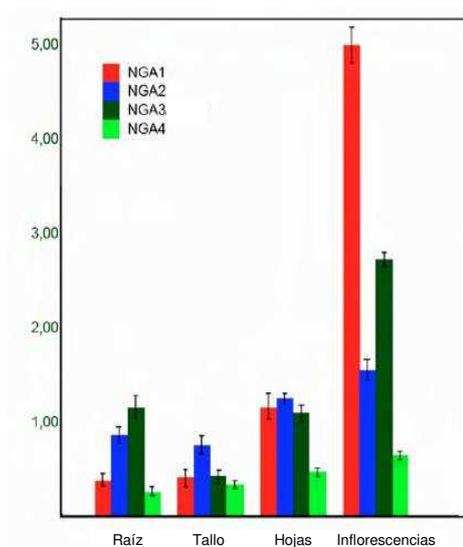


Figura 23. Niveles de expresión de los diferentes genes que componen la familia *NGA* en diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*. Se representan los niveles de expresión relativa a los niveles de *UBQ 21*, con desviación estándar de muestras por triplicado.

En segundo lugar, se analizó el patrón de expresión espacio-temporal en inflorescencias tempranas de plantas silvestres, mediante hibridación “in situ” del ARNm. Para ello se diseñaron sondas específicas que hibridaban con cada uno de los correspondientes ARNm, localizadas en zonas de la región codificante donde la homología de secuencia entre los cuatro genes fuera baja a fin de minimizar efectos de hibridación cruzada.

Los resultados mostraban como el gen *NGA1* se expresaba en el meristemo apical del tallo (SAM), aunque débilmente. En el meristemo floral la señal era más intensa y homogénea (fig. 24 A-B). A lo largo del desarrollo floral temprano se podía observar que *NGA1* se expresaba en los primordios de todos los órganos florales (fig. 24 C y G). En el primordio del gineceo, a partir del estadio 8, la expresión era más fuerte en la mitad apical y en la zona adaxial del gineceo (fig. 24 C). En el estadio 10, la expresión de *NGA1* quedaba restringida a la zona apical del gineceo (estilo y estigma) y a la placenta y primordios de óvulos (fig. 24 D). En estadio 11, detectábamos señal únicamente en los primordios de óvulos (fig. 24 D-E). El patrón de expresión de *NGA2* era similar al de *NGA1*, aunque la señal era menos intensa (fig. 24 H-M). *NGA1* y *NGA2* presentaban patrones casi idénticos a los de *NGA3* (fig. 24 N-P) y *NGA4* (fig. 24 Q-R) con la diferencia de que para estos dos genes en estadio 11 también se detectaba señal en estilo y estigma (fig. 24 P y R). Cabe destacar que la intensidad de la señal detectada para *NGA1* era mayor a la de los otros genes de la familia, resultado que concuerda con el de la qRT-PCR anteriormente descrita.

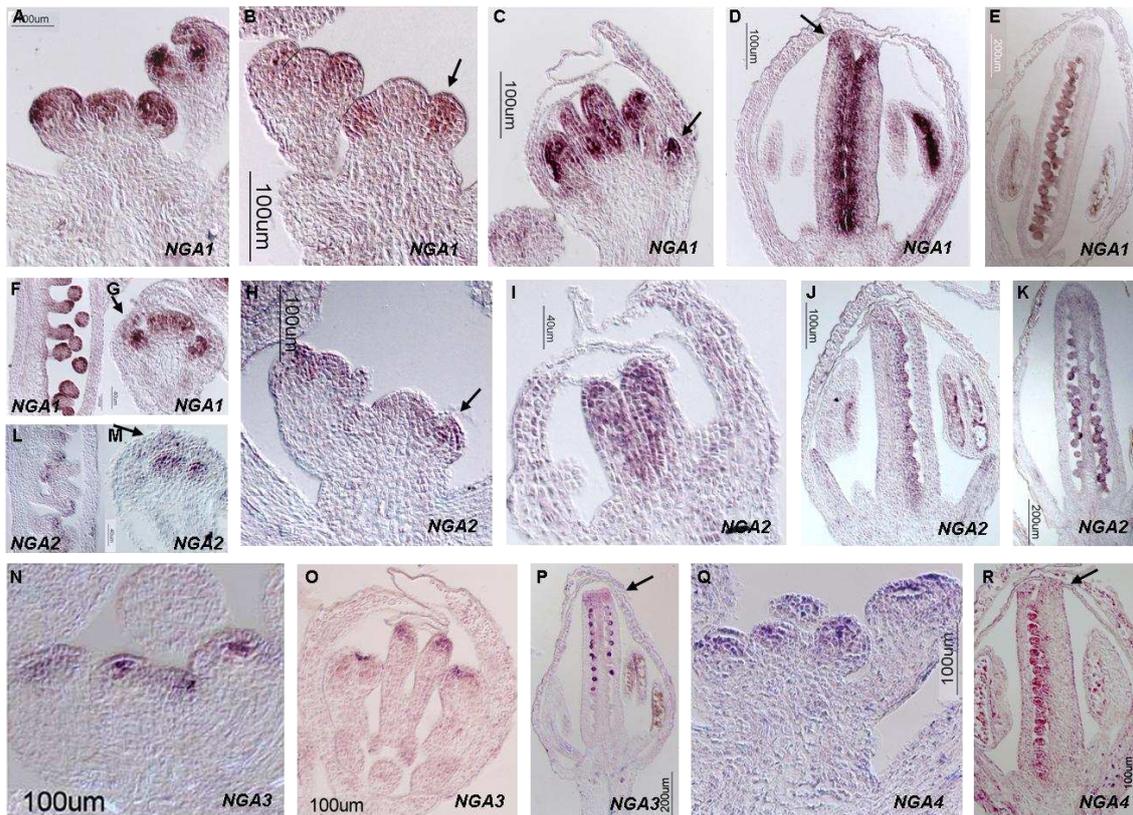


Figura 24. Patrón de expresión de los genes *NGA1* y *NGA2* en inflorescencias silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Hibridación “in situ” de cortes longitudinales de inflorescencias de plantas silvestres. **(A) a (G)** Patrón de expresión de *NGA1*. **(A)** y **(B)** Meristemo apical del tallo y meristemo floral. *NGA1* se expresa más intensamente en la mitad adaxial del primordio floral. **(C)** Gineceo en estadio 8, se detecta señal de *NGA1* en la mitad apical y en la zona adaxial del gineceo, en los primordios de estambres y en el extremo de los primordios de pétalos **(D)** Gineceo en estadio 10. *NGA1* se expresa en la placenta y en la zona apical del gineceo en desarrollo. **(E)** Gineceo en estadio 11. La expresión de *NGA1* se detecta en primordios de óvulos. **(F)** Primordios de óvulos de una flor en estadio 11. **(G)** Flor en estadio 6, se detecta la expresión de *NGA1* en el primordio del gineceo, en la parte distal de los sépalos y en los primordios de pétalos. **(H) a (M)** Patrón de expresión de *NGA2*. **(H)** Meristemo apical del tallo y meristemos florales. La expresión de *NGA2* se detecta en la parte adaxial del primordio floral. **(I)** Gineceo en estadio 8. *NGA2* se expresa en parte apical y en la zona adaxial del gineceo **(J)** Gineceo en estadio 10. La expresión de *NGA2* es similar a la de *NGA1* en **(D)**. **(K)** Gineceo en estadio 11. *NGA2* se expresa de forma similar a *NGA1* en **(E)**. **(L)** Primordios de óvulos de una flor en estadio 11. **(M)** Flor en estadio 6, se detecta la expresión de *NGA2* en el primordio del gineceo, en la parte distal de los sépalos y en los primordios de pétalos. **(N) a (P)** Patrón de expresión de *NGA3*. **(N)** Ápice inflorescente, se detecta la expresión de *NGA3* en el centro del meristemo floral (flecha). **(O)** Gineceo en estadio 8, *NGA3* se expresa en la parte distal del gineceo así como en el extremo apical de los estambres. **(P)** Gineceo en estadio 11. La expresión de *NGA3* se detecta en la zona distal del gineceo (flecha) y en la superficie de los primordios de óvulos. **(Q) y (R)** Patrón de expresión de *NGA4*. **(Q)** Meristemo apical del tallo y meristemo floral en los cuales se detecta expresión de *NGA4*. **(R)** Gineceo en estadio 10, se puede observar la expresión de *NGA4* en la zona apical del gineceo y en la superficie de los primordios de óvulos.

Como el patrón de expresión era complejo generamos líneas transgénicas reporteras tanto para *NGA1* como para *NGA2*. Las construcciones utilizadas poseían la región genómica completa de cada gen. Se clonaron 2,5 kb del promotor, junto con la región codificante del gen *NGA1* y *NGA2*, fusionados al extremo N-terminal del gen delator *GUS*, y en el extremo C-terminal del mismo se clonaron 2 kb de la región 3' de cada gen, incluyendo la región 3'UTR y secuencias genómicas no transcritas (fig. 25).

Estas líneas permitirían describir con mayor detalle el patrón de expresión espacio-temporal de ambos genes y además facilitarían estudios genéticos posteriores.

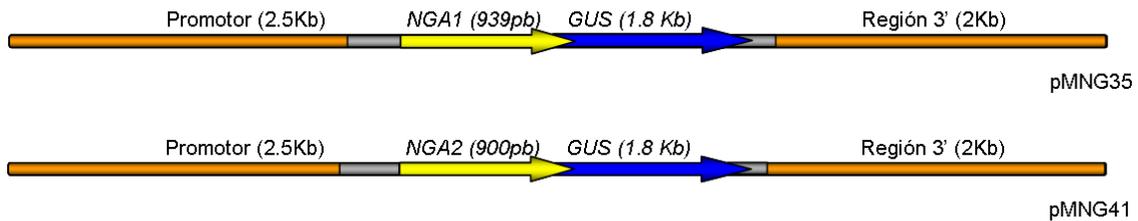


Figura 25. Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar el patrón de expresión de *NGA1* y *NGA2*. Se fusionó la proteína delatora GUS en el extremo C-terminal de las proteínas *NGA1* y *NGA2*. Se representa las regiones 5' y 3' del gen (en naranja) dentro de las cuales se señala tanto la 5'UTR como la 3'UTR (en gris), la región codificante (en amarillo) y el gen *GUS* (en azul). Se indica el nombre de la construcción (ver anexo II) así como los tamaños relativos de los fragmentos.

Para *NGA1* durante la fase vegetativa se detectó la expresión del gen delator GUS en haces vasculares de cotiledones (fig. 26 A). En las hojas jóvenes en crecimiento, se detectaba en el extremo distal de la misma (fig. 26 B) mientras que en hojas completamente expandidas se observaba en tricomas y débilmente en tejido vascular (fig. 26 C). En raíces no se detectó expresión del gen GUS (fig. 26 D).

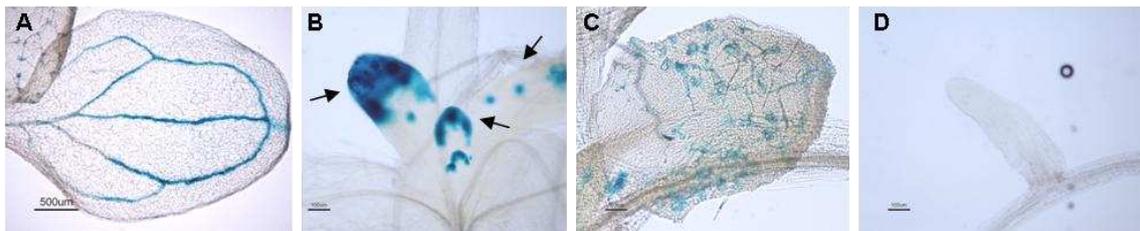


Figura 26. Expresión de *NGA1:GUS* en plántulas. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *NGA1*. En plántulas se expresa en (A) haces vasculares de cotiledones, (B) en el extremo distal de hojas en crecimiento e hidatodos. (C) Hoja, la señal se detecta en tricomas, y débilmente en tejido vascular. (D) Raíz secundaria, donde no se detecta expresión de *NGA1*.

Durante la fase reproductiva, y concretamente en inflorescencias en estadio 6, *NGA1* se expresaba en los primordios de todos los órganos florales (fig. 27 B). En estadio 8, la señal se mantenía en todos los órganos florales en desarrollo siendo más intensa en la mitad apical y en la zona medial del gineceo (fig. 27 C). En el estadio 11 la señal se podía observar en la parte distal de sépalos y pétalos, y en el gineceo quedaba restringida a la zona apical del mismo y a los tejidos localizados en posición medial, concretamente a la placenta y a los primordios de óvulos (fig. 27 D). En estadio 12 la señal se detectaba a lo largo de todo el gineceo aunque más intensamente en la zona apical, placenta y óvulos, manteniéndose también en la parte distal de sépalos y pétalos (fig. 27 E). Durante el estadio 13 la señal quedaba restringida a la zona de la placenta, óvulos y estilo (fig. 27 F). En el estadio 14 la señal se mantenía en las mismas zonas que en el estadio anterior, aunque disminuyó el nivel de expresión en pétalos (fig. 27 G).

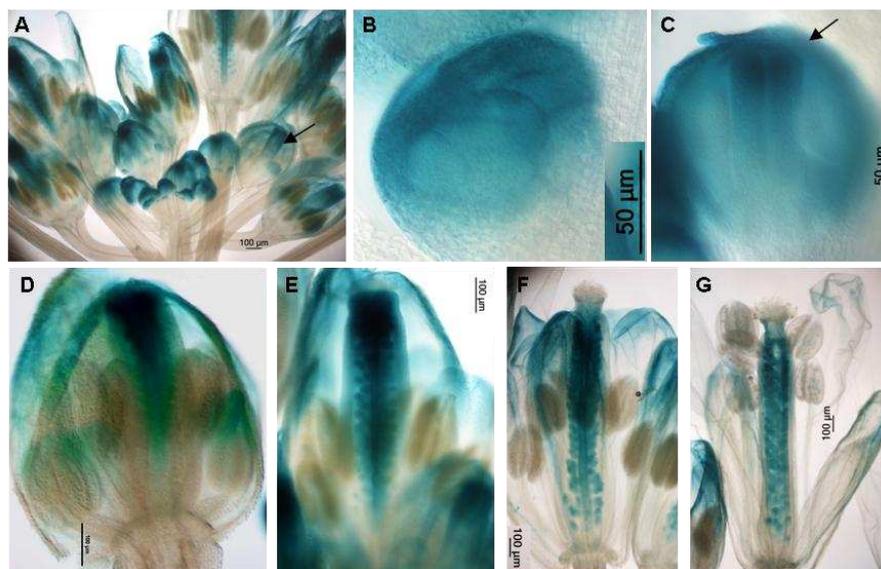


Figura 27. Expresión de *NGA1:GUS* en inflorescencias. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *NGA1*. **(A)** Visión general de una inflorescencia. **(B)** Gineceo en estadio 6, la señal se detecta en los primordios de todos los órganos florales **(C)** Gineceo en estadio 8, la señal es más intensa en la región apical y medial del gineceo. **(D)** Gineceo en estadio 11. La actividad GUS se detecta en la parte distal de sépalos y pétalos, en el gineceo se expresa en el extremo apical y en la placenta y primordios de óvulos. **(E)** Gineceo en estadio 12. La actividad GUS se observa más intensamente en la parte distal del gineceo, así como en la placenta y óvulos. **(F)** y **(G)** Gineceo en estadio 13 y 14, respectivamente. En estos dos estadios la actividad GUS se detecta en la placenta, óvulos y estilo, además de en la parte distal de los pétalos.

En las líneas reporteras de *NGA2* (pMNG41) también se detectó expresión en cotiledones, aunque con un patrón diferente al de *NGA1*. La expresión de *NGA2* no era uniforme, sino que se detectaba en células aisladas además de en el tejido vascular (fig. 28 A). También se observaba señal en primordios de hojas (fig. 28 B), pero una vez que la hoja había elongado dejaba de detectarse. En raíces, la actividad GUS se detectaba en raíces secundarias en crecimiento, concretamente en la zona elongación de la raíz (fig. 28 C-D).

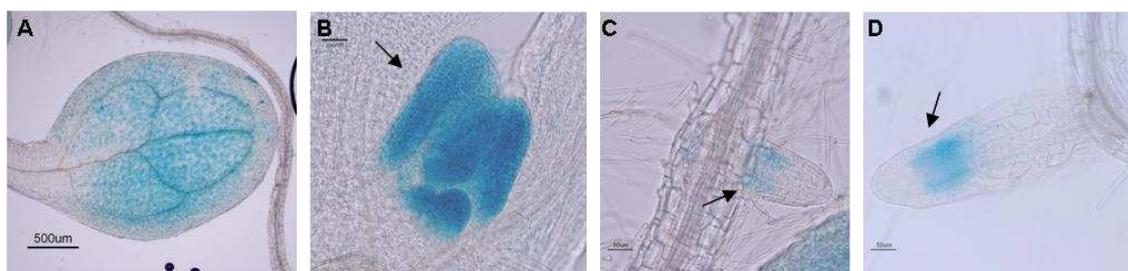


Figura 28. Expresión de *NGA2:GUS* en plántulas. Detección histoquímica de actividad GUS conducida por el promotor de *NGA2*. En plántulas se expresa en **(A)** cotiledones, concretamente en haces vasculares y células aisladas, y **(B)** primordios de hojas. **(C)** y **(D)** Raíces secundarias, la señal se puede observar en la zona de elongación de la raíz.

Durante la fase reproductiva, y concretamente en inflorescencias, la señal se detectaba en flores de todos los estadios de desarrollo. En flores de estadio 7, se observó señal en la parte apical y en la zona adaxial del gineceo (fig. 29 B). En el estadio 8 la actividad GUS se detectaba en la zona apical del gineceo (fig. 29 C). En el estadio 11 la señal se detectaba en la placenta, valvas y la zona central del estilo (fig. 29 D). En estadio 12 la señal GUS era mucho más intensa en la placenta, detectándose débilmente

en óvulos y estilo (fig. 29 E-F). En estadio 14 la señal disminuye pero se detectaba en las mismas zonas que durante el estadio anterior (fig. 29 G). En el estadio 15 la actividad GUS se detectaba únicamente de forma débil en las semillas (fig. 29 H-I).

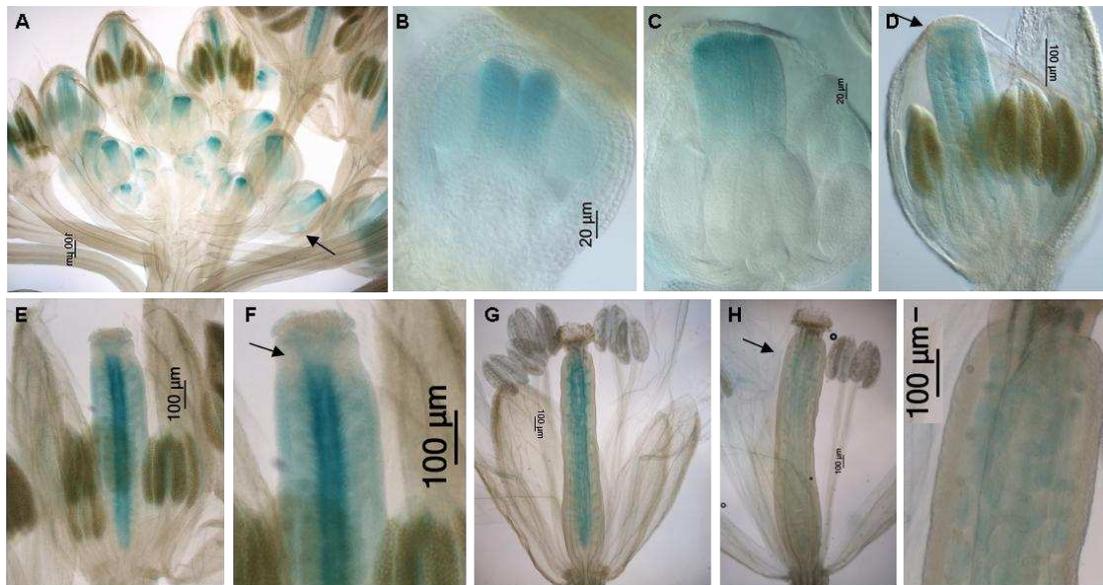


Figura 29. Expresión de *NGA2::GUS* en inflorescencias. Detección histoquímica de actividad GUS conducida por el promotor de *NGA2*. En plántulas se expresa en (A) Visión general de una inflorescencia. (B) Gineceo en estadio 7. La actividad GUS se detecta en la parte apical y en la zona adaxial del gineceo. (C) Gineceo en estadio 8. La señal se detecta en la mitad apical del gineceo. (D) Gineceo en estadio 11. El GUS se observa en placenta, valvas y zona central del estilo. (E) Gineceo en estadio 12. La actividad GUS se detecta en placenta, óvulos y estilo. (F) Detalle de la zona apical del gineceo en estadio 12 (la flecha señala la zona del estilo) (G) Gineceo en estadio 14. La señal se mantiene en las mismas zonas que durante el estadio anterior. (H) Gineceo en estadio 15. La señal GUS se detecta en óvulos (flecha). (I) Detalle de la señal en óvulos observada en gineceos de estadio 15.

1.4. Localización subcelular de las proteínas NGA1 y NGA2.

Los genes NGA tienen un dominio de unión a DNA y, por tanto, era muy probable que actuaran como factores transcripcionales y que su localización subcelular fuera nuclear. Para comprobar la localización de la proteína se amplificó la región codificante de estos genes y se fusionó al extremo C-terminal de la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control del promotor constitutivo 35S (fig. 30).

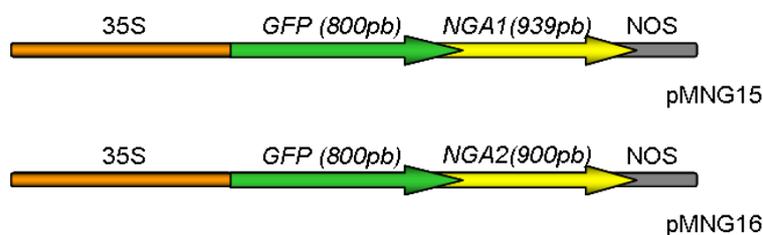


Figura 30. Esquema de las construcciones utilizadas en el experimento de expresión transitoria. Se fusionó la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo N-terminal de las proteínas NGA1 y NGA2. Se representa el promotor 35S (en naranja), el gen de la GFP (en verde), la región codificante del gen *NGA1* o *NGA2* con codón de parada (en amarillo) y finalmente el terminador. Se indica el nombre de la construcción (ver anexo II) así como los tamaños relativos de los genes.

Con estas construcciones se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana*, para conseguir la expresión transitoria del gen. En la figura 31 se muestra el patrón de localización subcelular de cada proteína. En ambos casos la fluorescencia se detectaba en núcleo y citoplasma.

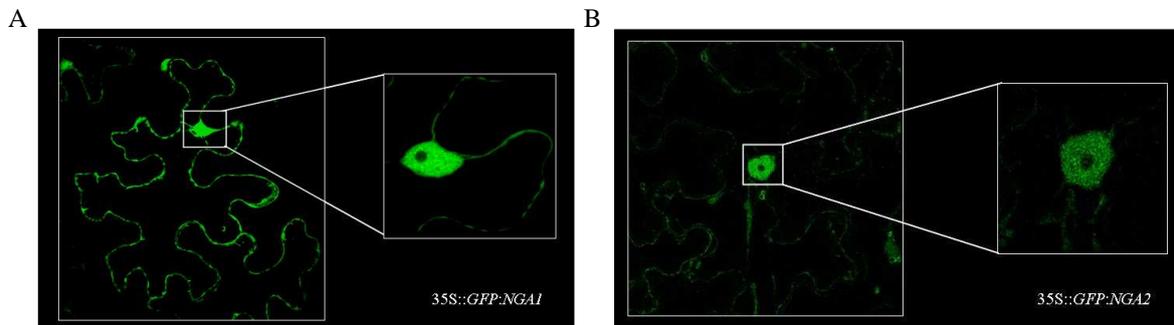


Figura 31. Localización subcelular de NGA1 y NGA2. Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las siguientes construcciones: **(A)** 35S::GFP:NGA1 (pMNG15) **(B)** 35S::GFP:NGA2 (pMNG16).

Para determinar si la localización subcelular era dependiente del tejido o estadio de desarrollo se generaron proteínas de fusión NGA:GFP bajo el control del promotor endógeno correspondiente. Para ello, se tomaron como punto de partida las construcciones realizadas con el gen delator GUS. En ellas se sustituyó dicho gen por el gen de la GFP (fig. 32). Posteriormente se obtuvieron las correspondientes plantas transgénicas.

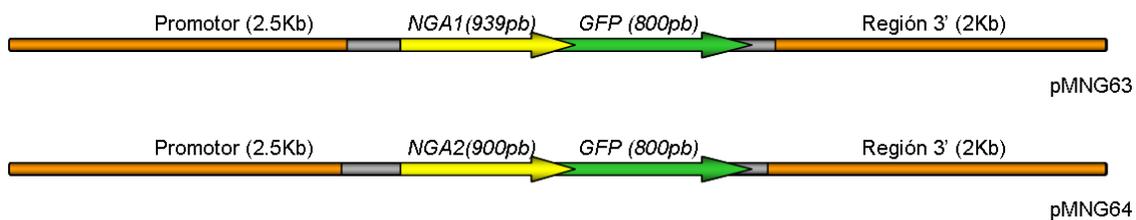


Figura 32. Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar el patrón de expresión de NGA1 y NGA2. Se fusionó la proteína delatora GFP en el extremo C-terminal de las proteínas NGA1 y NGA2. Se representa las regiones 5' y 3' del gen (en naranja) dentro de las cuales se señala tanto la 5'UTR como la 3'UTR (en gris), la región codificante (en amarillo) y el gen GFP (en verde). Se indica el nombre de la construcción (ver anexo II) así como los tamaños relativos de los fragmentos.

Durante la fase vegetativa, ambas proteínas se localizaban en los tricomas de las hojas, concretamente en el núcleo del mismo (fig. 33 B-F), y en el caso de NGA2, en ocasiones puntuales, en pequeños grupos de células aisladas en cotiledones (fig. 33 A), coincidiendo con lo observado con la detección de actividad GUS (fig. 28 A). Cuando se observan al microscopio confocal las raíces de ambas líneas, como era de esperar, sólo en el caso de las proteínas NGA2 se observa señal de GFP, concretamente se localizan en el núcleo de las células de la zona de elongación de la raíz (fig. 33 G-H). Así, en órganos vegetativos la localización subcelular de NGA1 y NGA2 parece ser nuclear.

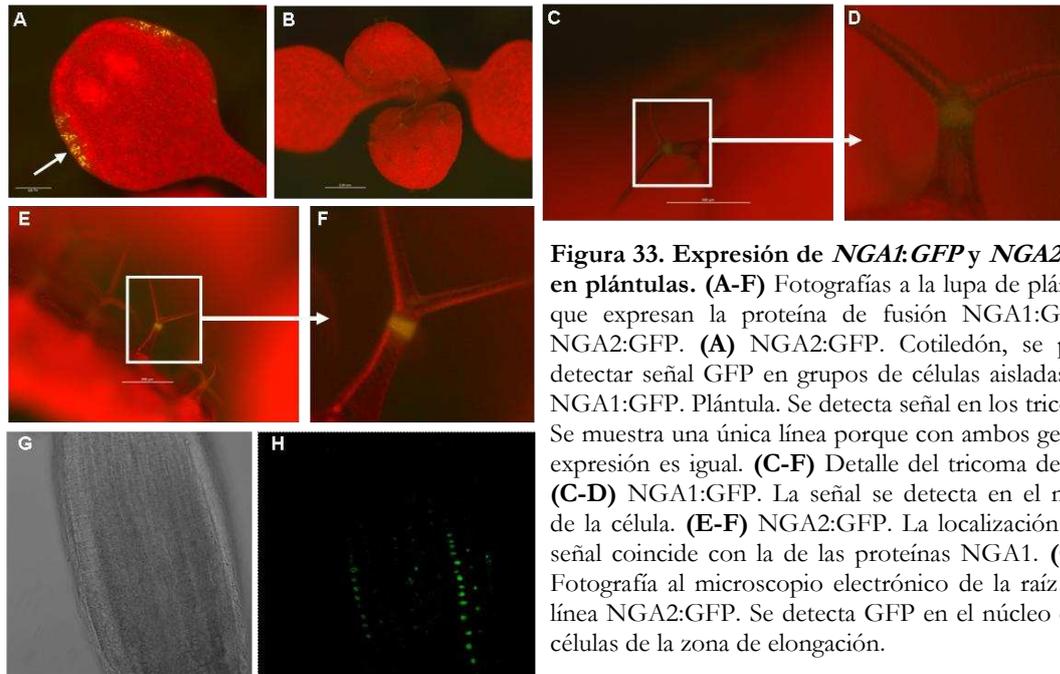


Figura 33. Expresión de *NGA1:GFP* y *NGA2:GFP* en plántulas. (A-F) Fotografías a la lupa de plántulas que expresan la proteína de fusión *NGA1:GFP* o *NGA2:GFP*. (A) *NGA2:GFP*. Cotiledón, se puede detectar señal GFP en grupos de células aisladas. (B) *NGA1:GFP*. Plántula. Se detecta señal en los tricomas. Se muestra una única línea porque con ambos genes la expresión es igual. (C-F) Detalle del tricoma de hoja. (C-D) *NGA1:GFP*. La señal se detecta en el núcleo de la célula. (E-F) *NGA2:GFP*. La localización de la señal coincide con la de las proteínas *NGA1*. (G-H) Fotografía al microscopio electrónico de la raíz de la línea *NGA2:GFP*. Se detecta GFP en el núcleo de las células de la zona de elongación.

Durante la fase reproductiva se observaron al confocal flores en los primeros estadios de desarrollo. Se pudo comprobar como en la línea *NGA2:GFP* se detectaba señal GFP en el extremo distal de los pétalos, en estas células la señal se observaba tanto en núcleo como en citoplasma (fig. 34 A). Cuando se observaban los gineceos, tanto *NGA1* como *NGA2* se localizaban en los mismos tejidos, es decir, en ambos casos la señal se detectaba en las células del estigma (fig. 34 B-F), desde el inicio de su formación (fig. 34 B) hasta que este tejido se encuentra completamente desarrollado (fig. 34 E-F), en esta zona la señal también se observa en núcleo y citoplasma (fig. 34 B-D). Además, las proteínas *NGA1* y *NGA2* se localizaban en el estilo (fig. 34 C y F). De modo que dependiendo del tejido las proteínas *NGA* se localizaban o bien en el núcleo o bien en núcleo y citoplasma.

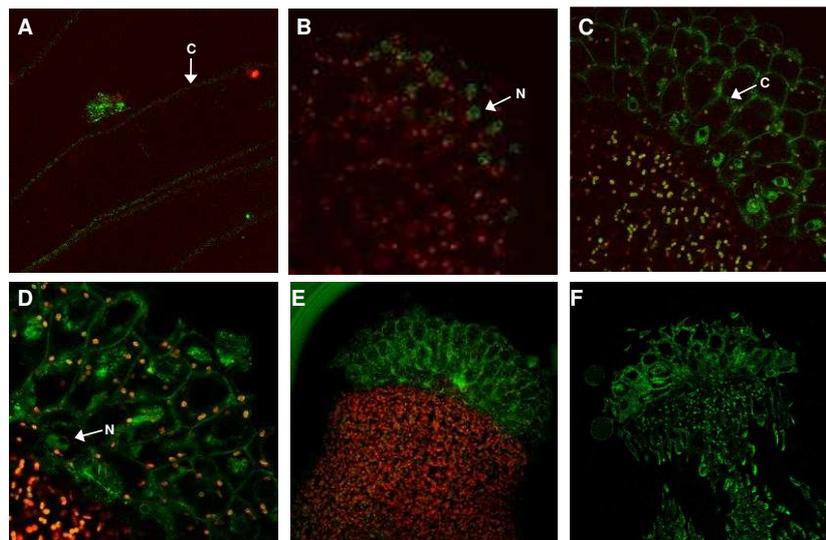


Figura 34. Expresión de *NGA1:GFP* y *NGA2:GFP* en inflorescencias. Fotografías al microscopio confocal. (A) *NGA1:GFP*. Células de pétalos. La señal se observa en núcleo y citoplasma. (B-F) Gineceos de la línea *NGA1:GFP*. (B-E) Detalle de la zona apical del gineceo en diferentes estadios de desarrollo. La proteína GFP se localiza en el núcleo y citoplasma de las células del estigma. (F) Zona apical del gineceo. La señal se observa en el estilo. Se muestra la expresión en el gineceo de la línea *NGA1:GFP* porque el patrón de la línea *NGA2:GFP* es igual. N, núcleo. C, citoplasma.

1.5. Estudio del papel de los genes *NGA* en el desarrollo del gineceo.

Los cuatro mutantes simples nga presentaban defectos sutiles en el desarrollo de la zona apical del gineceo. En trabajos previos del laboratorio se había observado que el mutante nga3-3 presentaba un crecimiento desigual de las valvas, que hacía que el estilo creciera inclinado hacia uno de los lados, mientras que el mutante nga4-3 se caracterizaba por poseer un estilo más alargado que el fruto silvestre. Estos defectos eran mucho más pronunciados en el doble mutante nga3-3 nga4-3, lo que demostraba que ambos genes tenían funciones parcialmente redundantes (Trigueros, 2008). Para estudiar si la redundancia funcional se extendía a todos los miembros de la familia, se generaron mediante cruces todas las combinaciones posibles de dobles y triples mutantes así como el cuádruple mutante. Los alelos utilizados durante la realización de esta tesis fueron nga1-4, nga2-2, nga3-3 y nga4-3, pero para simplificar la nomenclatura cuando se haga referencia a ellos se nombraran como nga1, nga2, nga3 y nga4.

1.5.1 Caracterización fenotípica de los mutantes nga.

En general todas las combinaciones de mutantes presentaban fenotipos mucho más severos que los mutantes simples.

Durante la fase reproductiva y puesto que las mutaciones en los genes *NGA1* y *NGA2* afectaban principalmente al desarrollo del gineceo y del fruto, se observó con detalle el fenotipo del mismo en las diferentes combinaciones de mutantes (fig. 35). Cuando se compararon los diez primeros frutos de los mutantes sencillos nga1 (fig. 35 B), nga2 (fig. 35 C) y del doble mutante nga1nga2 (fig. 35 D) con los de plantas silvestres no se observó ninguna diferencia en cuanto a tamaño y forma. En el caso del resto de los dobles y triples mutantes los fenotipos observados eran más variables. Así pues, los mutantes nga1nga4 (fig. 35 F) y nga2nga4 (fig. 35 H) presentaban frutos con dos fenotipos diferentes, por una parte se podían observar frutos aparentemente iguales a los de plantas silvestres en cuanto a forma y tamaño, y por otra parte frutos más pequeños aunque de morfología similar a los frutos silvestres. En el triple mutante nga1nga2nga4 (fig. 35 J) también se daba esta variabilidad de fenotipos, observando frutos con longitud equivalente al fruto silvestre y frutos más pequeños, pero en este caso en algunos de ellos sí eran evidentes a simple vista los defectos en la formación de la zona apical del gineceo, apareciendo el fruto más estrecho en esta zona y con el estilo inclinado. En el resto de dobles (fig. 35 E y G), triples (fig. 35 I, K y L) y cuádruple mutante (fig. 35 M) el tamaño del fruto se veía seriamente afectado así como el número de semillas que producía, el cual era muy reducido. Los defectos en la formación de la zona apical del gineceo eran evidentes, apareciendo los frutos sin fusionar en la parte apical.



Figura 35. Comparación de la morfología de los diez primeros frutos de los distintos mutantes *nga* y sus combinaciones con respecto a las plantas silvestres. (A) *Col-0*. (B) *nga1*. (C) *nga2*. (D) *nga1nga2*. (E) *nga1nga3*. (F) *nga1nga4*. (G) *nga2nga3*. (H) *nga2nga4*. (I) *nga1nga2nga3*. (J) *nga1nga2nga4*. (K) *nga1nga3nga4*. (L) *nga2nga3nga4*. (M) *nga1nga2nga3nga4*. Las unidades de la regla son mm.

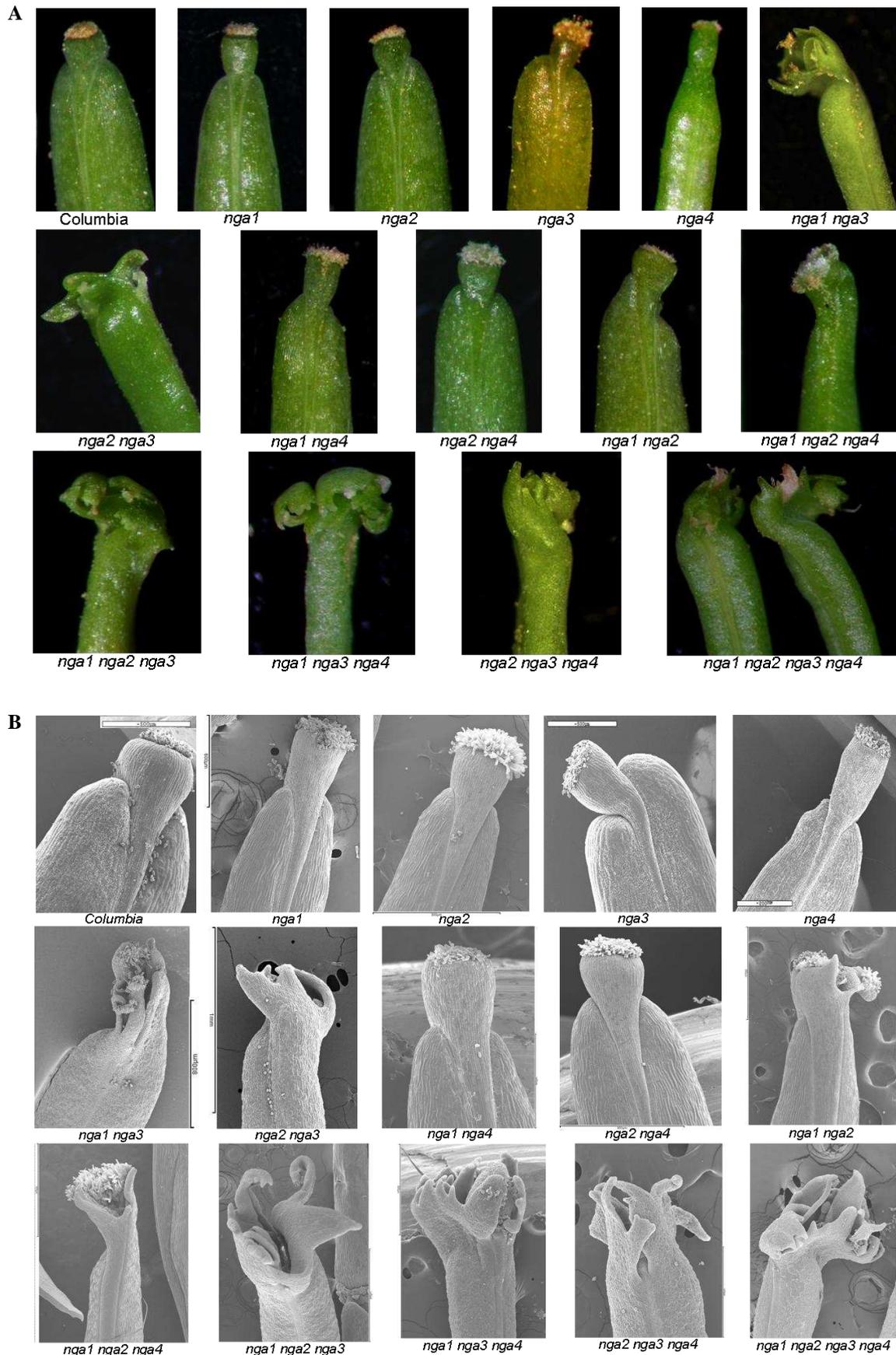


Figura 36. Caracterización fenotípica de la zona apical del fruto en los distintos mutantes *nga* y sus combinaciones con respecto a plantas silvestres. (A) Fotos en la lupa de frutos en estadio 17. (B) Fotos al microscopio electrónico de barrido de frutos en estadio 17.

A continuación se estudió con detalle la zona apical del fruto, bien a la lupa o bien en el microscopio electrónico. Observamos como a medida que el número de mutaciones aumentaba, los defectos en el fruto también lo hacían (fig. 36). Así pues, aunque en los mutantes sencillos los defectos eran prácticamente inapreciables, los dobles mutantes analizados mostraban defectos más severos en el desarrollo del gineceo, sobre todo si estaba presente el alelo nga3-3. En los dobles mutantes nga1 nga3 y nga2 nga3 prácticamente no se formaban estilo ni estigma, aunque en ocasiones aparecían estos dos tipos de tejidos en zonas aisladas de la parte apical del fruto, que además aparecía siempre sin fusionar. En el resto de dobles mutantes el fenotipo era tan sólo ligeramente más evidente que el de los mutantes sencillos. Todos ellos se caracterizaban por presentar un crecimiento desigual de las valvas, el cual era más evidente en el doble mutante nga1 nga2, en el que en ocasiones aparecía el estilo abierto. En nga1 nga4, los frutos además presentaban un estilo más largo y estrecho que el del ecotipo silvestre. El fenotipo del triple mutante nga1 nga2 nga4 era un poco más severo que el del doble nga1 nga2: los frutos mostraban un crecimiento desigual de las valvas así como defectos en la fusión de la parte apical del fruto. El resto de los triples mutantes obtenidos y el cuádruple mutante presentaban fenotipos similares y muy severos, en el que la zona apical estaba prácticamente ausente ya que no se formaban ni estilo ni estigma, el fruto aparecía sin fusionar y presentaba un borde irregular. Estas líneas también presentaban una fase reproductiva mucho más larga que la línea silvestre, produciendo muchas más flores y frutos de fertilidad muy reducida.

En la fase vegetativa se comprobó que en el triple mutante nga2 nga3 nga4 y en el cuádruple mutante nga las rosetas presentaban hojas más aserradas que las del ecotipo silvestre (fig. 37), por lo que se procedió a estudiar con más detalle la roseta del resto de líneas mutantes. Los mutantes sencillos nga1 y nga2 y los dobles mutantes nga1 nga2, nga1 nga3, nga1 nga4, nga2 nga3 y nga2 nga4 no muestran diferencias en la morfología de la roseta con respecto a la de plantas silvestres. En el caso de los triples mutantes nga1 nga2 nga3 y nga1 nga3 nga4 la morfología de la roseta es igual a la de las plantas silvestres, pero en el caso de la línea nga2 nga3 nga4 se observan ciertas diferencias. En estas plantas las hojas son más aserradas que las del ecotipo silvestre, siendo similares a las de las líneas nga1 nga2 nga3 nga4.

Estos resultados junto con los defectos observados durante la caracterización fenotípica del desarrollo del fruto permiten concluir que los genes NGA funcionan redundantemente dirigiendo distintos procesos del desarrollo, como la morfología foliar y la diferenciación del estilo y el estigma del gineceo.

Estos resultados junto con los defectos observados durante la caracterización fenotípica del desarrollo del fruto permiten concluir que los genes NGA funcionan redundantemente dirigiendo distintos procesos del desarrollo, como la morfología foliar y la diferenciación del estilo y el estigma del gineceo.

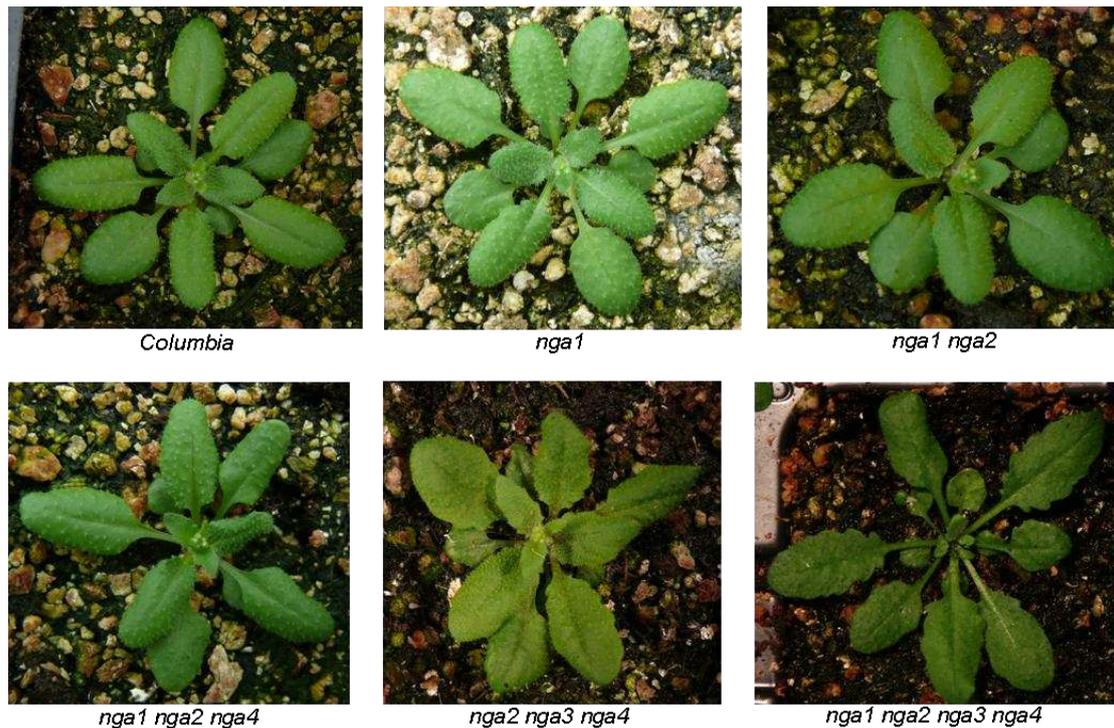


Figura 37. Comparación de la morfología de la hoja. De izquierda a derecha y de arriba abajo podemos observar la roseta de *Columbia 0*, mutante sencillo *nga1*, doble mutante *nga1nga2*, triple mutante *nga1nga2nga3* y *nga2nga3nga4* y el cuádruple mutante *nga*. En el caso de mutantes sencillos, dobles y triples se muestra una única roseta porque en todas ellas el fenotipo de la roseta era idéntico, a excepción del triple *nga2nga3nga4* que presentaba hojas más aserradas que el resto de triple mutantes.

Por otra parte, el análisis fenotípico de las combinaciones de mutantes permitió determinar la fuerza relativa de cada uno de los alelos utilizados. Teniendo en cuenta esto, el orden sería el siguiente:

$$\text{nga3-3} > \text{nga4-3} > \text{nga2-2} \approx \text{nga1-4}$$

Aquí cabe destacar que, a excepción de *nga4-3*, que sí parece tratarse de un alelo nulo, entre los otros alelos encontramos alelos que probablemente tengan un efecto negativo y dependiente de dosis en la correcta función de las proteínas, como podría ser el caso de *nga3-3*, y otros alelos probablemente muy débiles, como el caso del alelo *nga1-4*, que sólo afectan ligeramente a los niveles de expresión del transcrito.

Debido a que no todos los mutantes de los que se disponía eran nulos y para facilitar el análisis genético se generó un microRNA artificial que dirigía la degradación selectiva y específica de los ARNm de los cuatro genes NGA. Se eligió una secuencia consenso de 21pb (GAGGACACATGTTTCGTC AAAG) (fig. 38) y mediante PCRs seriadas se sustituyó el microRNA de la horquilla del miR319a presente en el plásmido RS300 por el microRNA específico para los genes NGA (Schwab et al., 2006). Posteriormente este microRNA se clonó en el vector pCHF3 bajo el control del promotor CaMV35S (pMNG19) y se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Tras generarse las correspondientes plantas transgénicas de *Arabidopsis* se obtuvieron 5 líneas independientes, homocigotas y con una única copia del transgen, denominadas pMNG19 3.14.2, 3.14.5, 3.14.6, 3.14.9 y 3.14.14.

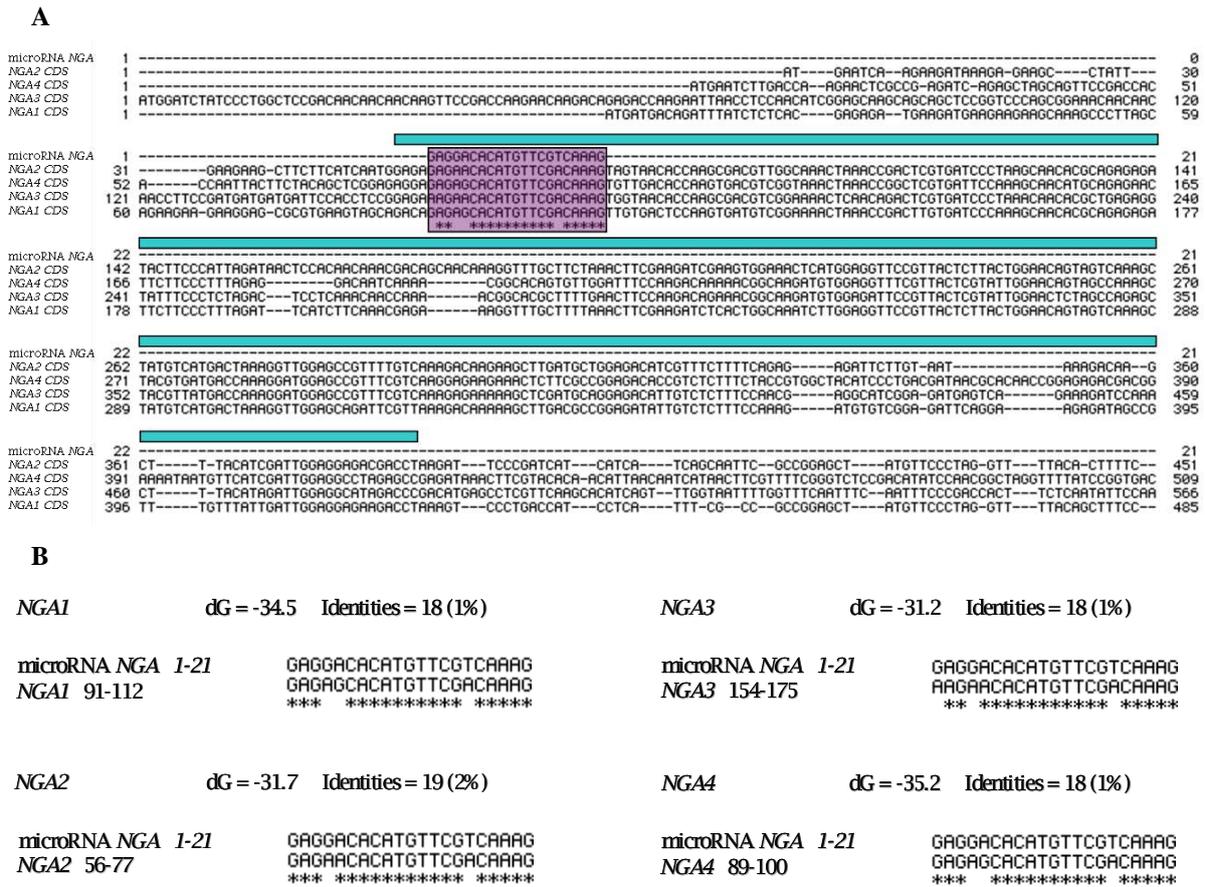


Figura 38. Diseño del amiR-NGA. (A) Alineamiento de las secuencias completas de los genes *NGA* con la secuencia del microRNA artificial para señalar su localización dentro de cada gen. En azul se señala el dominio B3 y en morado la región con la que aparea el microRNA **(B)** Alineamiento de la secuencia del amiR-NGA con cada una de sus dianas *NGA*. El valor dG corresponde a la energía libre de apareamiento microRNA/diana expresada en kcal/mol.

Para comprobar el nivel de transcrito presente de cada uno de los genes *NGA* se llevó a cabo el análisis molecular de las líneas transgénicas obtenidas. Para ello se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real en inflorescencias de Col-0 y de las cinco líneas transgénicas, comprobándose como, en líneas generales, el nivel de ARNm de los cuatro genes era significativamente menor con respecto al silvestre. La expresión de *NGA2* y *NGA3* se reducía en menor medida que la de los otros dos genes de la familia, resultado que concordaba con la menor energía libre de apareamiento entre el ARNm de *NGA2* y *NGA3* y el miRNA y, por tanto, la menor especificidad frente al microRNA. De las cinco líneas, la que presentaba unos niveles de transcrito más bajos de los genes *NGA* era la línea 3.14.6, con excepción de los niveles del gen *NGA1*, que se detectaba a un nivel más bajo en la línea 3.14.2 (fig. 39). A pesar de esa diferencia en los niveles de transcritos presente para cada gen, el fenotipo de las cinco líneas transgénicas era idéntico.

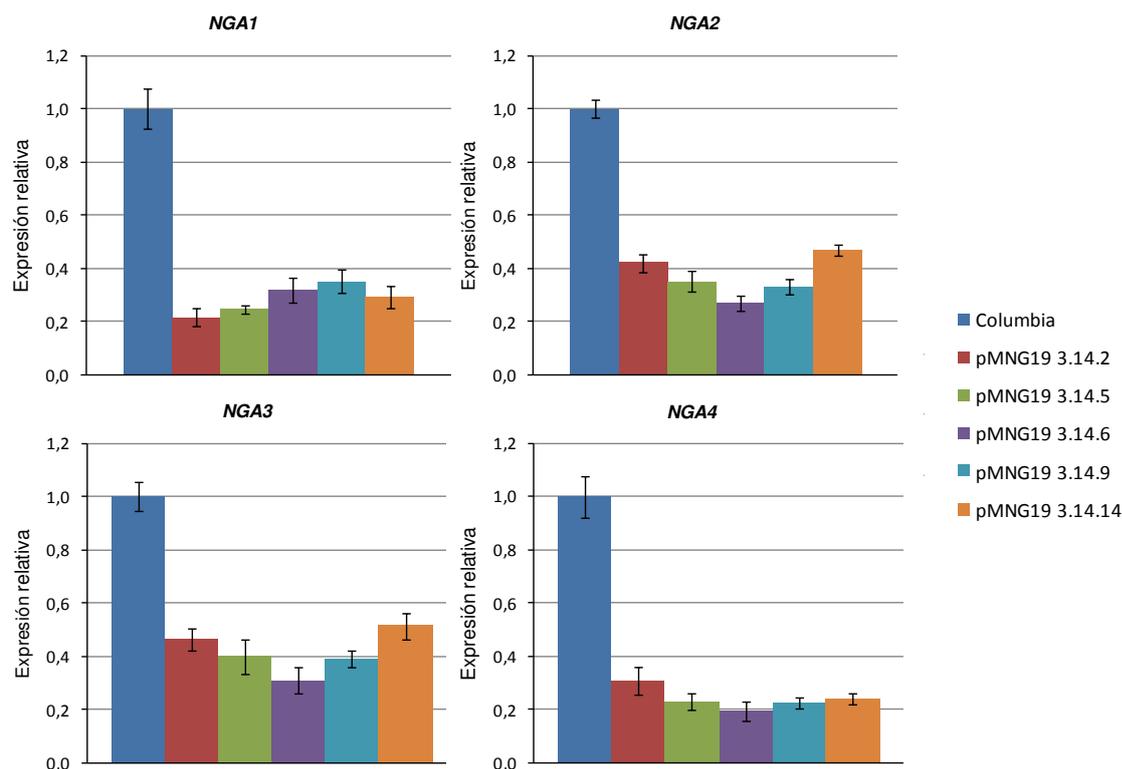


Figura 39. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). Se realizó en inflorescencias de *Columbia* y cinco líneas transgénicas amiR-NGA independientes con fenotipo fuerte para comprobar la reducción de los niveles de ARNm completo de los cuatro genes *NGA*. En cada gráfica se representan los niveles de expresión relativa a los niveles de expresión en plantas silvestres, con la desviación estándar de muestras por triplicado.

Estas líneas presentaban un fenotipo más severo que el del cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4*, probablemente debido a la mayor reducción de los niveles de *NGA1*. En la fase vegetativa las hojas de la roseta del amiR-NGA eran más pequeñas y redondeadas que en el caso de las líneas silvestres y el cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4* (fig. 40).

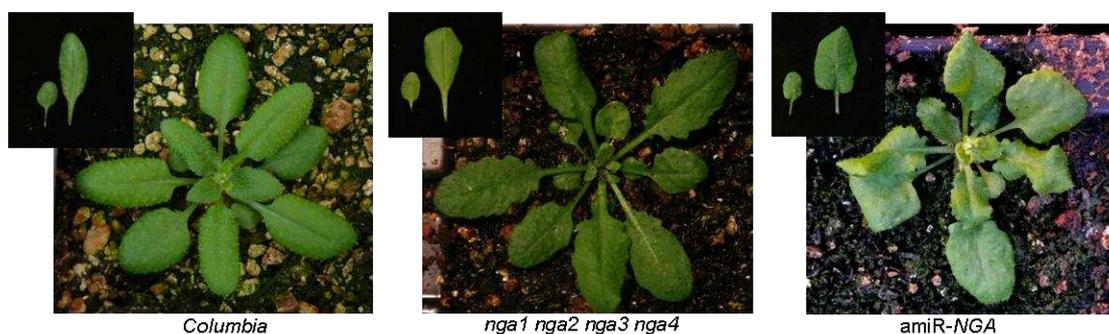


Figura 40. Comparación de la morfología de la hoja. Fenotipo de la roseta de *Columbia* 0, *nga1nga2nga3nga4* y la línea amiR-NGA.

En la fase reproductiva, las plantas eran idénticas en cuanto a envergadura y morfología a las del cuádruple mutante *nga*. Pero cuando se observaban con más detalle las inflorescencias de la línea amiR-NGA, se comprobó como pétalos, sépalos y estambres eran más cortos, lo que hacía que se pudiera ver el gineceo sobresaliendo por encima de éstos cuando las flores aún estaban cerradas (fig. 41). Junto con el fenotipo

en el desarrollo de la hoja, estos resultados sugieren un posible papel más general de los genes NGA en la regulación del crecimiento de los órganos laterales.

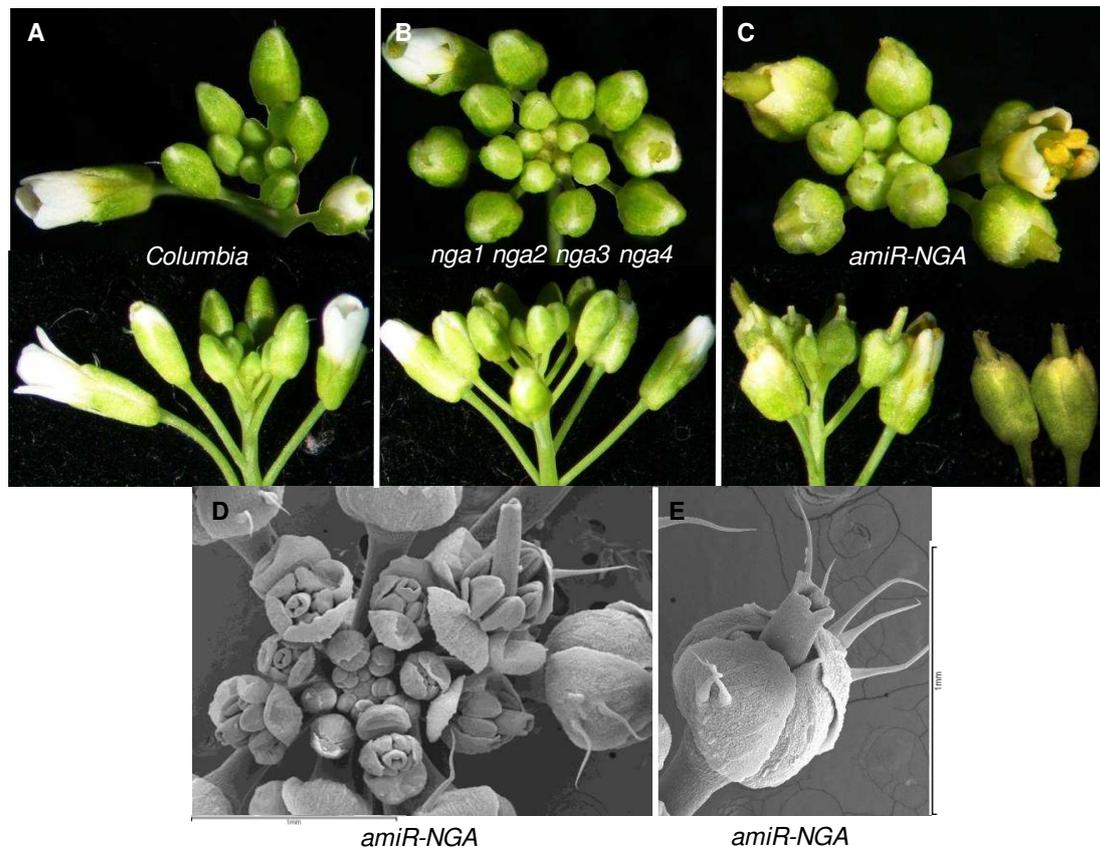


Figura 41. Caracterización fenotípica de la inflorescencia de las líneas *amiR-NGA* con respecto a la planta silvestre y al cuádruple mutante *nga*. En la parte superior se muestran fotografías a la lupa de inflorescencias de (A) *Columbia*, (B) *nga1 nga2 nga3 nga4* y (C) la línea *amiR-NGA*. (D) Fotografía al microscopio electrónico de barrido de una inflorescencia de la línea *amiR-NGA*. (E) Detalle de una flor, donde se puede apreciar como el gineceo sobresale por encima de sépalos y pétalos.

Los carpelos presentaban defectos en el desarrollo similares a los del cuádruple mutante *nga*, es decir, frutos más pequeños, con menor número de semillas y una zona apical en la que estilo y estigma no se forman correctamente (fig. 42). Los defectos en la zona apical observados en el cuádruple mutante parecían más severos, con una mayor desorganización del tejido, pero en ambos casos esta zona apical no se formaba correctamente, apareciendo los frutos abiertos por la parte superior. En las líneas *amiR-NGA* en ocasiones se formaba algo de tejido estilar y estigmático.

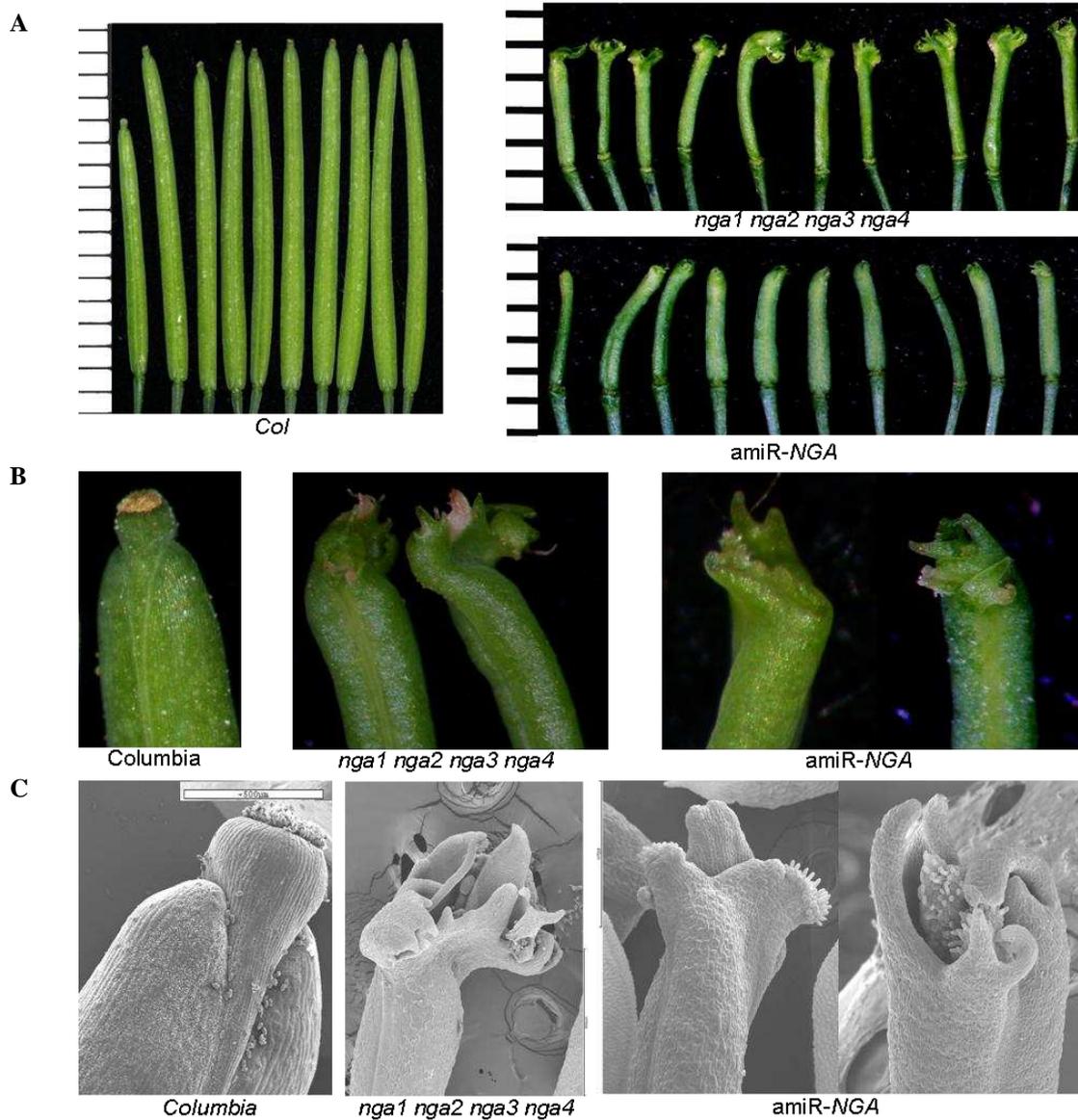


Figura 42. Caracterización fenotípica del fruto de las líneas *amiR-NGA* con respecto a la planta silvestre y al cuádruple mutante *nga*. (A) Comparación del tamaño de los diez primeros frutos de *Columbia*, *nga1nga2nga3nga4* y la línea *amiR-NGA*. Las unidades de la regla son mm. (B) Fotos a la lupa de la zona apical del fruto de *Columbia*, *nga1nga2nga3nga4* y la línea *amiR-NGA*. (C) Fotos al microscopio electrónico de barrido de la zona apical del fruto de *Columbia*, *nga1nga2nga3nga4* y la línea *amiR-NGA*.

1.6. Obtención de líneas de sobreexpresión para el gen *NGA1*.

Los resultados obtenidos indicaban que los genes *NGA* participaban de forma redundante en diversos procesos del desarrollo, pero no permitían deducir si todas las proteínas *NGA* eran funcionalmente equivalentes, ya que los defectos observados en la formación de la zona apical del fruto de las líneas mutantes no era idéntico para todos los genes. La familia *NGA* se puede subdividir en dos subfamilias, de modo que por su similitud de secuencia se tendría un subgrupo formado por *NGA1* y *NGA2* y otro formado por *NGA3* y *NGA4*, siendo *NGA1* y *NGA3* los genes con un nivel de expresión más elevado en inflorescencias. Para comprobar si *NGA1* y *NGA3* eran proteínas equivalentes, se decidió comparar el efecto de la sobreexpresión de ambos genes. En el laboratorio ya se disponía de dos líneas de sobreexpresión para el gen *NGA3*. La que presentaba un fenotipo más severo (línea *pMT17.1*) se caracterizaba por un

acortamiento notable de las valvas, ginóforo más largo y un replum en zig-zag, mientras que la de fenotipo más débil (pMT17.2) presentaba fenotipos similares en valva y ginóforo, pero menos acusados (Trigueros et al., 2009). Para obtener la línea de sobreexpresión de NGA1 se clonó la región codificante del gen en el vector pGreenII 0029 bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (pMNG48) y se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 pJIC. A continuación se transformaron plantas de *Arabidopsis* obteniéndose plantas transgénicas.

Además, para estudiar si las proteínas NGA podrían comportarse como activadores transcripcionales, se generaron plantas transgénicas que sobreexpresaban el gen NGA1 fusionado al dominio VP16 (pMNG56) Este dominio es un activador transcripcional que proviene del gen VP16 del virus Herpes simple, por tanto, era de esperar que la proteína de fusión NGA1:VP16 se comportara como un activador transcripcional. Esta construcción se hizo en el mismo vector que la línea de sobreexpresión constitutiva.

1.6.1. Caracterización fenotípica y genética de las plantas transgénicas.

Se consiguieron gran cantidad de líneas 35S::NGA1, es decir, portadoras del transgén pMNG48, en torno a 150, pero únicamente una de ellas presentaba un fenotipo evidente. A partir de esta línea se obtuvieron líneas con una única copia del transgén que continuaban mostrando el fenotipo de la primera generación. El que sólo una línea mostrara fenotipo no era algo tan inesperado como parecería, ya que en ocasiones anteriores habíamos tenido problemas similares para obtener otras líneas transgénicas que sobreexpresaban NGA3 o NGA4. Estos problemas generalmente se producían porque las pocas líneas que mostraban fenotipo en la primera generación lo perdían en la siguiente, probablemente como consecuencia del silenciamiento del transgén. Esta suposición se veía reforzada por el hecho de que cuando se intentaron generar líneas portadoras del transgén 35S::GFP:NGA1 o 35S::GFP:NGA2, en ninguna de las plantas analizadas se detectó señal GFP.

La caracterización fenotípica de la línea 35S::NGA1 (pMNG48) se realizó mediante comparación con plantas silvestres. Se observó que las plantas transgénicas presentaban hojas alargadas (fig. 43 B), un porte más pequeño y frutos también de menor tamaño. Los frutos mostraban ginóforos más largos, un crecimiento desigual de las valvas que hacía que en la parte basal no comenzaran en el mismo punto y que en la zona apical sobresalieran por encima de estilo y estigma a modo de hombros (fig. 43 D). Si se comparaba el fenotipo de la línea de sobreexpresión de NGA1 con la de NGA3 se podía observar como las hojas de la roseta en ambos casos tenían el mismo fenotipo, es decir, hojas estrechas y alargadas (fig. 43 A-B). Los frutos eran muy similares a los de la línea 2 de 35S::NGA3 (línea pMT17.2) (fig. 43 C-E) (Trigueros, 2008). Por tanto, las proteínas NGA1 y NGA3 parecen tener funciones equivalentes tanto en la hoja como en el fruto.

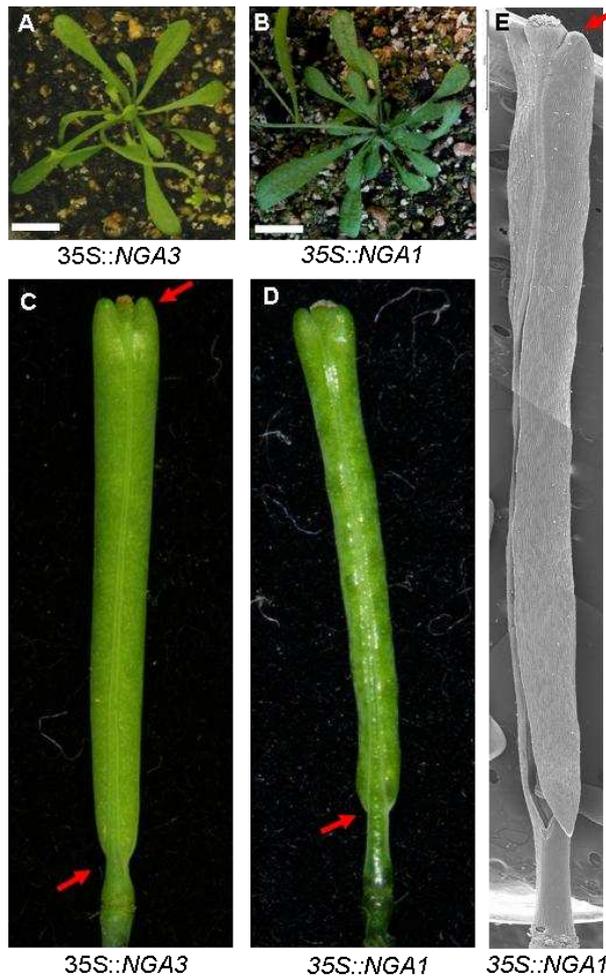


Figura 43. Comparación de los fenotipos causados por la expresión ectópica de *NGA1* y *NGA3*. Roseta de plantas (A) 35S::*NGA3* (pMT17.2) y (B) 35S::*NGA1* (pMNG48). Fotos a la lupa de silicuas maduras de (C) 35S::*NGA3* (pMT17.2) y (D) 35S::*NGA1* (pMNG48). (E) Foto al microscopio electrónico de barrido de frutos en estadio 17 de la línea 35S::*NGA1*. Las flechas indican el punto donde termina el ginóforo así como el mayor crecimiento de las valvas en la zona apical del fruto.

Obtenida la línea 35S::*NGA1*:VP16 (pMNG56) se llevó a cabo su caracterización y posterior comparación con la línea 35S::*NGA1*. Al igual que ocurrió con la línea 35S::*NGA1*, a pesar de que se obtuvieron alrededor de 200 plantas portadoras del transgén únicamente dos de ellas mostraron un fenotipo evidente. Ambas líneas presentaban hojas estrechas y alargadas similares a las de la línea de sobreexpresión de *NGA1* (fig. 44).

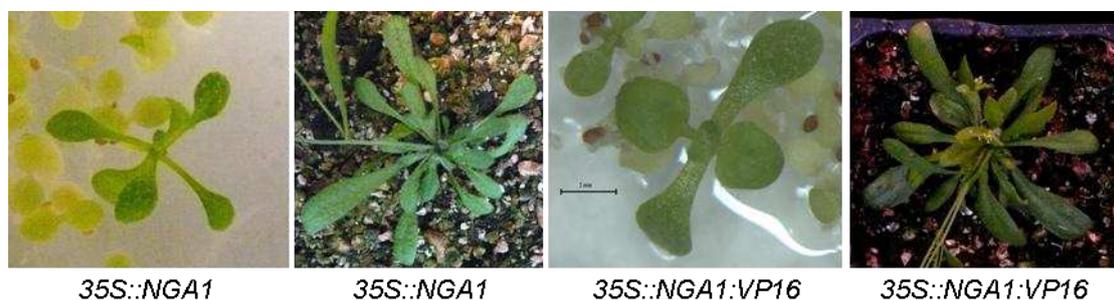


Figura 44. Fenotipo causado por la expresión ectópica de *NGA1*. Plántula y roseta de las líneas 35S::*NGA1* y 35S::*NGA1*:VP16.

En líneas generales los frutos de las dos líneas 35S::*NGA1*:VP16 (fig. 45 H-J) eran más pequeños que los de la línea 35S::*NGA1* (fig. 45 G) y presentaban un mayor desarrollo del tejido estigmático. La línea 35S::*NGA1*:VP16.1 (fig. 45 B, E y H) era fenotípicamente muy similar a la línea 35S::*NGA1* (fig. 45 A, D y G) pero cuando se

observaba al microscopio electrónico de barrido se podían apreciar algunas diferencias. Las valvas se mantenían por debajo del estigma y el ginóforo era ligeramente más largo al de la línea 35S::*NGA1*. En la línea 35S::*NGA1:VP16* el ginóforo representaba 1/6 de la longitud total del fruto mientras que en la línea 35S::*NGA1* representaba 1/8 del mismo. La línea 35S::*NGA1:VP16.2* (fig. 45 C, F y I-J) presentaba un fenotipo más severo, con un mayor desarrollo de las papilas estigmáticas, una mayor reducción del tamaño total y una distribución de tejidos más afectada. En esta línea el ginóforo representaba algo menos de un tercio del fruto.

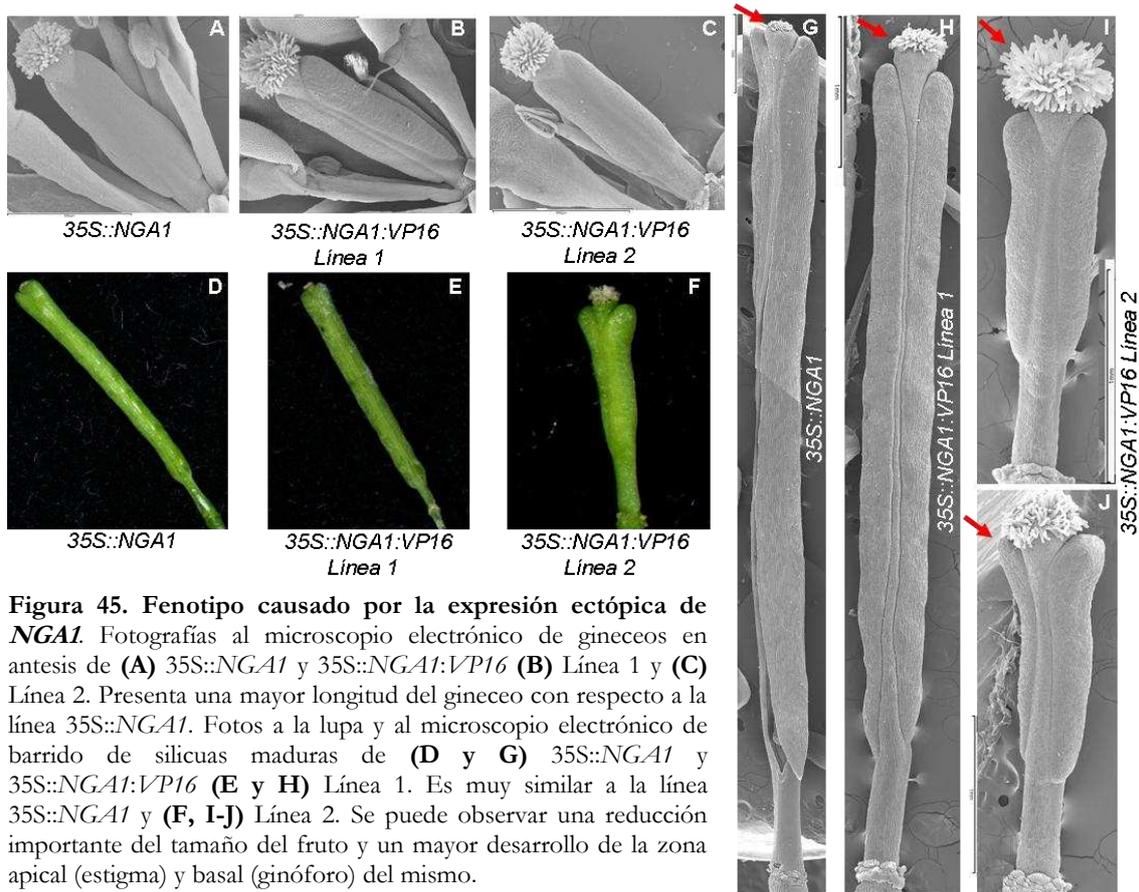


Figura 45. Fenotipo causado por la expresión ectópica de *NGA1*. Fotografías al microscopio electrónico de gineceos en anthesis de (A) 35S::*NGA1* y 35S::*NGA1:VP16* (B) Línea 1 y (C) Línea 2. Presenta una mayor longitud del gineceo con respecto a la línea 35S::*NGA1*. Fotos a la lupa y al microscopio electrónico de barrido de silicuas maduras de (D y G) 35S::*NGA1* y 35S::*NGA1:VP16* (E y H) Línea 1. Es muy similar a la línea 35S::*NGA1* y (F, I-J) Línea 2. Se puede observar una reducción importante del tamaño del fruto y un mayor desarrollo de la zona apical (estigma) y basal (ginóforo) del mismo.

Aunque la similitud de fenotipos entre las líneas 35S::*NGA1* y 35S::*NGA1:VP16* parecía indicar que *NGA1* podría actuar como un activador transcripcional, a partir de las pocas líneas obtenidas y debido a la variabilidad en los fenotipos no fue posible extraer una conclusión sobre el papel de *NGA1* como activador o represor transcripcional en el desarrollo del gineceo.

Capítulo 2. El papel de los genes *NGA* en las rutas de señalización hormonal.

2.1. Los mutantes *nga* tienen afectada la respuesta a auxinas.

La caracterización genética y molecular de los genes *NGA* sugería que podían estar relacionados con rutas de señalización por auxinas.

Uno de los resultados que apoyaban esta hipótesis era el fenotipo de las líneas de sobreexpresión de *NGA1* o *NGA3*, el cual era semejante al de plantas con niveles de auxinas elevados. Así pues, la morfología de la roseta de plantas *35S::NGA1* o *35S::NGA3* era muy similar a la de plantas que sobreexpresaban los genes de biosíntesis de auxinas *YUCCA* (Woodward et al., 2005; Kim et al., 2007). Por otra parte, la expresión del gen delator *GUS* tanto para *NGA1* como para *NGA2* se detectó en posiciones normalmente asociadas con altos niveles de síntesis o acumulación de auxinas, tal como primordios de raíces laterales, parte distal del gineceo o primordios de óvulos (Aloni et al., 2003; 2006). Por estas razones se decidió analizar esta posibilidad con más profundidad.

En primer lugar se comprobó si la pérdida de función de los genes *NGA* afectaba la respuesta a auxinas. Para ello se determinaron respuestas a auxinas clásicas en mutantes *nga* y la línea *amiR-NGA*, como formación de raíces laterales, gravitropismo radicular y dominancia apical.

Para el experimento de cuantificación de **raíces laterales** las semillas se germinaron en placas colocadas verticalmente. Tras cuantificar el número de raíces laterales en plantas crecidas durante 10 días se observó que en los mutantes sencillos y el doble mutante no existían diferencias significativas con respecto a las plantas silvestres, pero en cambio sí se producía un aumento significativo del número de raíces laterales en el cuádruple mutante *nga* y la línea *amiR-NGA* (fig. 46).

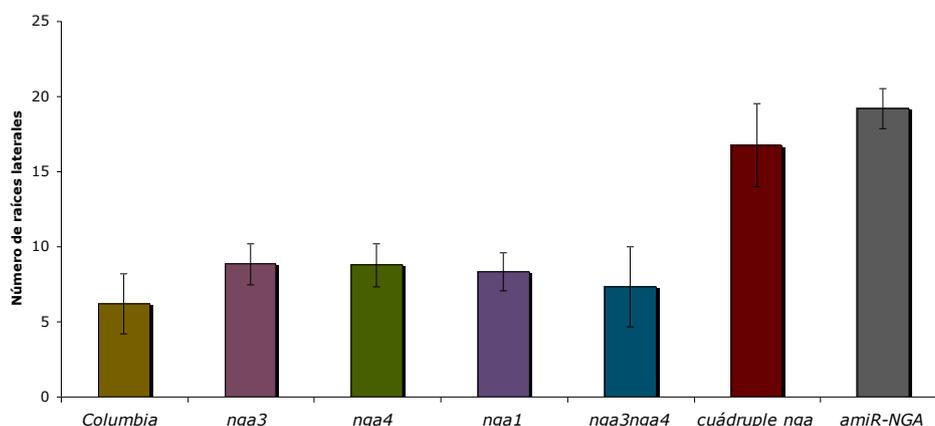


Figura 46. Número de primordios de raíces laterales en plantas silvestres y en diferentes líneas mutantes *nga*. Las raíces laterales se contaron en plántulas crecidas en placas verticales durante 10 días (n=20). Las barras representan la desviación típica.

Para estudiar el efecto del **gravitropismo**, se germinaron las semillas en placas colocadas en posición vertical. En estas condiciones se dejaron crecer las plantas durante cinco días antes de girar las placas 90°. Un día después, se midió el ángulo formado al reorientarse la raíz respecto al vector de la gravedad. En los doble mutantes la percepción de la gravedad no estaba demasiado afectada, reorientándose el crecimiento de la raíz de modo similar al de las plantas silvestres. Sin embargo, el

gravitropismo sí parecía bastante alterado en el cuádruple mutante *nga* y la línea *amiR-NGA*, en los que la raíz no se reorientaba con la gravedad tan eficazmente como lo hacía la de plantas silvestres (fig. 47).

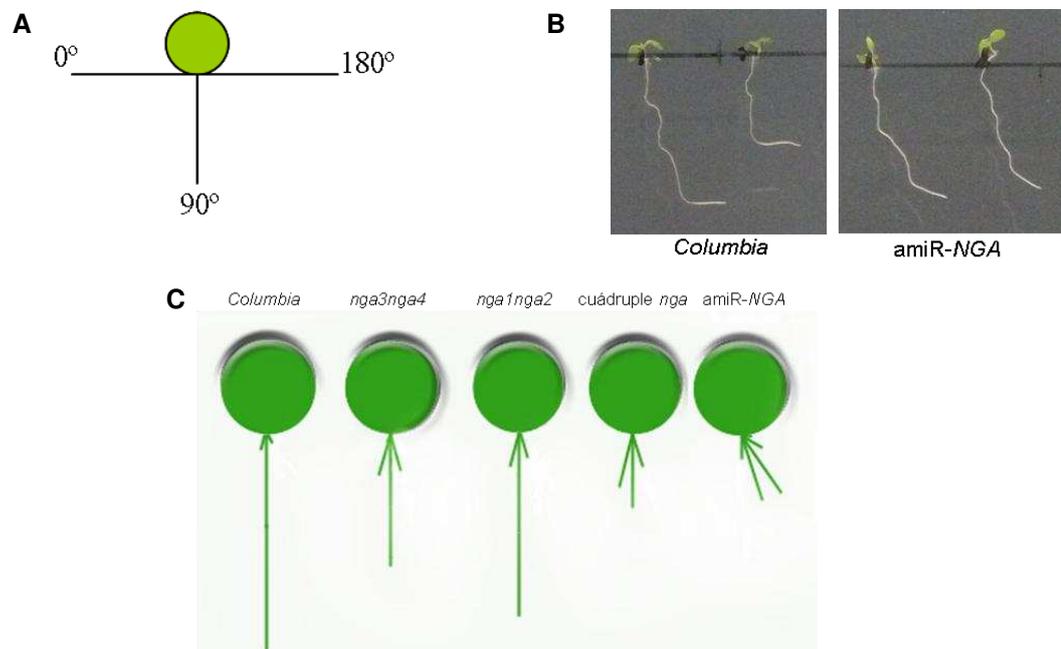


Figura 47. Estudio de gravitropismo en plantas silvestres y en diferentes líneas mutantes *nga*. (A) Esquema de cómo se representan los ángulos en la figura. Se dividieron los 180° en fracciones de 22,5°, empezando de izquierda a derecha situándose los 0° a la izquierda y los 180° a la derecha. Se cuantificó el número de raíces que se reorientan dentro de cada fracción. (B) Ejemplo de la curvatura de la raíz en plántulas silvestres y *amiR-NGA*. (C) Ángulo que forma la raíz principal de plántulas crecidas en placas verticales 24 horas después de girar la placa 90°. La longitud de cada línea representa el número de plántulas cuya raíz crece con ese ángulo. (n=25).

En el caso del estudio de la **dominancia apical**, se contabilizó el número de inflorescencias laterales y coflorescencias en plantas silvestres y en diferentes fondos mutantes. En cuanto al número de inflorescencias laterales no se observaron diferencias significativas entre plantas silvestres y mutantes. El número de coflorescencias de los mutantes sencillos y el doble mutante era igual al de las plantas silvestres. Sin embargo, el cuádruple mutante *nga* y la línea *amiR-NGA* mostraban un mayor número de coflorescencias, lo que indicaba una disminución de la dominancia apical (fig. 48).

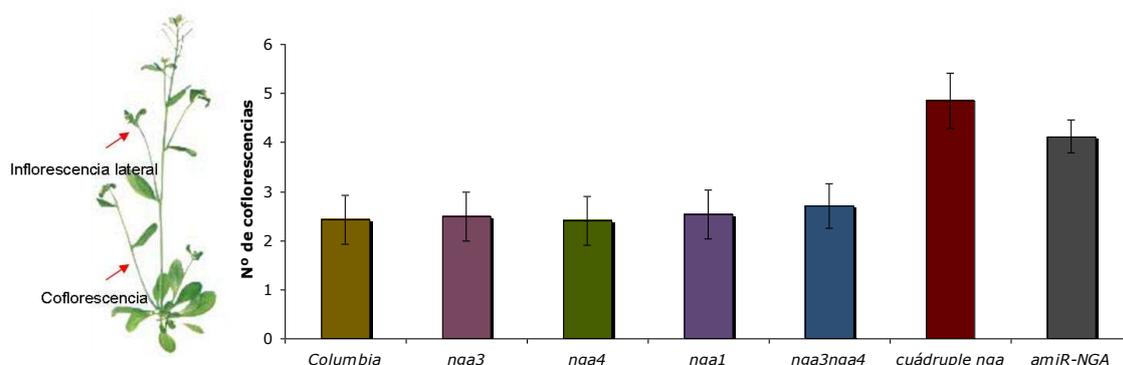


Figura 48. Dominancia apical. Se contabilizaron las inflorescencias de la roseta o coflorescencias de longitud superior a 1cm en plantas silvestres y diferentes líneas mutantes *nga* cuando la inflorescencia principal había crecido aproximadamente 10cm (n=30, excepto para el cuádruple *nga* y la línea *amiR-NGA* donde n=20). Las barras representan la desviación típica.

Puesto que los mutantes *nga* presentaban respuestas a auxinas alteradas, se decidió estudiar la distribución de los haces vasculares en los gineceos de las líneas mutantes, ya que se conoce que el desarrollo vascular está inducido por auxinas (Reinhardt, 2003). En gineceos silvestres (fig. 49 A) en antesis se pueden observar dos haces vasculares en posición medial (haces mediales) que discurren a lo largo del replum bifurcándose cerca de la unión valva-estilo para formar haces vasculares ramificados (haces estilares), y dos haces vasculares en posición lateral (haces laterales). Este patrón se puede determinar fácilmente cuando se observan mediante microscopía de campo oscuro gineceos tratados con hidrato de cloral. Puesto que los mutantes sencillos y algunos de los dobles mutantes con los que se trabajó apenas tenían fenotipo y el resto de dobles mutantes mostraban un fenotipo similar al de los triples mutantes, el estudio de los haces vasculares se decidió hacer únicamente en triples (fig. 49 B-C) y en el cuádruple mutante (fig. 49 D). Como se puede observar en la figura, en estas líneas el desarrollo vascular estaba fuertemente afectado. El haz medial en la mayoría de los casos no se bifurcaba y se detenía bajo la región que correspondería al estilo. Consecuentemente no se formaban los haces estilares. Por el contrario, los haces laterales parecían menos afectados (fig. 49 B-D).

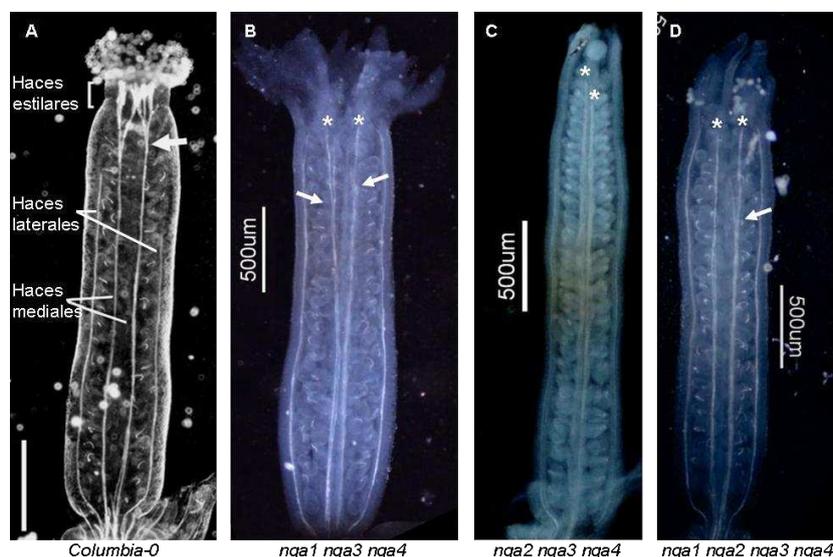


Figura 49. Distribución de los haces vasculares en gineceos en antesis de plantas silvestres y diferentes combinaciones de mutantes *nga*. (A) *Columbia*. (B) *nga1 nga3 nga4*. Los haces estilares no se forman. (C) *nga2 nga3 nga4*. Los haces mediales no se bifurcan ni se forman los haces estilares. (D) Cuádruple mutante *nga*. En la mayoría de los casos los haces mediales no se bifurcan y no se forman los haces estilares. Las flechas indican el punto de bifurcación de los haces mediales y los asteriscos dónde se detienen.

En mutantes con defectos en la región apical del gineceo, como por ejemplo *spt*, *lug* o *crc*, la aplicación de un inhibidor del transporte polar de auxinas, el ácido 1-N-naphtylphtalamico (NPA), rescata dicho fenotipo, lo que se ha interpretado como un posible papel de estos genes en la acumulación apical de auxinas en el gineceo o en la percepción de las mismas (Staldal et al., 2008). Los mutantes *nga* presentan defectos similares que podrían deberse a una reducción en los niveles de auxinas en esta zona o a una reducción en la respuesta a la misma. Para estudiar si los defectos apicales de los mutantes *nga* eran consecuencia de una reducción en los niveles de auxinas en la parte apical del gineceo se analizó si en presencia de NPA, que en teoría podría provocar la acumulación de auxinas en la zona apical, se revertían los defectos observados en los mutantes *nga*.

Tratamientos con NPA 100 μ m en inflorescencias de plantas silvestres provocaban alteraciones en el desarrollo del gineceo similares a las descritas por Nemhauser et al., (2000). En este caso, la mayor parte de los gineceos presentaban un fenotipo relativamente débil, en el que los gineceos mostraban estilos alargados, mayor desarrollo del estigma y una reducción del ovario. En inflorescencias del cuádruple mutante *nga*, el mismo tratamiento no causaba modificaciones fenotípicas en el fruto, es decir, no rescataba los defectos del estilo ni alteraba la distribución de los tejidos (fig. 50).

Dado que la inhibición del transporte de auxinas y, por tanto, su posible consiguiente acumulación en el extremo apical del gineceo no parecían afectar al fenotipo de los mutantes *nga*, se podía suponer que los defectos observados en el mismo no se debían a la reducción de la concentración de auxinas en el extremo apical del gineceo. Sin embargo, este resultado no permitía descartar la posibilidad de que los mutantes *nga* fueran menos sensibles a las auxinas acumuladas en la zona apical del gineceo o tuvieran afectada de forma severa la biosíntesis de auxinas en la zona apical del gineceo, y como consecuencia no se pudieran acumular en esta zona, incluso tras el tratamiento de NPA.

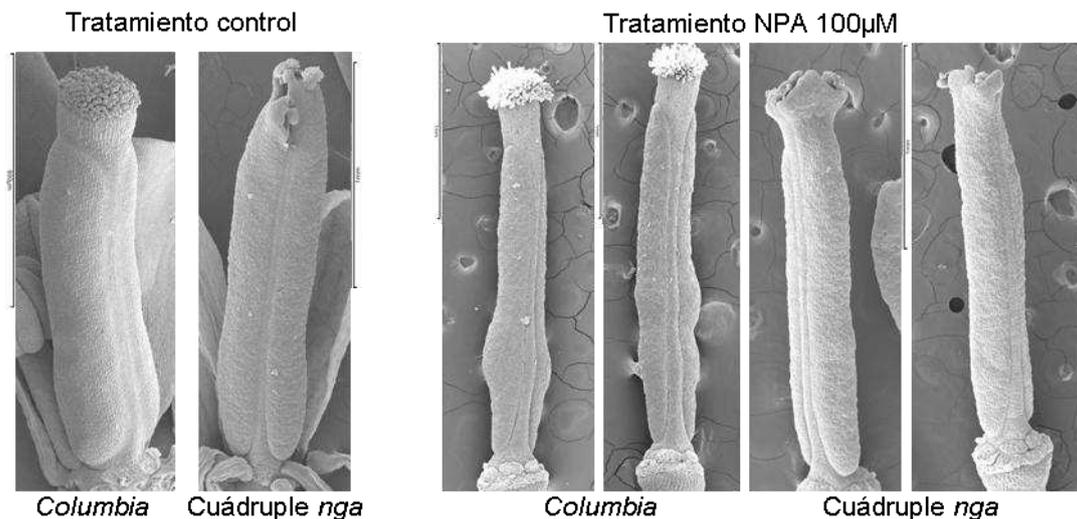


Figura 50. Frutos tratados con NPA. Fenotipo de frutos de *Columbia* y el cuádruple mutante *nga* tras tratamiento control. Fenotipo de frutos tratados con NPA, *Columbia* y cuádruple mutante *nga*.

Con el propósito de intentar esclarecer cual de estas dos hipótesis podía ser correcta se estudió, en plantas silvestres, el efecto de la reducción de los niveles de auxinas en el dominio de expresión de los genes NGA. Para ello se expresó el gen *iaaL* bajo el control del promotor de NGA3 (NGA3_{PRO}::*iaaL*, pMNG46). *IaaL* es un gen bacteriano que codifica una enzima que inactiva la auxina libre al conjugarla con una Lys (Jensen et al., 1998). Se observó que las plantas transgénicas mostraban defectos en la fusión de la zona apical del fruto o bien mostraban un crecimiento desigual de las valvas, de un modo similar al observado en combinaciones de dobles mutantes *nga* (fig. 51). Este dato era consistente con la idea de que NGA podría estar promoviendo la acumulación de auxinas en la parte apical del gineceo y que el fenotipo de los mutantes *nga* fuera consecuencia de niveles de auxinas reducidos en este dominio, aunque no excluía la posibilidad de que los mutantes fueran menos sensibles a las auxinas.

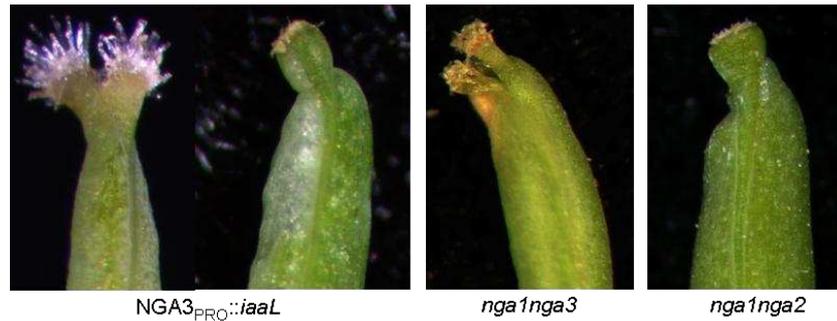


Figura 51. Efecto de la reducción de los niveles de auxinas en el dominio de expresión de *NGA3* en el fruto. Región apical de frutos de plantas *NGA3_{PRO}::iaaL*, dobles mutantes *nga1nga3* y *nga1nga2*.

Un método para averiguar si los mutantes eran menos sensibles a auxinas era llevar a cabo una construcción similar a la del *iaaL* pero con el gen *iaaM*. *iaaM* es un gen bacteriano que codifica una enzima que convierte el triptófano en indolacetamina dando lugar a una sobreproducción de auxinas (Romano et al., 1995). Finalmente no se llegó a obtener dicha construcción ya que fue bastante complicado el clonaje de este gen en el vector de destino. Por tanto, se decidió hacer otro tipo de experimento más rudimentario que consistía en la aplicación directa de auxinas, concretamente ácido indolacético (IAA) mezclado con lanolina, en la zona apical del gineceo en flores de estadios 10 al 12 de plantas *amiR-NGA*.

Cuando se observaron los gineceos previamente tratados con auxinas se apreció, a pesar de la dificultad de la observación por la lanolina, cómo se revertían parcialmente los defectos de fusión en la región apical del gineceo (fig. 52 C-D y E-F), apareciendo el gineceo fusionado, aunque no se llegó a observar la formación de tejidos apicales. Un resultado similar fue obtenido por Staldal et al., (2008), en el que realizaron micro-aplicaciones de ácido 1-naphthylacético (NAA) en el ápice de gineceos de mutantes *styl-1 styl-2 ap1-1*, y observaron cómo los defectos en la fusión del estilo eran restaurados de forma parcial o completa pero, sin embargo, no se recuperaba la diferenciación del estilo y estigma. Este resultado indicaba que los mutantes *nga* si son sensibles a la presencia de auxinas.

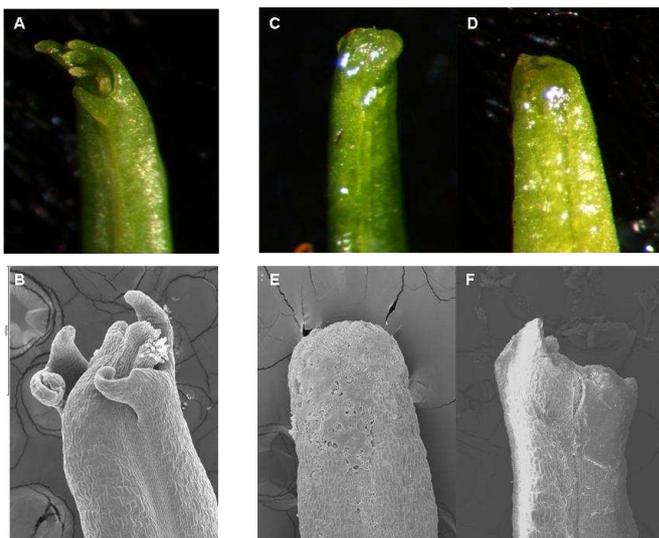


Figura 52. Efecto de la aplicación exógena de auxinas en la región apical del gineceo de líneas *amiR-NGA*. (A-B) Gineceo de plantas sin tratar. Se observan defectos en la fusión del gineceo en su extremo apical. (C-D y E-F) Gineceos tratados con auxinas. Se puede observar como se revierte parcialmente el fenotipo del gineceo, apareciendo éste fusionado, aunque no se restaura la diferenciación de estilo y estigma.

Puesto que los resultados obtenidos eran compatibles con la hipótesis de que en los mutantes *nga* no se sintetizaban auxinas en la zona apical del gineceo, se decidió comprobar si se producía un cambio en el patrón de expresión de genes implicados en la biosíntesis de esta hormona. Concretamente, se estudiaron los genes *YUC4* y *YUC2* pertenecientes a la familia *YUCCA* (*YUC*). Los genes que constituyen esta familia codifican enzimas clave en la ruta de biosíntesis de auxinas y además se expresan en la parte apical del gineceo solapando con el dominio de expresión de los genes *NGA* (Cheng et al., 2006). Además, se ha descrito que mutaciones en los genes *YUC* conllevan toda una serie de alteraciones en la organización apical-basal del gineceo (Cheng et al., 2006).

Para estudiar si las mutaciones *nga* afectaban a la expresión de los genes *YUC*, se cruzó la línea marcadora *YUC4_{PRO}::GUS* (Cheng et al., 2006) con la línea *amiR-NGA*. En las líneas obtenidas podía observarse que la expresión de *YUC4* estaba muy reducida o ausente en los tejidos apicales del gineceo indicando que era probable que fuera necesaria la actividad de *NGA* para la expresión de *YUC4* en el estilo. También *YUC2* se expresa en el estilo silvestre, de modo que se comprobó la expresión de *YUC2_{PRO}::GUS* (Cheng et al., 2006) en líneas *amiR-NGA*. Como ocurría con *YUC4*, la expresión de *YUC2* estaba ausente o muy reducida en el gineceo apical de la línea *amiR-NGA*. Sin embargo, en ambos casos la expresión en el resto de órganos florales era similar a la observada en fondo silvestre (fig. 53).

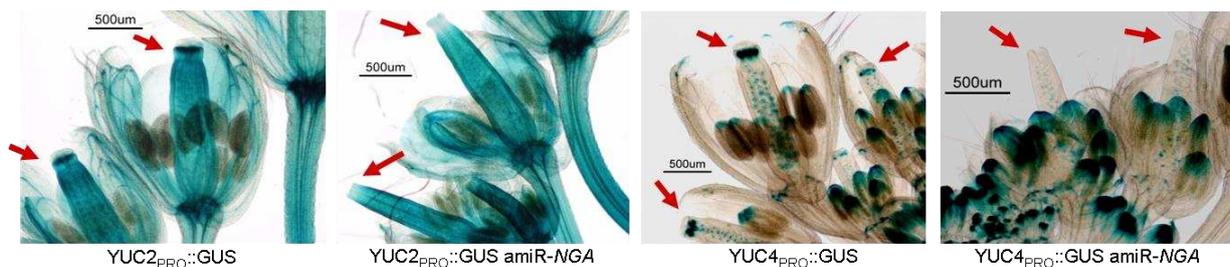


Figura 53. Efecto de la reducción de la actividad de *NGA* en la expresión de *YUC2* y *YUC4* en el estilo. Detección histoquímica de actividad *GUS* dirigida por los promotores de *YUC2* y *YUC4* en inflorescencias silvestres y en inflorescencias de la línea *amiR-NGA*. Las flechas señalan el estilo del gineceo en diferentes estadios de desarrollo.

Así pues, la pérdida de actividad *NGA* daba lugar a la falta de activación de *YUC2* y *YUC4* en la zona apical del gineceo.

Estos resultados parecían indicar un papel de los genes *NGA* en la síntesis de auxinas en la zona apical del gineceo, probablemente a través de la activación de la expresión de los genes *YUC*. Sin embargo, fuera de esta zona, las proteínas *NGA* parecían no ser necesarias para la activación de *YUC2* y *YUC4*, sugiriendo que en estos dominios eran otros los factores que llevarían a cabo la activación de los genes *YUC*.

A partir de los resultados obtenidos se podría concluir que fenotipos asociados a auxinas observados en el cuádruple mutante *nga* y en la línea *amiR-NGA* podrían ser debidos a que la falta de expresión de los genes *nga* afectara a la biosíntesis de auxinas mediada por *YUC*.

2.2. Relación entre brasinoesteroides y auxinas.

Los brasinoesteroides (*BR*), a pesar de haber sido identificadas hace más de tres décadas (Grove et al., 1979), han sido el grupo de fitohormonas más recientemente caracterizado. Esta hormona controla muchas respuestas en la planta, incluyendo la

germinación de las semillas, la elongación de raíz y tallo, la diferenciación vascular, la expansión de la hoja y la dominancia apical. Además, cada una de estas repuestas está también controlada por una segunda hormona, las auxinas, sugiriendo una posible relación de ambas en el control del desarrollo. Aunque hay evidencias de que ambas hormonas pueden actuar independientemente (Zurek et al., 1994; Clouse et al., 1993; Goda et al., 2002; Mussing et al., 2002; Goda et al., 2004), otros estudios han demostrado una relación directa entre BR y auxinas, indicando que algunas rutas están bajo un control dual. Por ejemplo, actúan conjuntamente en el control de la elongación del hipocotilo en diferentes especies (Mandava, 1988). Nemhauser et al. (2004) han proporcionado evidencias de que las rutas de señalización de BR y auxinas convergen a nivel de la regulación transcripcional de genes diana comunes. Mouchel et al. (2006) demuestran que la biosíntesis de BR y la señalización por auxinas están conectadas a través de una ruta de retroalimentación, la cual implica al gen BREVIS RADIX (BRX), cuyo promotor contiene sitios de unión de factores de transcripción controlados por auxinas y BR.

El gen BRX codifica un supuesto regulador transcripcional. Pertenece a la familia BRX compuesta por 5 miembros. BRX fue identificado como un regulador del crecimiento de la raíz (Mouchel et al., 2004). Las proteínas BRX no tienen dominios de localización nuclear ni de unión a DNA, lo que ha sugerido que pudieran actuar como cofactores transcripcionales (Briggs et al., 2006). Se trata de proteínas asociadas a la membrana plasmática (Scacchi et al., 2009). En el mutante *brx* el único fenotipo observado es un acortamiento de la raíz (Briggs et al., 2006). Se ha propuesto que BRX media la retroalimentación entre los niveles de brasinoesteroides y la señal de auxinas necesaria para el correcto crecimiento de la raíz (Mouchel et al., 2006). La expresión de BRX se induce por auxinas y se reprime parcialmente por brasinólido, lo que ha llevado a proponer que BRX actúa como nexo de unión entre la síntesis de brasinoesteroides y la señal de auxinas manteniendo los niveles necesarios de brasinoesteroides para permitir la acción adecuada de las auxinas (Mouchel et al., 2006). Las auxinas a su vez regulan negativamente el nivel de expresión de BRX (Scacchi et al., 2009)

Un experimento de doble híbrido de levadura en el que se descubrió que una proteína de la familia BRX, BRX-LIKE4, interaccionaba con NGA1 (Trigueros, 2008), parecía confirmar el papel de BRX como regulador transcripcional. Debido al alto nivel de conservación de los genes de la familia BRX (Briggs et al., 2006) no era de extrañar que NGA1 pudiera también interaccionar con BRX. Para comprobar esta interacción en planta, se empleó un ensayo de complementación fluorescente bimolecular, realizado en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas transitoriamente. Este experimento está basado en la reconstitución de moléculas no fluorescentes mediada por la interacción de dos proteínas que llevan fusionada una mitad de la proteína YFP. Si las dos proteínas interaccionan físicamente la proximidad de los dos fragmentos de la YFP restaurará la fluorescencia de la molécula, que puede detectarse mediante microscopía confocal. Para el ensayo se utilizó tanto la región codificante completa del gen BRX como la mitad N-terminal y C-terminal del mismo. Con las dos primeras construcciones se pudo comprobar que NGA1 y BRX interaccionaban, concretamente en el núcleo, mientras que si sólo se trabajaba con la mitad C-terminal de la misma no se observaba señal, es decir, la región importante para que la interacción entre NGA1 y BRX tuviera lugar se localizaba en la mitad N-terminal de la proteína BRX (fig. 54). Por tanto, puede que BRX actúe como regulador transcripcional junto con NGA1.

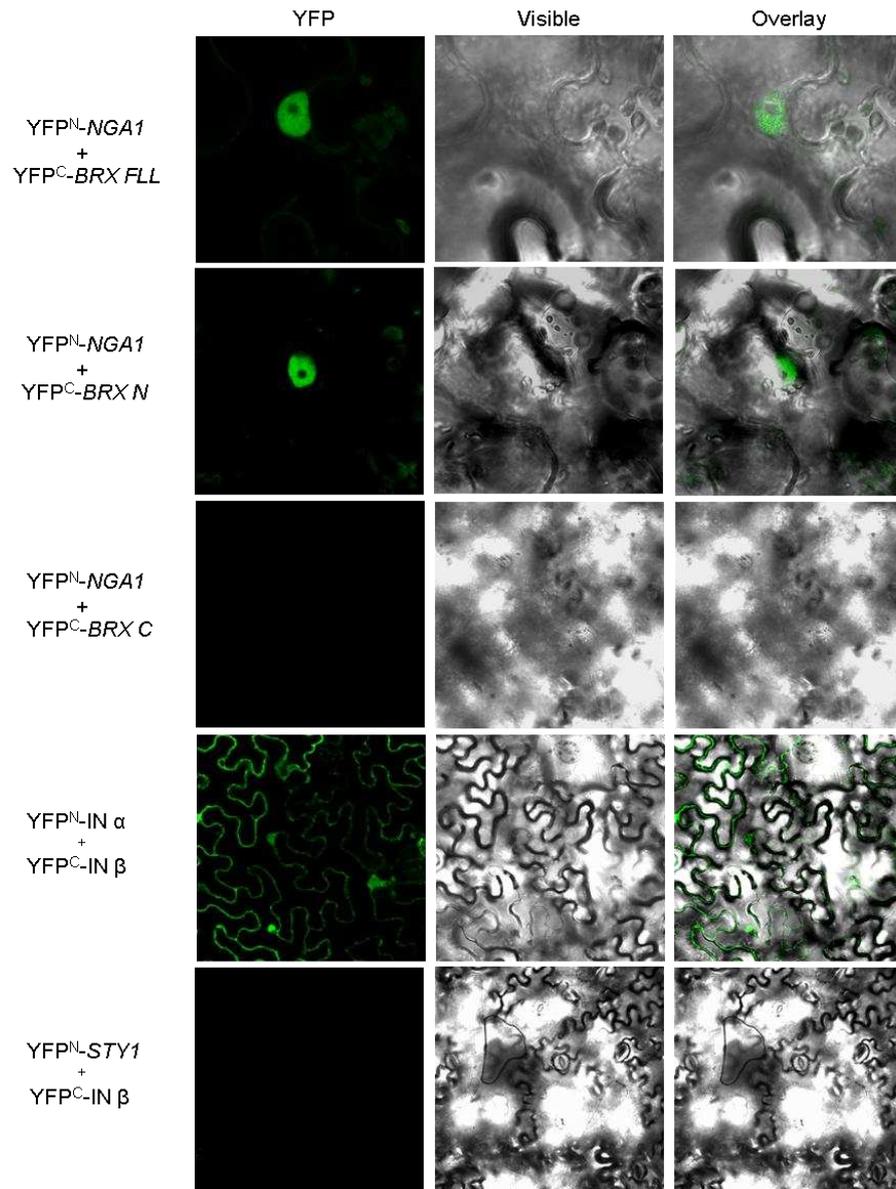


Figura 54. Estudio de interacción proteína-proteína entre BRX y NGA1. Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo, se han utilizado los plásmidos YFP^N-INα e YFP^C-INβ, los cuales poseen cada uno una mitad de la proteína ubiquitina. Control negativo (YFP^N-STY1 + YFP^C-INβ).

Capítulo 3. El papel de los genes *NGA* en la morfogénesis a lo largo del eje apical-basal del gineceo.

3.1. Interacción de *STY* y *NGA* en el desarrollo del estilo.

El gen *STY1* (Kuusk et al., 2002) codifica un factor de transcripción del tipo “RING-zinc finger”, incluido dentro de la familia *SHI/STY*, compuesta por 10 miembros. Los genes de esta familia son importantes para el control del desarrollo del estilo y del estigma (Kuusk et al., 2002; 2006). De entre los mutantes sencillos de los genes de la familia *SHI/STY* únicamente el mutante *sty1-1* muestra defectos sutiles en el desarrollo de los tejidos apicales, observándose una ligera depresión en el estilo, normalmente en el plano medial (Kuusk et al., 2002). Un incremento gradual del número de mutantes en genes de la familia *SHI/STY* se correlaciona con una disminución progresiva en la formación del tejido estigmático y estilar y en el tamaño del gineceo (Kuusk et al., 2006), algo que recuerda a lo que ocurre con las mutaciones en los genes *NGA*.

En los triples y cuádruples mutantes *shi/sty* los frutos tienen la parte apical sin fusionar, perdiendo la estructura característica del estilo y terminando en estructuras similares a horquillas, en cuyos extremos aparecen células del estilo. Ocasionalmente, se desarrollan papilas estigmáticas asociadas a estas células del estilo, más frecuentemente en posición medial (Kuusk et al., 2006). El fenotipo de estas líneas es muy similar al observado en el cuádruple mutante *nga*.

El patrón de expresión de los genes *STY* también es muy similar al de los genes *NGA*. *STY1* se expresa en muchos tejidos a lo largo del desarrollo de la planta. En plántulas la señal se observa en el hipocotilo, cotiledones y en primordios de hojas y raíz. En hojas en desarrollo se expresa en la parte apical del margen de la hoja y en hidatodos. En el gineceo la señal se detecta en estilo y estigma desde el estadio 6 del desarrollo floral hasta anthesis; y también se expresa en óvulos jóvenes (Kuusk et al., 2002). El patrón de expresión de *STY1* es representativo de la familia *SHI* aunque también se ha analizado el de otros genes, como es el caso de *STY2*, cuyo patrón de expresión es muy similar al de *STY1* (Kuusk et al., 2002); de *SRS5*, que se expresa en la zona apical del gineceo y en hojas de roseta jóvenes e hidatodos (Kuusk et al., 2006); y de *SHI*, que sólo se expresa en el gineceo, concretamente en el estilo y el estigma (Kuusk et al., 2006).

En un trabajo previo del laboratorio se analizó el fenotipo de combinaciones de mutantes *shi/sty* y *nga*. En concreto, el doble mutante *nga3 sty1-1* mostraba un fenotipo mucho más severo al de los mutantes sencillos (Trigueros et al., 2009), sugiriendo que *NGA3* y *STY1* podrían actuar de un modo sinérgico en la formación del estilo. Sin embargo, este estudio era parcial, puesto que el análisis realizado no incluía todos los genes *NGA* ni todos los genes *SHI/STY*. Para comprobar si la interacción de *STY1/2* con *NGA1/2* era igual a la de ambos genes con *NGA3/4* se cruzaron los mutantes *nga1-4* y *sty1-1 sty2-1*. La combinación de las mutaciones *nga1-4* y *sty1-1* dio lugar a la formación de un gineceo con la zona apical sin fusionar, pérdida de parte del estilo y estigma y formación de protuberancias con forma de horquillas (fig. 55 E-J). En el triple mutante *nga1-4 sty1-1 sty2-1* la zona apical estaba seriamente afectada y los frutos perdían la mayor parte del tejido estilar y de las papilas estigmáticas (fig. 55 K-O).

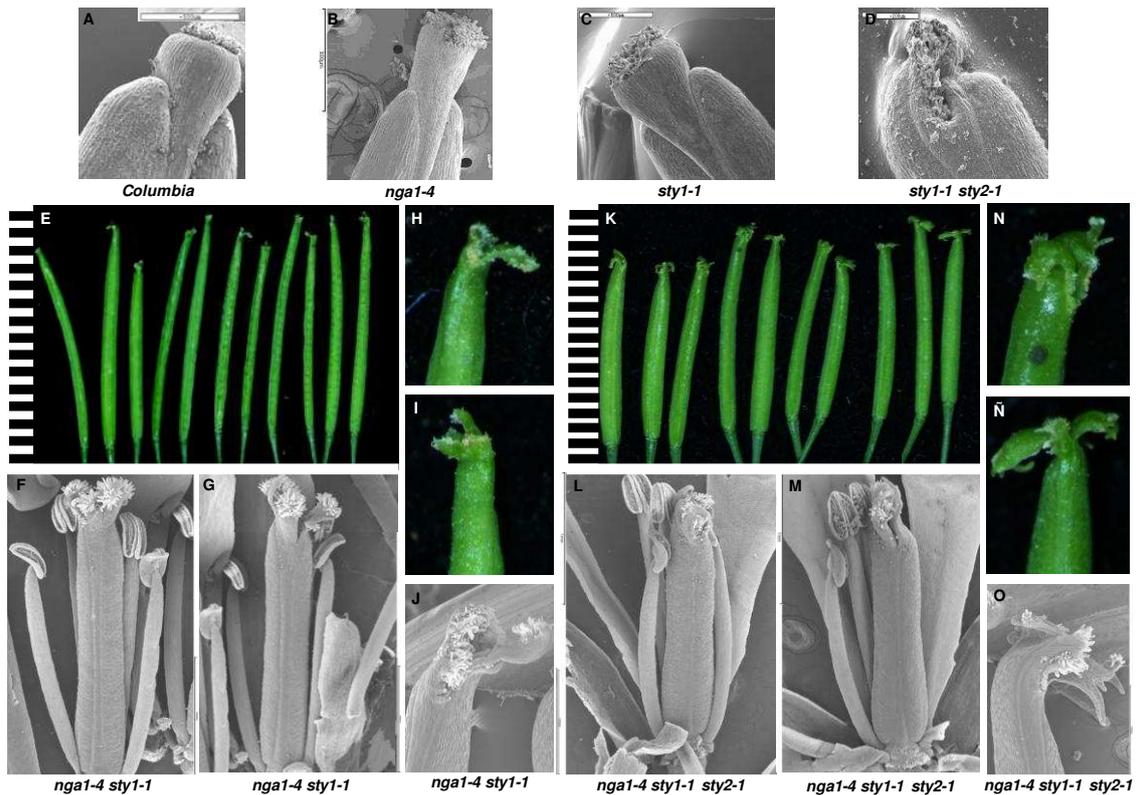
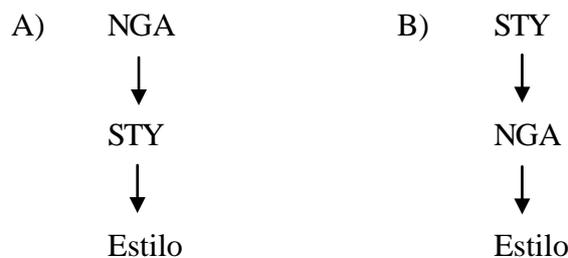


Figura 55. Caracterización fenotípica de los mutantes *nga1-4 sty1-1* y *nga1-4 sty1-1 sty2-1*. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de la zona apical de (A) *Columbia*, (B) *nga1-4*, (C) *sty1-1* y (D) *sty1-1 sty2-1*. Fotografía en la lupa de los 10 primeros frutos (Las unidades de la regla son mm.) y detalle de la zona apical de (E, H y I) *nga1-4 sty1-1* y (K, N y Ñ) *nga1-4 sty1-1 sty2-1*. Los únicos defectos observados en estas líneas se aprecian en la región apical del gineceo. Fotografías del microscopio electrónico de barrido. (F-G) Gineceos en anthesis del doble mutante *nga1-4 sty1-1*. (H-J) Detalle de la zona apical del fruto del mutante *nga1-4 sty1-1*. Estos gineceos presentan una reducción del tejido estigmático, defectos en la fusión del estilo y formación de protuberancias con forma de horquillas. (L-M) Gineceos en anthesis del triple mutante *nga1-4 sty1-1 sty2-1*. (N-O) Detalle de la zona apical del fruto del mutante *nga1-4 sty1-1 sty2-1*. Se observa una reducción importante del tejido estilar y estigmático con defectos severos en la fusión del estilo.

El fenotipo que se observó en los mutantes *nga1-4 sty1-1* y *nga1-4 sty1-1 sty2-1* era mucho más severo al que presentaban las líneas parentales y similar al de combinaciones de mutantes de *nga3* o *nga4* con *sty1-1* y *sty2-1*, de lo que se podía deducir la existencia de una relación sinérgica entre estos genes, al igual que lo observado para *NGA3* y *STY1*. Así pues, era posible hipotetizar que *STY* y *NGA* actuaran conjuntamente para dirigir la correcta formación del estilo. Las primeras hipótesis que se barajaron fueron la posible regulación de la expresión de *STY* por *NGA* o viceversa, y que ello diera lugar a la formación del tejido estilar.



Resultados anteriores obtenidos en el laboratorio indicaban que probablemente ninguna de estas hipótesis fuera correcta, ya que el patrón de expresión de *STY1_{PRO}::GUS* no cambiaba en fondo mutante *nga3 nga4* y tampoco lo hacía el patrón

de expresión de $NGA3_{PRO}::GUS$ en fondo mutante *sty1-1 sty2-1* (Trigueros et al., 2009). Este estudio, sin embargo, era sólo parcial y no permitía descartar otras hipótesis, como que *STY1* regulara a otros genes *NGA* o viceversa. Por ello, se realizaron toda una serie de experimentos adicionales; concretamente se llevó a cabo el análisis del patrón de expresión de *STY1* en fondo $35S::NGA3$ y *amiR-NGA* y la sobreexpresión de *STY1* o *NGA3* en fondo *amiR-NGA* o *sty1 sty2*, respectivamente.

Para comprobar si *NGA* regulaba la expresión de *STY1* se estudió si cambiaban los patrones de expresión de la línea $STY1_{PRO}::GUS$ en fondo $35S::NGA3$ y *amiR-NGA* (fig. 56). En fondo *amiR-NGA* el patrón de expresión de *STY1* no cambiaba significativamente, seguía expresándose en óvulos y en la zona apical del gineceo. En el fondo $35S::NGA3$ la señal en el gineceo se detectaba en el estigma y en los óvulos, al igual que ocurría en fondo silvestre. Por tanto, la expresión de *STY1* se mantenía como en el ecotipo silvestre con independencia del nivel de expresión de los genes *NGA*.

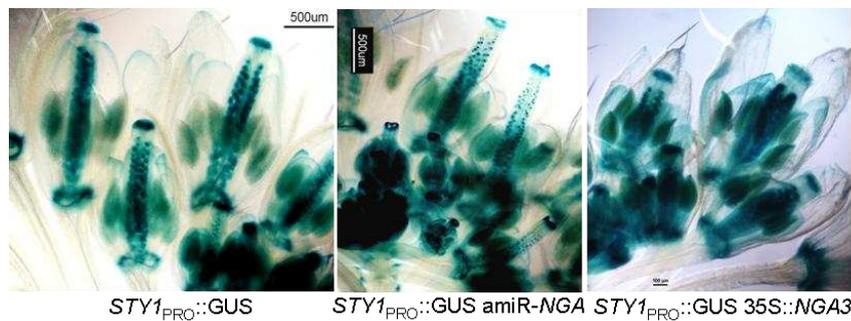


Figura 56. Patrón de expresión de *STY1* en fondo *amiR-NGA* y $35S::NGA3$. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *STY1* en inflorescencias silvestre, *amiR-NGA* y $35S::NGA3$.

Los experimentos descritos parecían descartar que los genes *NGA* regulasen la expresión de los genes *SHI/STY* (al menos de *STY1*) y, asimismo, a partir de los resultados previos de los análisis de expresión de genes *NGA* en fondo mutante *sty*, los genes *SHI/STY* no parecían regular a los genes *NGA*. Por tanto, los resultados obtenidos sugerían que ambos genes, *NGA* y *STY*, podían estar actuando al mismo nivel. Si esto fuera así podríamos esperar que la sobreexpresión de *NGA* no rescatara los fenotipos de los mutantes *sty* y viceversa. Para comprobar esta hipótesis se generó la línea $35S::NGA3$ *sty1-1sty2-1*. Las hojas de roseta de la línea $35S::NGA3$ (fig. 57) eran estrechas y alargadas y de margen muy liso, mientras que las del doble mutante *sty1-1 sty2-1* (fig. 57) eran más aserradas que las del ecotipo silvestre. Cuando se observaron las hojas de la roseta de la línea de sobreexpresión $35S::NGA3$ en fondo *sty1-1 sty2-1* (fig. 57) éstas eran más alargadas y aserradas que las de plantas silvestre, es decir, la sobreexpresión de *NGA3* no era capaz de suprimir el fenotipo del margen de hoja causado por las mutaciones *sty1-1* y *sty2-1*.

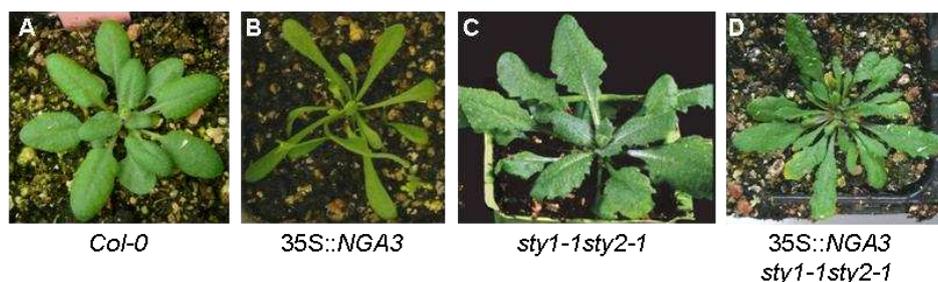


Figura 57. Morfología de la roseta de la línea $35S::NGA3$ en fondo *sty1-1 sty2-1*. (A) Morfología de la roseta de *Columbia*. (B) $35S::NGA3$, sus hojas son alargadas y de borde liso. (C) *sty1-1 sty2-1* (Kuusk et al., 2002), sus hoja son aserradas. (D) $35S::NGA3$ *sty1-1 sty2-1*, sus hojas son alargadas y con borde aserrado.

En la línea de sobreexpresión 35S::NGA3 los frutos presentaban un acortamiento de las valvas, ginóforo más largo y replum más ancho y en zig-zag, mientras que el mutante *sty1-1 sty2-1* se caracterizaba por una reducción importante del tejido estigmático y estilar. En la línea de sobreexpresión 35S::NGA3 en fondo *sty1-1 sty2-1* el fruto presentaba un fenotipo aditivo, es decir, la morfología del fruto típica de la línea 35S::NGA3 (ginóforo largo, reducción del ovario y replum en zig-zag) no se rectificaba por las mutaciones en *sty1* y *sty2*, y la sobreexpresión de NGA3 no rescataba los defectos en el estilo causados por las mutaciones *sty1-1* y *sty2-1* (fig.58), indicando que NGA3 no era capaz de dirigir la formación del estilo en ausencia de la actividad de STY.

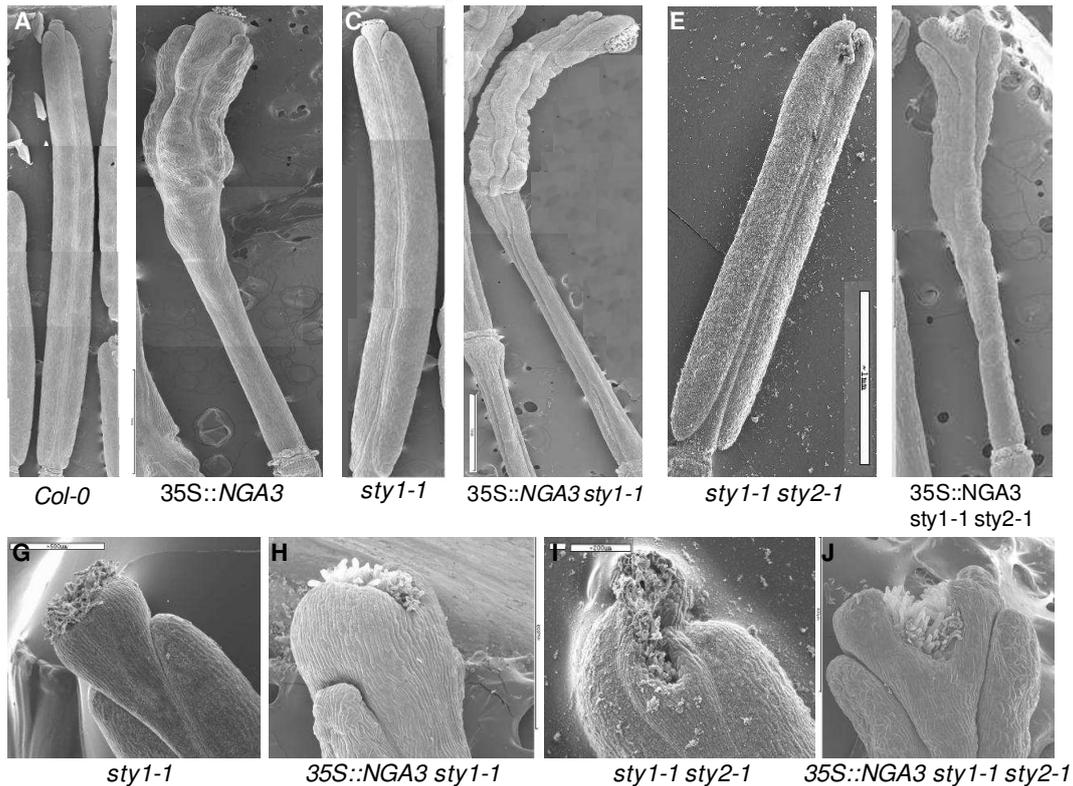


Figura 58. Fenotipo de la línea de sobreexpresión 35S::NGA3 en fondo *sty1-1 sty2-1*. Fotografía de microscopía electrónica de barrido del gineceo de (A) *Columbia*, (B) 35S::NGA3, (C) *sty1-1*, (D) 35S::NGA3 *sty1-1*, presenta defectos sutiles en la formación del estilo similares a los del mutante sencillo y la morfología típica del fruto de la línea 35S::NGA3, (E) *sty1-1 sty2-1* y (F) 35S::NGA3 *sty1-1 sty2-1*, ocurre lo mismo que con la línea 35S::NGA3 *sty1-1*. Detalle de los defectos observados en la zona apical de frutos (G) *sty1-1*, (H) 35S::NGA3 *sty1-1*, (I) *sty1-1 sty2-1* y (J) 35S::NGA3 *sty1-1 sty2-1*.

Para comprobar si también STY1 requería la presencia de NGA para especificar el estilo se realizó el cruce de 35S::STY1 con la línea amiR-NGA. Como ya se ha descrito con anterioridad, en la línea amiR-NGA (fig. 59 A-C) el gineceo se caracterizaba por no desarrollar ni estilo ni estigma o por aparecer grupos de papilas estigmáticas aisladas. Por otra parte, la línea de sobreexpresión de STY1 (fig. 59 D-G) presentaba frutos de forma irregular con parches de células estilares a lo largo de las valvas. La línea de sobreexpresión de STY1 en fondo amiR-NGA (fig. 59 H) no presentaba cambios de identidad a nivel celular, es decir, no aparecían parches de células del estilo en la valva (fig. 59 J-L) y, al igual que ocurre en la línea amiR-NGA, la zona apical no se formaba correctamente, apareciendo el fruto abierto y grupos aislados

de papilas estigmáticas (fig. 59 H-I). Por tanto, parecía que *STY1* requería de la presencia de los genes *NGA* para dirigir la formación del estilo.

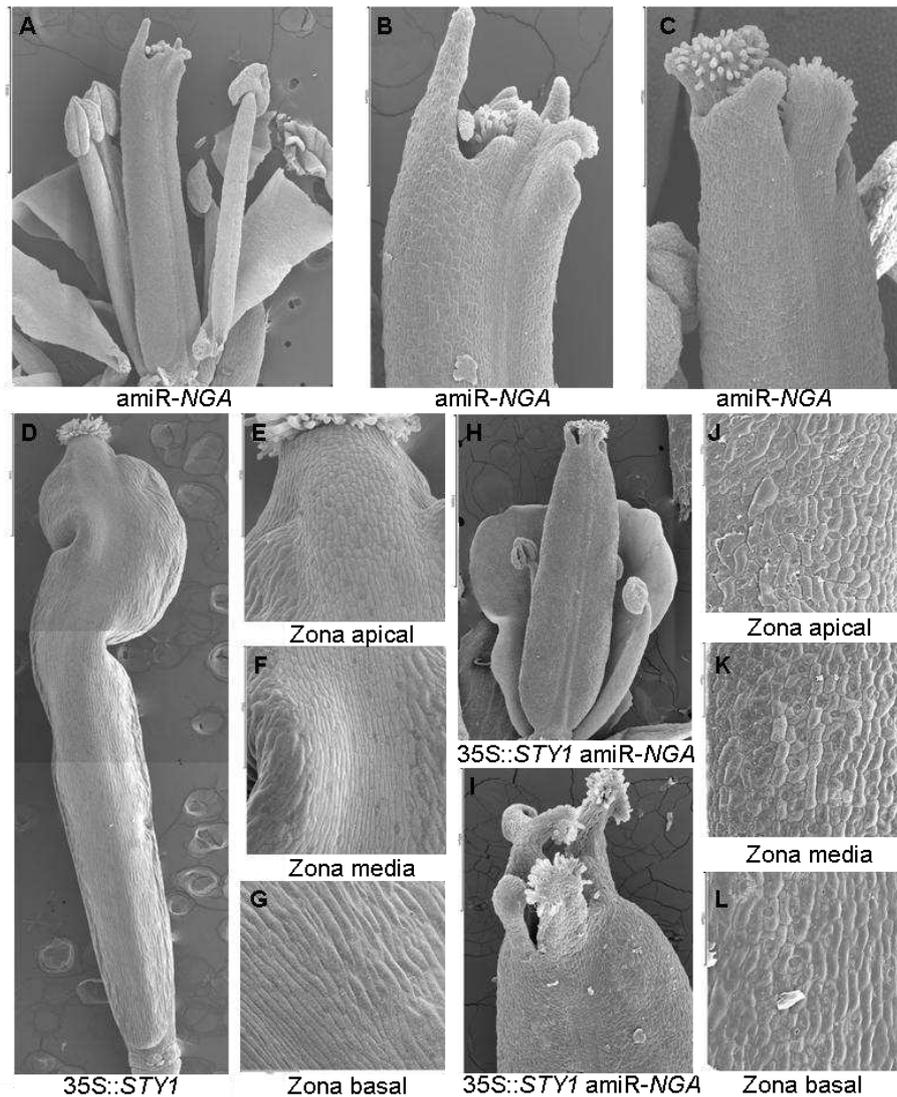


Figura 59. Fenotipo de la línea de sobreexpresión *35S::STY1* en fondo *amiR-NGA*. Fotografía de microscopía electrónica de barrido del gineceo de (A-C) la línea *amiR-NGA*, (B-C) detalle de la zona apical del gineceo, donde se observan defectos en la fusión de la misma. (D-G) *35S::STY1*, (E-G) detalle del tipo de células que se observan en la zona (E) apical, (F) media y (G) basal de la valva. (H-L) *35S::STY1 amiR-NGA*; (I) detalle de la zona apical del gineceo, (J-L) detalle del tipo de células que se observan en la zona (J) apical, (K) media y (L) basal de la valva.

Estos resultados parecían indicar que la naturaleza de la interacción de *NGA* y *STY* no se daba a nivel de regulación de la expresión, sino que probablemente las dos proteínas podrían requerirse conjuntamente para especificar el estilo y el estigma.

Si esta hipótesis fuera correcta, cabría esperar que la sobreexpresión simultánea de ambos genes diera lugar a fenotipos fuertemente sinérgicos. Para comprobarlo, se generaron líneas transgénicas que sobreexpresaban de forma constitutiva *NGA3* y *STY1*. Estas líneas mostraron un fenotipo totalmente diferente al de cada línea de sobreexpresión por separado. Eran plantas con tamaño muy reducido donde el tamaño de las hojas, la longitud de los entrenudos y el tamaño de las flores estaban fuertemente disminuidos (fig. 60).

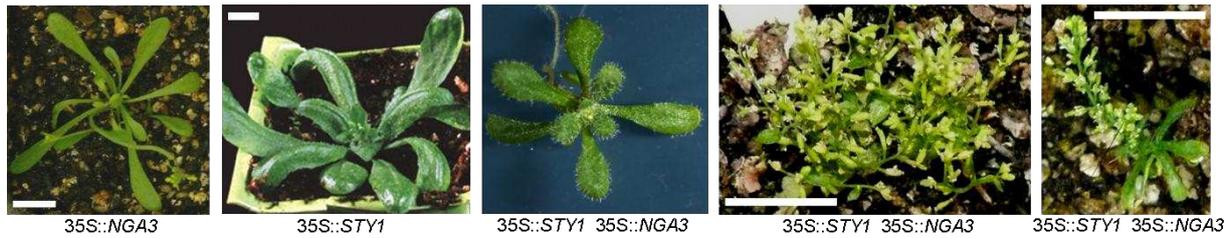


Figura 60. Caracterización fenotípica de la línea 35S::STY1 35S::NGA3. De izquierda a derecha se muestran las fotografías de la roseta de las líneas 35S::NGA3, 35S::STY1 y 35S::STY1 35S::NGA3, y fotografía de dos plantas 35S::STY1 35S::NGA3 cuyo tamaño se ve severamente reducido (la barra blanca equivale a 1cm).

La morfología del gineceo (fig. 61 H) era muy diferente a la de las líneas parentales (fig. 61 C-D). Las proporciones relativas de ginóforo, ovario y tejidos apicales eran similares a las de plantas silvestres, aunque el tamaño del gineceo estaba notablemente reducido. Se podían distinguir claramente la valva, margen de la valva y replum (fig. 61 H). El fenotipo más destacable observado fue que las células de la valva (fig 61 I-K) mostraban la morfología característica de las células del estilo (fig. 61 B), es decir, presentaban morfología regular, desarrollo de estomas temprano y relieve típico. Este fenotipo apoyaba la hipótesis de que las proteínas STY1 y NGA actuaran conjuntamente para dirigir la especificación de identidad del estilo.

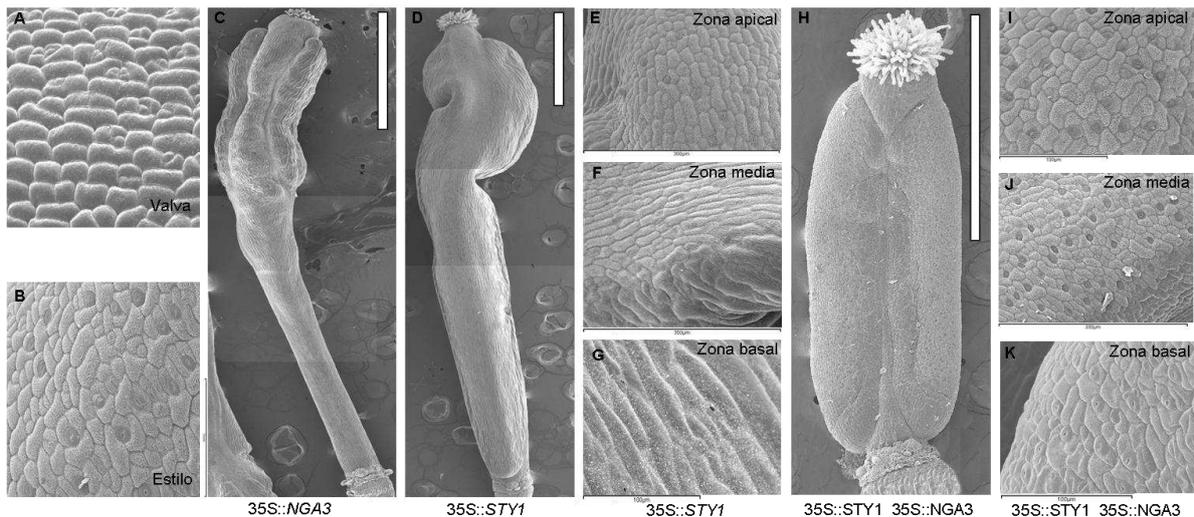


Figura 61. Caracterización fenotípica del fruto de la línea 35S::STY1 35S::NGA3. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de células (A) de la valva y (B) del estilo de plantas silvestres. (C) Fruto 35S::NGA3. (D) Fruto 35S::STY1. (E-G) Detalle del tipo celular presente en diferentes zonas del fruto. (H) Fruto 35S::STY1 35S::NGA3. (I-K) Detalle del tipo celular presente en diferentes zonas del fruto, se pueden observar células del estilo a lo largo de toda la longitud de la valva. La barra blanca equivale a 1mm.

En resumen, los resultados obtenidos hasta este momento indicaban que:

- La sobreexpresión de STY o NGA no era capaz de compensar la pérdida de función de los genes NGA o STY, respectivamente.

- El patrón de expresión de STY1_{PRO}::GUS no cambiaba en fondo mutante nga ni en 35S::NGA3, y tampoco lo hacía el de NGA3_{PRO}::GUS en fondo mutante styl styl2.

- El fenotipo de los mutantes nga1 styl y nga1 styl styl2 era significativamente más severo que el de los mutantes sencillos por separado.

- La sobreexpresión conjunta de STY1 y NGA3 daba lugar a la formación de estilo en toda la superficie de la valva.

Todo ello parecía indicar que era necesaria la presencia simultánea de ambos factores para la correcta formación de estilo y estigma. Una posible explicación para ello podría ser que ambas proteínas interaccionaran para regular la transcripción de dianas comunes. Para comprobarlo se realizó un ensayo de interacción proteína-proteína in vivo mediante complementación fluorescente bimolecular (BiFC). Este experimento está basado en la reconstitución de moléculas no fluorescentes mediada por la interacción de dos proteínas que llevan fusionada una mitad de la proteína YFP. Si las dos proteínas interaccionan físicamente la proximidad de los dos fragmentos de la YFP restaurará la fluorescencia de la molécula, que puede detectarse mediante microscopía confocal.

Se clonó la región codificante de *STY1* y *NGA1* en la región C-terminal de cada mitad de la proteína YFP (pMNG74 y pMNG32, respectivamente). Con ambas construcciones se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* y tras 3 días fueron observadas al microscopio confocal. Durante la visualización de las hojas no se detectó señal YFP (fig. 62), lo cual indicaba que ambas proteínas no interaccionaban, al menos en estas condiciones.

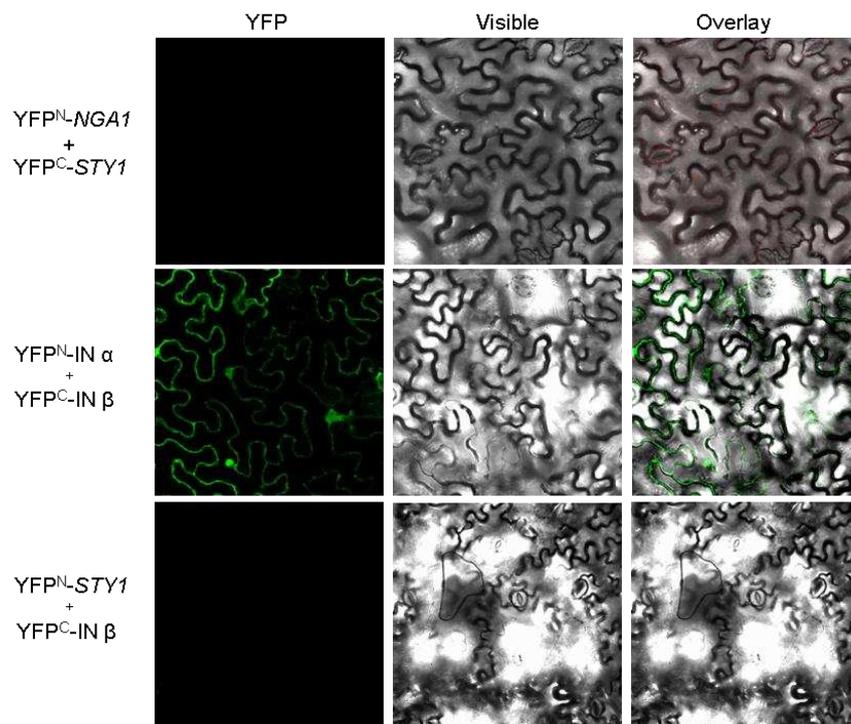


Figura 62. Estudio de interacción proteína-proteína entre *STY1* y *NGA1*. Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo (YFP^N-IN α + YFP^C-IN β). Control negativo (YFP^N-*STY1* + YFP^C-IN β).

La falta de interacción observada podía deberse a que o bien *STY1* y *NGA1* no interaccionaban, o bien que necesitaban de factores adicionales para hacerlo. Esta segunda hipótesis era compatible con el fenotipo observado en la línea 35S::*STY1* 35S::*NGA3*, en la cual tenía lugar la formación ectópica de estilo únicamente en la epidermis de la valva, sugiriendo que factores específicos presentes en este dominio podían contribuir a la interacción entre *STY* y *NGA*.

Posibles candidatos que aparecen en la literatura descritos por su expresión en la valva eran ANT, LUG, SEU, ETT, JAG, TOUSLED (TSL), SPT y CRC (Liu et al., 2000; Chen et al., 2000; Franks et al., 2002; Sessions y Zambryski, 1995; Sessions et al.,

1997; Nemhauser et al., 2000; Dinneny et al., 2004, 2006; Heisler et al., 2001; Bowman y Smyth, 1999). Todos estos factores transcripcionales son necesarios para la fusión del carpelo y el correcto desarrollo del estilo y del estigma. De entre todos ellos, CRC parecía el candidato más probable por las siguientes razones:

- Su dominio de expresión en el carpelo solapaba parcialmente con el dominio de expresión de NGA y STY en la zona apical del gineceo hasta aproximadamente el estadio 10 del desarrollo floral y, lo más importante, se expresaba en la epidermis abaxial del carpelo (Bowman y Smyth, 1999).

- En un experimento de doble híbrido de levadura realizado por Marina Trigueros (Trigueros, 2008) se comprobó que tanto NGA1 como NGA3 interactuaban con un miembro de la familia YABBY, concretamente con YAB3. Esta familia está compuesta por 6 factores de transcripción, que se caracterizan por poseer un dominio dedo de zinc y una doble hélice (Bowman y Smyth, 1999) y CRC es un miembro de esta familia.

- El mutante *crc-1* mostraba defectos en la fusión del estilo similares a los observados en los mutantes *nga* y *sty*. Además en el doble mutante *styl-1 crc-1* (Kuusk et al., 2002) se producía una reducción importante de estilo y estigma mientras que los mutantes sencillos tenían fenotipos débiles. Los dobles mutantes eran prácticamente estériles. De este fenotipo se deducía una posible interacción genética entre STY y CRC.

Para analizar si CRC podía interactuar, formando dímeros, con STY o con NGA se realizaron una serie de ensayos de interacción proteína-proteína mediante BiFC. Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* y tras ser observadas al microscopio confocal se comprobó que tanto STY1 como NGA1 interactuaban con CRC. En ambos casos lo hacían tanto en el núcleo como en el citoplasma (fig. 63).

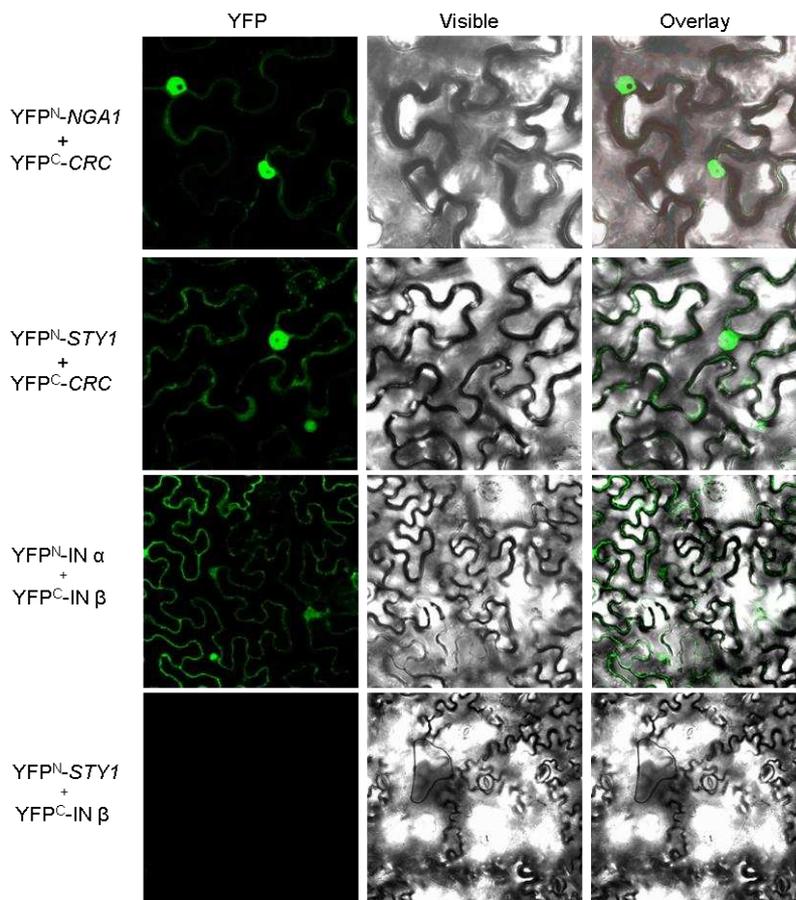


Figura 63. Estudio de interacción proteína-proteína entre STY1 y CRC y entre NGA1 y CRC. Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo (YFP^N-IN α + YFP^C-IN β). Control negativo (YFP^N-STY1 + YFP^C-IN β).

A continuación, y sabiendo que *STY1* y *NGA1* no interactuaban entre sí, se llevó a cabo un nuevo ensayo de BiFC. En este caso se utilizaron de nuevo las construcciones YFC:*STY1* (pMNG74) e YFN:*NGA1* (pMNG32), que anteriormente habían dado resultados negativos, pero se añadió al medio de infiltración una tercera construcción, un 35S::*CRC* (pMNG62) no fusionado a YFP. Como se puede observar en la figura 64, en presencia de *CRC* se reconstituía la fluorescencia de la YFP. Este resultado parecía indicar que *CRC* podría ser el factor necesario para que tuviera lugar la interacción entre *STY* y *NGA*, y así, que el posible trímero *STY-CRC-NGA* fuera el responsable de conferir la identidad de estilo.

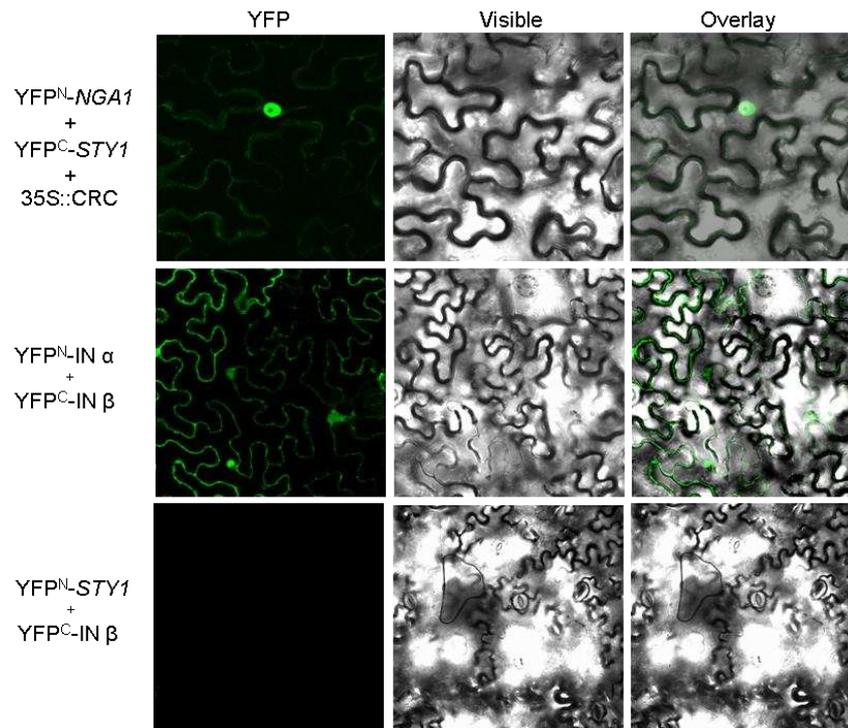


Figura 64. Estudio de interacción proteína-proteína entre *STY1* y *NGA1*. Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo (YFP^N-IN α + YFP^C-IN β). Control negativo (YFP^N-*STY1* + YFP^C-IN β).

Para validar genéticamente esta hipótesis se realizaron distintas combinaciones genéticas.

En primer lugar, para comprobar si *CRC* participaba junto con *NGA* en la especificación del estilo y estigma se generaron el doble mutante *nga1-4 crc-1* y la línea *amiR-NGA crc-1*. El mutante *nga1-4 crc-1* (fig. 65 D-E) mostraba una importante reducción del estilo y del número de papilas estigmáticas y en ocasiones se formaban estructuras a modo de horquillas en la zona apical del gineceo. Este aumento drástico en los defectos del carpelo también ocurre en el mutante *amiR-NGA crc-1* (fig. 65 F-H) en el que el gineceo no poseía ni estilo ni estigma y los carpelos aparecían sin fusionar prácticamente desde la mitad del gineceo pudiendo observarse los óvulos presentes en el interior del mismo. Comparando el débil fenotipo de los mutantes sencillos *nga1-4* (fig. 65 B) y *crc-1* (fig. 65 A) con el observado en estas líneas era posible pensar que existiera una interacción sinérgica entre *NGA1* y *CRC*, ya que un simple efecto aditivo de las mutaciones probablemente no causaría una disminución tan importante en los tejidos apicales en el doble mutante *nga1-4 crc-1* o defectos tan severos en la fusión del carpelo como ocurre cuando tenemos el mutante *crc-1* en fondo *amiR-NGA*. La

interacción de CRC con NGA era similar a la de CRC con STY (Kuusk et al., 2002), y también recordaba al tipo de interacción entre STY y NGA.

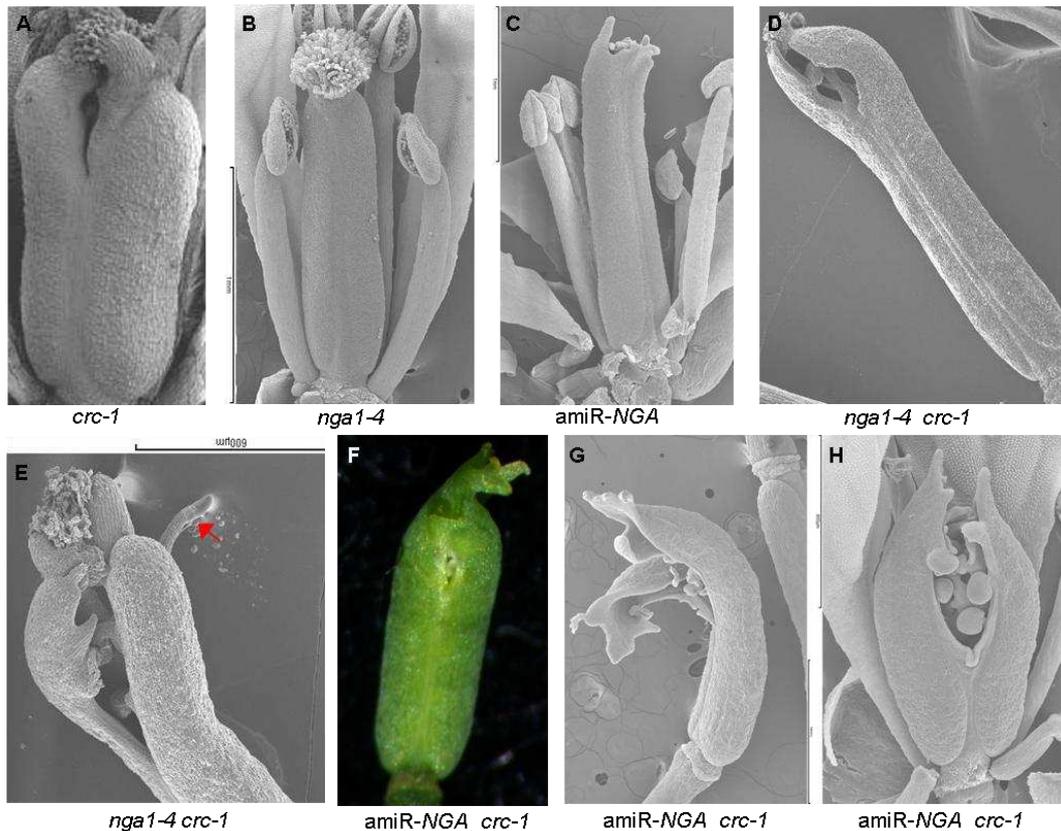


Figura 65. Fenotipos del doble mutante *nga1-4 crc-1* y de la línea *amiR-NGA crc-1*. (A) *crc-1*. (B) *nga1-4*. (C) *amiR-NGA*. (D-E) *nga1-4 crc-1*. Se puede observar una reducción importante de la región del estilo y estigma, y formación de estructuras similares a horquillas (flecha). (F-H) *amiR-NGA crc-1*. Los carpelos aparecen sin fusionar en la mitad apical del carpelo observándose los óvulos.

A continuación se cruzaron las líneas 35S::*STY1* y 35S::*NGA3* con el mutante *crc-1*. En el caso del cruce con 35S::*NGA3* los frutos presentaban, al igual que ocurre con la línea de sobreexpresión, un acortamiento de las valvas, ginóforo más largo y replum en zig-zag (fig. 66 A). Sin embargo, en la zona apical del gineceo, aunque el estilo aparecía en la mayoría de los casos fusionado, tanto estilo como estigma no se formaban correctamente (fig. 66 B-D), por tanto, la mutación *crc* no revierte los cambios en la morfología del gineceo asociados a la sobreexpresión de *NGA3*, y a su vez, la sobreexpresión de *NGA3* no es capaz de rescatar completamente los defectos apicales causados por la mutación *crc* (fig. 66). En fondo 35S::*STY1* (fig. 66 E-F), los frutos presentaban defectos en la fusión de la zona apical del gineceo, al igual que ocurría en el mutante *crc*; por otro lado, los defectos principales asociados a la sobreexpresión de *STY1*, es decir, la formación de células del estilo en las valvas, se reducía, aunque no completamente, por la mutación *crc* (fig. 66 G). En resumen, en ausencia de la expresión de *CRC* los defectos causados en el gineceo como consecuencia de la sobreexpresión de *STY1* se revierten parcialmente.

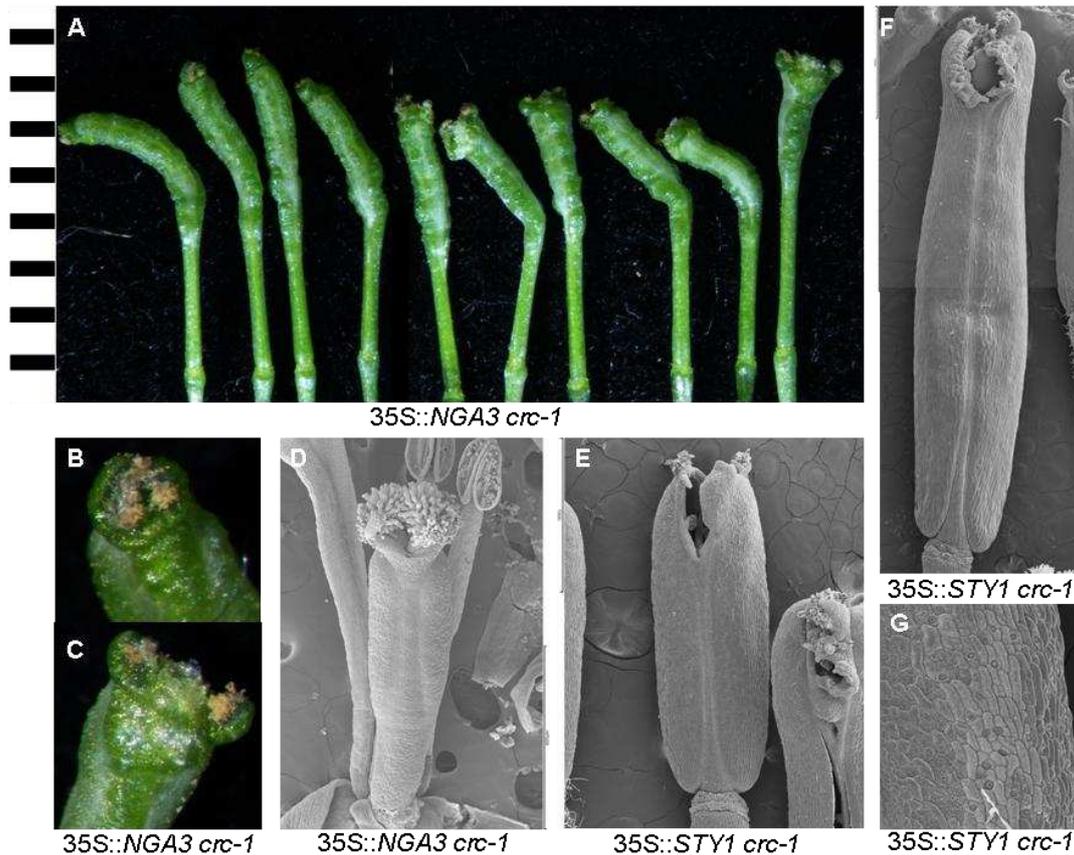


Figura 66. Caracterización fenotípica de la línea 35S::NGA3 *crc-1* y 35S::STY1 *crc-1*. (A-D) Línea 35S::NGA3 *crc-1*. (A) Fotografía de los diez primeros frutos (Las unidades de la regla son mm.). (B-C) Detalle de la zona apical del fruto: se pueden observar los defectos en la formación del estilo y estigma. (D) Fotografía al microscopio electrónico de barrido de una flor en anthesis. (E-G) Línea 35S::STY1 *crc-1*. (E-F) Fotografía al microscopio electrónico de barrido de un fruto en estadio 17: la zona apical del estilo presenta defectos de fusión además de una reducción importante del tejido estigmático. (G) Detalle de la valva, donde se observan pequeños parches de células típicas de la epidermis del estilo.

Si la hipótesis de que era necesario un trímero STY-NGA-CRC para especificar la identidad de las células de estilo fuese correcta, debería esperarse que en fondo mutante *crc*, la sobreexpresión simultánea de NGA3 y STY1 no diera lugar a la transformación de la epidermis de la valva en epidermis de estilo. Las plantas 35S::STY1 35S::NGA3 *crc-1* (fig. 67) dieron frutos completamente estériles. En aquellos gineceos que llegaron a elongar ligeramente, se observó una alteración de la distribución de tejidos a lo largo del eje apical-basal. Así pues, los frutos (fig 67 E, H) mostraban un ginóforo largo con una reducción importante del tamaño del ovario. Dentro del mismo se podía observar un ensanchamiento del replum y una reducción del tamaño de las valvas. Además, los gineceos presentaban normalmente defectos de fusión en el extremo apical (fig. 67 A-B). En lo que respecta a los tejidos apicales, el desarrollo del estilo y estigma estaba seriamente afectado. Así pues, los frutos mostraban una reducción importante del tejido estigmático apareciendo grupos de papilas estigmáticas en el extremo del gineceo pero muy rara vez se formaban células del estilo, y cuando aparecían, eran grupos aislados asociados generalmente a las papilas estigmáticas (fig. 67 F). Este tipo de células tampoco se observaban en ningún otro tejido del fruto (fig. 67 D, G), es decir, no tenía lugar la formación ectópica de células del estilo en la valva como se había observado en la línea 35S::NGA3 35S::STY1. Por tanto, con la pérdida de la expresión de CRC se perdía la identidad del estilo, lo cual

indicaba que, junto con STY y NGA, éste era necesario para la especificación del mismo y apoyaba fuertemente el significado funcional del posible trímero NGA-STY-CRC.

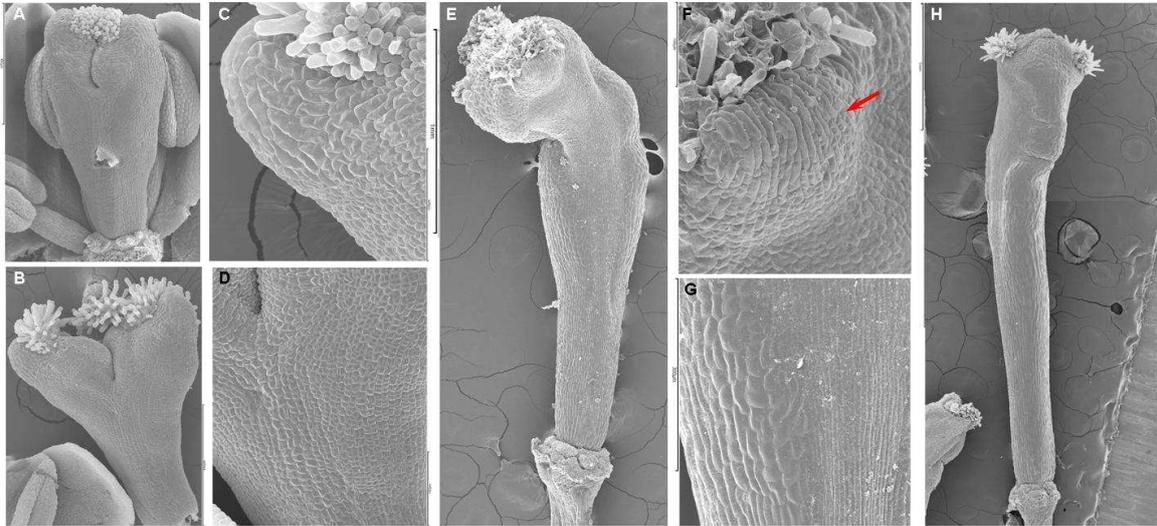


Figura 67. Caracterización fenotípica de la línea 35S::NGA3 35S::STY1 *crc-1*. (A) Gineceo en estadio 12. Se pueden observar defectos en la fusión del extremo apical del gineceo. (B-D) Gineceo en estadio 12. La región apical presenta defectos importantes en la fusión del gineceo. (C) Detalle de la región apical del gineceo, no se observan células del estilo. (D) Detalle de la región media del gineceo. No se observa formación ectópica de células del estilo. (E-G) Fruto en estadio 17. Se altera la distribución de tejidos a lo largo del eje apical-basal. (F) Detalle de la zona apical del fruto. Se forman pequeños grupos aislados de células del estilo (flecha). (G) Detalle de la zona media del fruto. No se observan células del estilo. (H) Fruto en estadio 17. Reducción importante del tejido estigmático, con ausencia de células del estilo.

3.2. STY y NGA son necesarios para la activación de YUC4.

Trabajos publicados del laboratorio de Eva Sundberg habían identificado algunas posibles dianas de STY1 (Sohlberg et al., 2006; Eklund et al., 2010). En concreto, STY1 se había identificado como regulador directo de YUCCA4 (YUC4) (Eklund et al., 2010). Como ya se ha mencionado en el capítulo anterior YUC4 se expresa en la zona apical del gineceo y óvulos en desarrollo, solapando con los dominios de expresión de STY1 y NGA. El fenotipo de los mutantes *nga* imitaba el efecto de niveles reducidos de auxinas en la zona apical del gineceo. Además, la pérdida de actividad NGA daba lugar a la falta de activación de YUC2 y YUC4 en la zona apical del gineceo. Así pues, cabía la posibilidad de que del mismo modo que ambos genes eran necesarios para la correcta formación del estilo, también actuaran de forma conjunta en la regulación de la biosíntesis de auxinas regulada por YUC.

Al analizar el patrón de expresión de YUC4 en fondo 35S::NGA3 se observó que éste no cambiaba respecto al silvestre (fig. 68). Lo mismo ocurría, al menos a nivel del gineceo, en fondo 35S::STY1, en el que se seguía observando señal en la zona apical del gineceo y en óvulos, aunque con una intensidad ligeramente superior a la del fondo silvestre. En el resto de órganos florales la señal era significativamente más intensa.

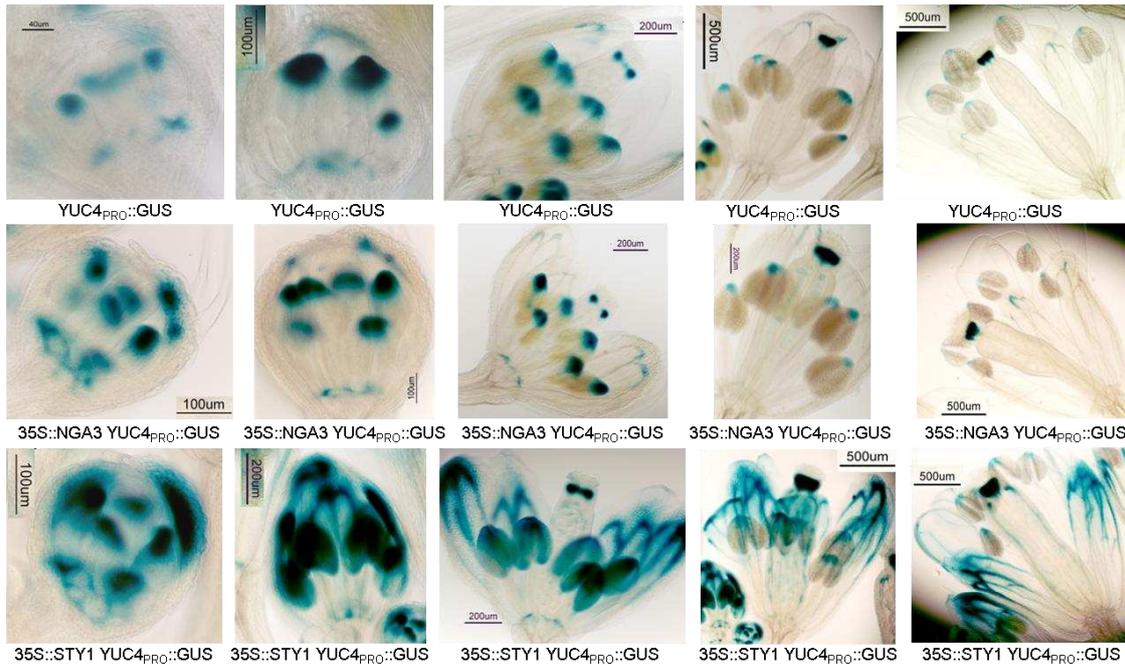


Figura 68. Efecto de la sobreexpresión de *NGA* y *STY1* en la expresión de *YUC4* en el estilo. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *YUC4* en inflorescencias de plantas silvestres, de la línea 35S::*NGA3* y 35S::*STY1*. Se puede observar como la sobreexpresión de *NGA3* o *STY1* no conlleva cambios en la expresión de *YUC4* en el estilo.

La ausencia de modificaciones en el patrón espacial de expresión de *YUC4* en fondos que sobreexpresaban o bien *NGA3* (fig. 68) o bien *STY1* (fig. 68) podía ser debida a que se requiere la expresión conjunta de ambos factores. Para comprobar esta hipótesis se analizó el patrón de expresión de *YUC4* en líneas 35S::*STY1* 35S::*NGA3* (fig. 69). En las plantas analizadas la señal era igual a la detectada cuando únicamente se sobreexpresaba *STY1* (fig. 68). Así pues, la sobreexpresión de ambos genes no desencadenaba ningún cambio significativo en el patrón de expresión de *YUC4*. Estos datos parecían indicar que el efecto fenotípico de la sobreexpresión conjunta de *NGA3* y *STY1* no está mediado por la expresión ectópica de *YUC4* y que probablemente *NGA3* y *STY1* no actúen conjuntamente sobre el promotor de *YUC4*.

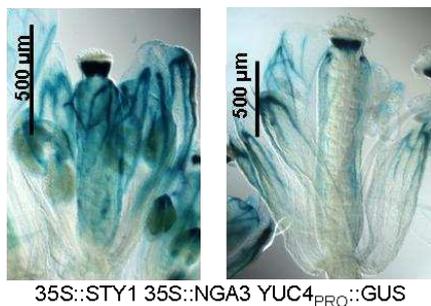


Figura 69. Efecto de la sobreexpresión conjunta de *NGA* y *STY1* en la expresión de *YUC4* en el estilo. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *YUC4* en inflorescencias de la línea 35S::*NGA3* 35S::*STY1*.

Con el fin de confirmar si la posible regulación del gen *YUC4* por parte de los factores de transcripción *STY1* y *NGA* tenía lugar por rutas independientes, se llevó a cabo un ensayo de activación transcripcional del promotor de *YUC4*. Para este ensayo se utilizó el método desarrollado por Hellens et al. (2005). Para llevarlo a cabo se clonaron 2.3Kb del promotor de *YUC4* dirigiendo la expresión del gen de la LUCIFERASA (*LUC*). En el mismo vector se localizaba el gen de la *RENILA* (una proteína luminiscente similar a la luciferasa) bajo el control del promotor 35S y que se

utilizó para normalizar los datos de expresión. Junto con esta construcción se infiltraron construcciones que sobreexpresaban *STY1* y/o *NGA1* o las proteínas de fusión *STY1:VP16* o *NGA1:VP16* (fig. 70).

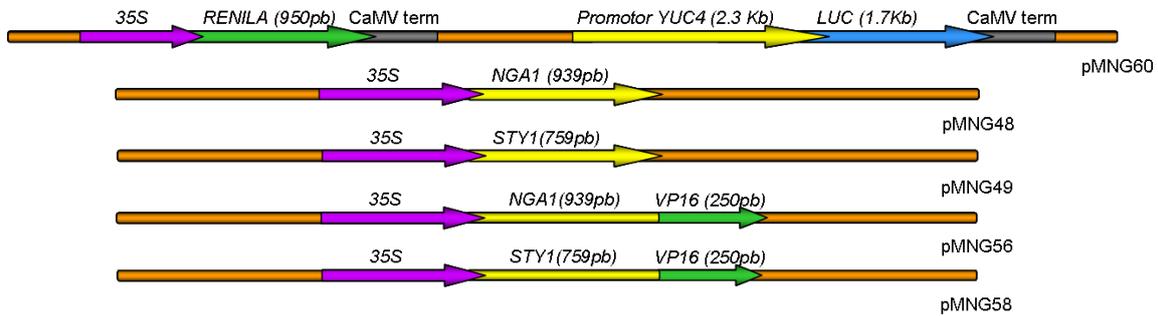


Figura 70. Esquema de las construcciones empleadas para estudiar si *STY1* y *NGA1* actuaban conjuntamente en la activación de *YUC4*. Se fusionó el promotor *YUC4* al gen de la *LUCIFERASA*. Se clonaron las regiones codificantes de *STY1* y *NGA1* y las proteínas de fusión *STY1:VP16* y *NGA1:VP16* bajo el control del promotor 35S.

En primer lugar se comprobó si el ensayo funcionaba, analizando la unión de la proteína *STY1* al promotor de *YUC4* para activar la expresión del gen *LUC* (fig. 71). Para ello, se coinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con el vector de la luciferasa y con la construcción de la sobreexpresión de *STY1* o la de *STY1* fusionado al dominio de activación *VP16* (fig. 70). La fusión a *VP16* nos permitiría detectar la activación del promotor por *STY1* haciéndola independiente de factores que pudiera necesitar para comportarse como activador transcripcional, y, en el caso de que no los necesitase, también esperaríamos obtener una activación más potente. Así pues, los resultados mostraban que la proteína de fusión *STY1:VP16* activaba de forma significativa la expresión del gen *LUC* mientras que *STY1* no producía un cambio significativo en la actividad luciferasa. Por tanto, *STY1* parecía ser capaz de unirse al promotor de *YUC4* pero no de activarlo por si mismo.

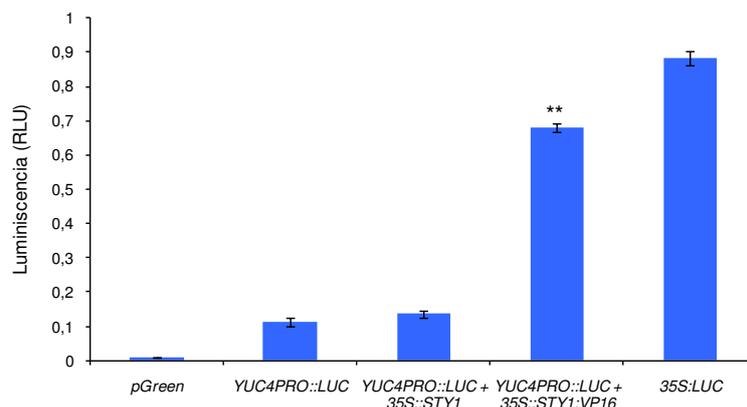


Figura 71. Activación transitoria del promotor *YUC4* por la proteína *STY1*. Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en la gráfica. Transcurridos tres días se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por el gen de la *LUC* y de la *RENILA* (control interno) y se representó el ratio Luc/Ren. Se utilizaron el pGreen LUC vacío y este plásmido con el promotor de *YUC4* dirigiendo la expresión de *LUC* como controles negativos y el gen *LUC* bajo el control del promotor constitutivo 35S como control positivo. Las barras de error representan la desviación típica. ** $P < 0,001$.

A continuación, se decidió comprobar que ocurría con *NGA1* (fig. 72). La metodología utilizada fue la misma que en el caso de *STY1*. Tras analizar los resultados se puede observar que cuando infiltramos *NGA1* no se apreciaron diferencias

significativas con respecto al control. Sin embargo, la proteína de fusión NGA1:VP16 sí fue capaz de activar de forma significativa la expresión de YUC4, aunque el nivel de activación fue menor que en el caso de STY1.

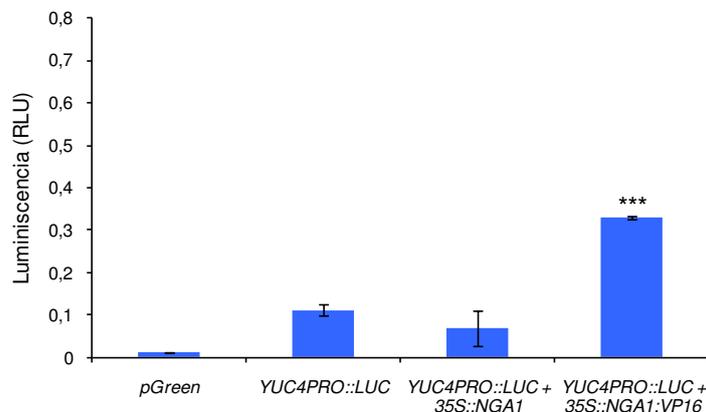


Figura 72. Activación transitoria del promotor YUC4 por la proteína NGA1. Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas en la gráfica, transcurridos tres días se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por el gen de la *LUC* y de la *RENILA* (control interno). Las barras de error representan la desviación típica. *** $P < 0,01$.

Por consiguiente, ni STY1 ni NGA1 podían activar por sí mismos y sin la presencia de factores adicionales la expresión de YUC4. Es posible que ambos factores puedan unirse al promotor pero requieran de factores adicionales para activarlo. En primer lugar se comprobó si la interacción de STY1 y NGA1 era necesaria para la activación de YUC4. También se realizaron experimentos para intentar comprobar la posibilidad de que, al igual que ocurría en el estilo, fuera CRC el factor necesario para que ambas proteínas interaccionaran y llevaran a cabo la activación de YUC4 (fig. 73).

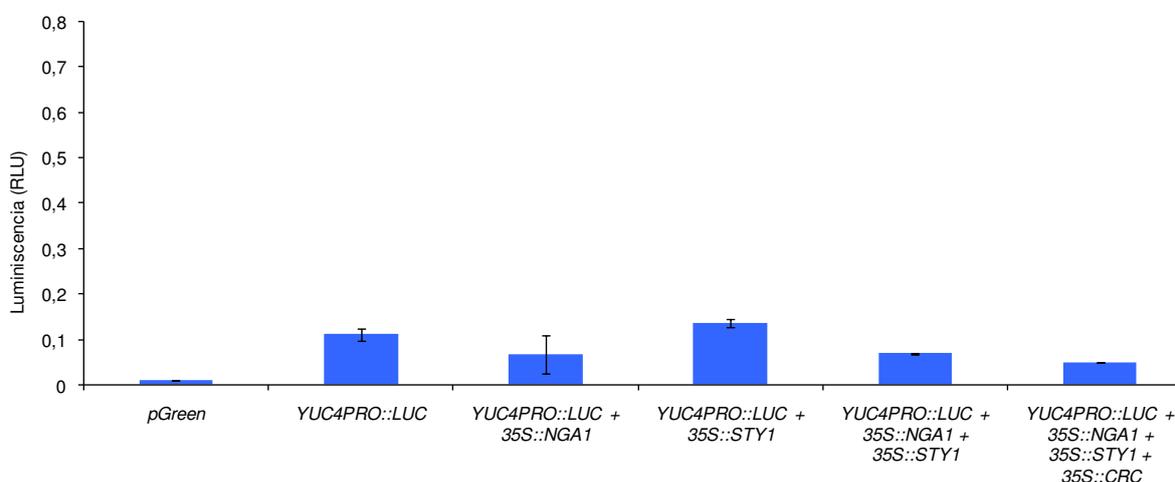


Figura 73. Estudio de la activación transitoria del promotor de YUC4 por diferentes combinaciones de proteínas. Se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las combinaciones de plásmidos indicadas a la izquierda de la tabla, transcurridos tres días se cuantificó en un luminómetro la señal emitida por el gen de la *Luciferasa* y de la *Renila* (control interno). Las barras de error representan la desviación típica.

Estos datos indicaban que STY1 y NGA parecían ser capaces de unirse al promotor de YUC4, pero no de activarlo ni por separado, ni conjuntamente, ni en presencia de CRC, sugiriendo que para regular a YUC4 podrían requerir de la presencia de factores adicionales.

Además, de los resultados obtenidos se podía concluir que los efectos fenotípicos de la sobreexpresión conjunta de STY/NGA parecían no estar mediados

principalmente por YUC, ya que, aunque tanto los factores STY como los factores NGA parecían ser necesarios para su activación en la zona apical del gineceo, y que ambos tipos de factores podrían estar uniéndose de modo directo sobre el promotor de YUC4, el patrón de expresión de YUC4 no cambiaba significativamente en los gineceos 35S::STY1 35S::NGA3.

3.3. *NGA* y otros genes implicados en la diferenciación del eje apical-basal del gineceo.

De entre los genes implicados en la correcta distribución de los tejidos a lo largo del eje apical-basal, además de los ya estudiados en el capítulo anterior, encontramos a factores transcripcionales como ETT y SPT. Ambos se postula que están implicados en la interpretación del gradiente de auxinas presente en el gineceo (Nemhauser et al., 2000, Heisler et al., 2001). Por otra parte y como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, los genes NGA parecían estar implicados en el establecimiento de este gradiente, por tanto se procedió a analizar las interacciones genéticas con estos factores de transcripción.

3.3.1. *Interacción genética entre SPT y NGA.*

SPT codifica un factor de transcripción tipo bHLH (basic helix-loop-helix) y está implicado en la organización apical-basal del gineceo, así como en la especificación de los tejidos mediales (Heisler et al., 2001). En los mutantes *spt* el tracto transmisor no se forma y el tejido estilar está reducido y presenta defectos en la fusión (Alvarez y Smyth, 1999). El fenotipo del estilo observado en el mutante se rescata tras tratar las plantas con NPA (un inhibidor del transporte polar de auxinas), por lo que los autores sugerían que la transducción de la señal podía ser dependiente de una ruta mediada por SPT (Nemhauser et al., 2000).

Se ha observado una fuerte interacción sinérgica de las mutaciones *spt* y *sty/shi*. Además, en algunos fondos genéticos las mutaciones *spt* son epistáticas sobre algunos fenotipos *sty/shi*, indicando que STY y SPT podrían regular la organización apical-basal en la misma ruta (Sohlberg et al., 2006; Kuusk et al., 2002, 2006). Posteriormente, se ha observado que en líneas 35S::SPT:VP16 se produce la expresión ectópica de STY2, indicando que SPT podría estar regulando a STY2 (Groszmann et al., 2008).

También parece existir una interacción genética entre SPT y CRC, la cual se deduce del fenotipo de sus respectivos mutantes. Los mutantes *crc* y *spt* tienen defectos similares en la fusión apical del carpelo y cuando se combinan, el fenotipo del doble mutante *spt-2 crc-1* es mucho más severo al de los mutantes sencillos, apareciendo el gineceo sin fusionar excepto en la base, además de presentar una reducción importante de los tejidos apicales y mediales (Bowman y Smyth, 1999; Alvarez y Smyth, 1999, 2002). El fenotipo del doble mutante *spt crc* era muy similar al del mutante *amiR-NGA crc-1*. Analizando el dominio de expresión de SPT y comparándolo con el de los genes NGA se puede observar un solapamiento entre ellos durante los estadios 8 y 11, durante los cuales estos genes se expresan en la región medial y apical del gineceo.

Por todo ello se decidió analizar la posible relación funcional entre los genes NGA y SPT. En trabajos previos del laboratorio se había determinado que en el doble mutante *nga3 spt* se observaban fenotipos severos en la fusión del carpelo, con pérdida de estilo y estigma, aunque en ocasiones aparecían grupos de células del estilo aisladas (Trigueros, 2008). Se analizó el patrón de expresión de NGA3 en fondo *spt-2* y 35S::SPT y no se observó ningún cambio con respecto al fondo silvestre, mientras que

cuando se estudió el patrón de expresión de SPT en fondo mutante nga sí se detectó señal en óvulos y semillas, donde en fondo silvestre no se expresa, y por el contrario no se expresaba en la zona de dehiscencia de las anteras donde sí lo hace en fondo silvestre (Trigueros, 2008). Por todo ello podría pensarse que la regulación de SPT por parte de NGA podría ser diferente en función del contexto. Como complemento a estos estudios y dado que los genes NGA parecían interactuar con un espectro amplio de proteínas se decidió comprobar a través de un ensayo de interacción proteína-proteína in vivo mediante BiFC si ambos factores interactuaban.

Como en los casos anteriores se clonó la región codificante de SPT en el extremo C-terminal de la YFP (pMNG71). Con esta construcción y la obtenida anteriormente para NGA1 (pMNG32) se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* y tras 3 días fueron observadas al microscopio confocal. Durante la visualización de las hojas no se detectó señal YFP (fig. 74), lo cual sugería que ambas proteínas no interactuaban directamente.

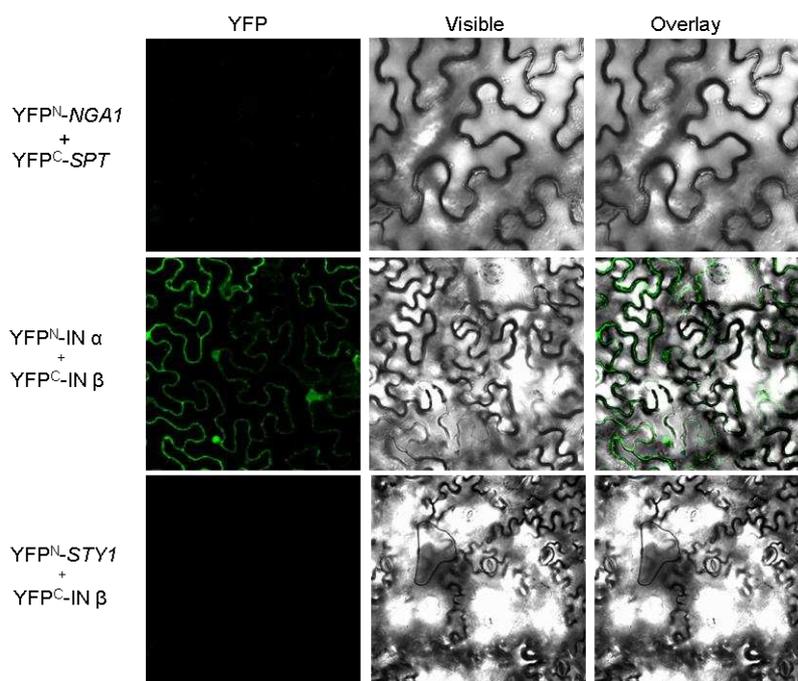


Figura 74. Estudio de interacción proteína-proteína entre SPT y NGA1. Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo (YFP^N-IN α + YFP^C-IN β). Control negativo (YFP^N-STY1 + YFP^C-IN β).

Por otra parte, los fenotipos tan severos observados en las combinaciones de mutantes entre *spt* y *nga3/4* (Trigueros, 2008) indicaban la existencia de una interacción sinérgica entre ambos genes. Para estudiar si esta interacción tenía lugar con otros miembros de la familia NGA se generó el doble mutante *nga1-4 spt-2*. El mutante *spt-2* se caracteriza por presentar una reducción de los tejidos estigmáticos y estilares, una zona apical parcialmente sin fusionar y la ausencia del tracto transmisor (fig. 75 A). El fenotipo del doble mutante era más severo que el de los mutantes sencillos por separado. En el doble mutante no sólo aparecía sin fusionar estilo y estigma, sino también la zona apical de las valvas, hasta el punto de poder observar los óvulos alojados en el interior del gineceo (fig. 75 B). En ocasiones la parte superior del gineceo recordaba a la forma de una hoja (fig. 75 C). Además, se reducía notablemente el número de papilas estigmáticas (fig. 75 D). Este fenotipo indicaba la existencia de una relación sinérgica entre ambos genes, al igual que lo observado para NGA3/4 y SPT, de modo que aunque no interactuaran físicamente, era probable que ambos fueran necesarios para la correcta formación de la zona apical del fruto.

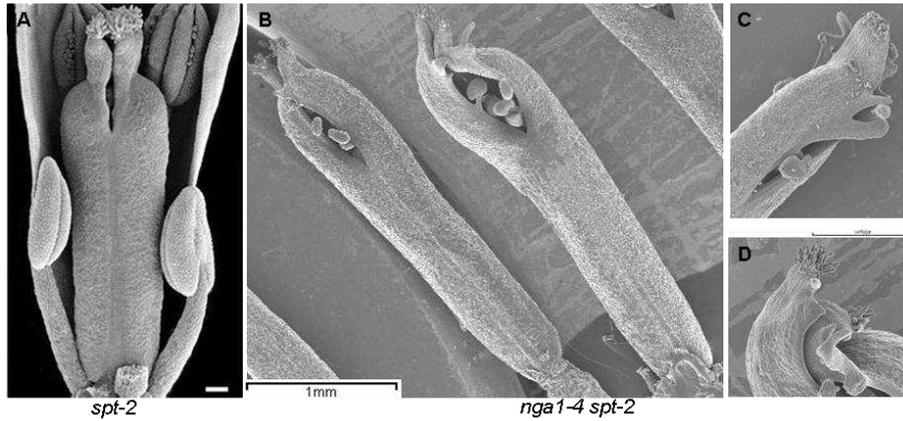


Figura 75. Caracterización fenotípica del mutante *nga1-4 spt-2*. Fotografías del microscopio electrónico de barrido. **(A)** Fruto en anthesis del mutante *spt-2* (tomada de Alvarez y Smith, 2002). **(B)** Fruto completamente elongado del doble mutante *nga1-4 spt-2*. **(C-D)** Detalle de la zona apical del fruto del mutante *nga1-4 spt-2*.

Para obtener más información sobre la posible interacción genética entre NGA y SPT se sobreexpresó el gen NGA3 en fondo *spt-2*. En estas líneas el fruto presentaba un fenotipo similar al de la línea de sobreexpresión de NGA3 (fig. 76 A), es decir, acortamiento de las valvas, ginóforo más largo, y además, la zona apical del estilo estaba completamente fusionada (fig. 76 B-G). Por tanto, la sobreexpresión de NGA3 rescataba el fenotipo del mutante *spt-2* (fig. 76). Así pues, NGA era capaz de dirigir la fusión del estilo en ausencia de SPT. Por otra parte, la mutación *spt* suprimía en cierta medida el fenotipo de la línea de sobreexpresión de NGA3, observándose un menor acortamiento de las valvas que en la línea parental y un replum menos afectado (fig. 76 B y F), sugiriendo así que SPT podría mediar alguna de las funciones de NGA.

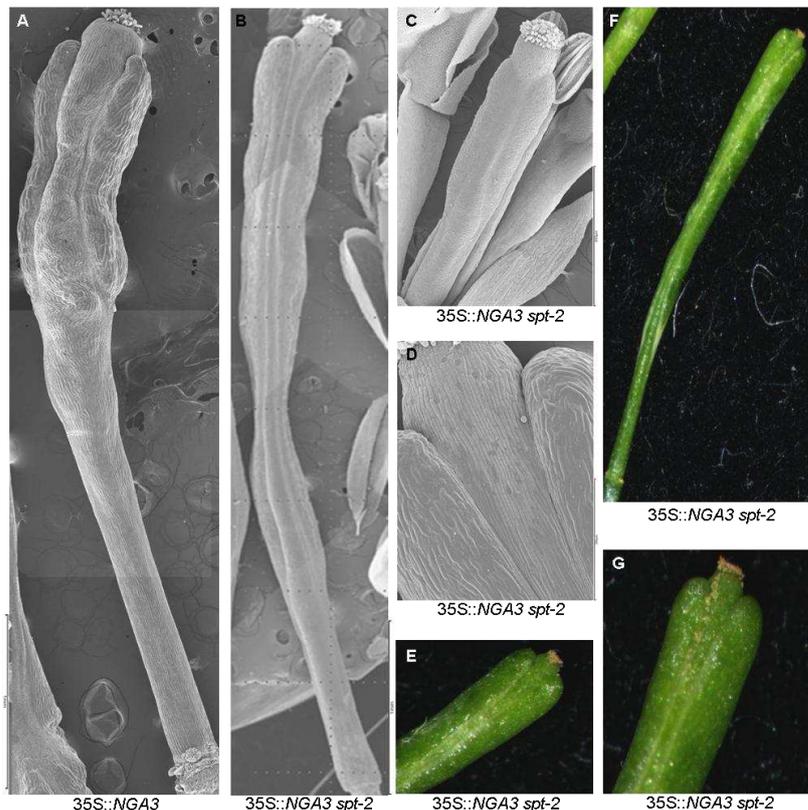


Figura 76. Fenotipos asociados a la línea de sobreexpresión *35S::NGA3* en fondo *spt-2*. **(A)** *35S::NGA3*, fotografía de microscopía electrónica de barrido de un fruto completamente elongado. **(B-G)** *35S::NGA3 spt-2*, **(B)** fotografía de microscopía electrónica de barrido de un fruto completamente elongado y **(C)** detalle de la zona apical del mismo, gineceo en anthesis. **(F)** Fotos a la lupa de un fruto completamente elongado y **(E y G)** detalle de la zona apical del mismo.

Cuando se sobreexpresaban ambos genes, el fenotipo de la roseta era similar al de la línea de sobreexpresión de NGA3, al presentar hojas de roseta estrechas y alargadas (fig. 77).



Figura 77. Morfología de la roseta de la línea 35S::NGA3 35S::SPT. Fotografía de la roseta de las líneas 35S::NGA3, 35S::SPT y 35S::NGA3 35S::SPT.

Así mismo, los frutos de las líneas portadoras de los dos transgenes eran idénticos a los de la línea 35S::NGA3, tanto a nivel fenotípico como a nivel de distribución de tipos celulares (fig. 78).

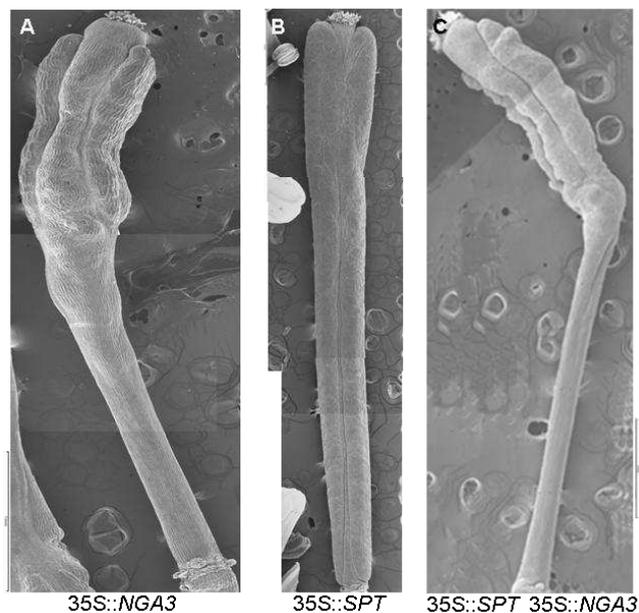


Figura 78. Caracterización fenotípica de los frutos de la línea 35S::NGA3 35S::SPT. Fotografías al microscopio electrónico de barrido de frutos completamente elongados de las líneas (A) 35S::NGA3, (B) 35S::SPT, (C) 35S::SPT 35S::NGA3.

A partir de los resultados obtenidos se podría deducir que aunque ambos genes podrían actuar en la misma ruta, NGA podría situarse por debajo de SPT, al menos en lo que respecta a su función en la especificación del estilo. Por ello, al sobreexpresar NGA se rescataba el fenotipo del mutante *spt-2* y cuando se sobreexpresaban ambos genes el fenotipo era igual al de la línea de sobreexpresión de NGA. Pero no podemos olvidar que la mutación *spt* también revertía parcialmente el fenotipo de la línea de sobreexpresión, lo que podría indicar que parte del fenotipo de la línea de sobreexpresión de NGA podría estar mediado por una desregulación de SPT, sugiriendo así que SPT, a su vez, podría estar regulado por NGA, o bien, que la actividad de NGA en determinados contextos podría requerir de la presencia de SPT. En definitiva, nuestros resultados indicaban que la interacción entre NGA y SPT parecía ser bastante compleja.

Por todo ello, se analizó si se producía algún cambio en el patrón de expresión

de la línea marcadora $SPT_{PRO}::GUS$ en fondo *nga1* y $35S::NGA3$. Como se puede observar en la figura 79, no se detectó ninguna diferencia significativa en cuando a la distribución de la señal en el gineceo, con la única excepción de que en flores en estadio 12, en el caso del fondo mutante *nga1* (fig. 79 G), parecía apreciarse una disminución en la intensidad de la señal mientras que en la línea de sobreexpresión la señal parecía más intensa (fig. 79 D). En gineceos en estadio 15, al sobreexpresar $NGA3$ se producía una expansión de la señal en la zona de dehiscencia (fig. 79 F). Estos resultados parecían indicar que NGA podría estar regulando el nivel de expresión de SPT .

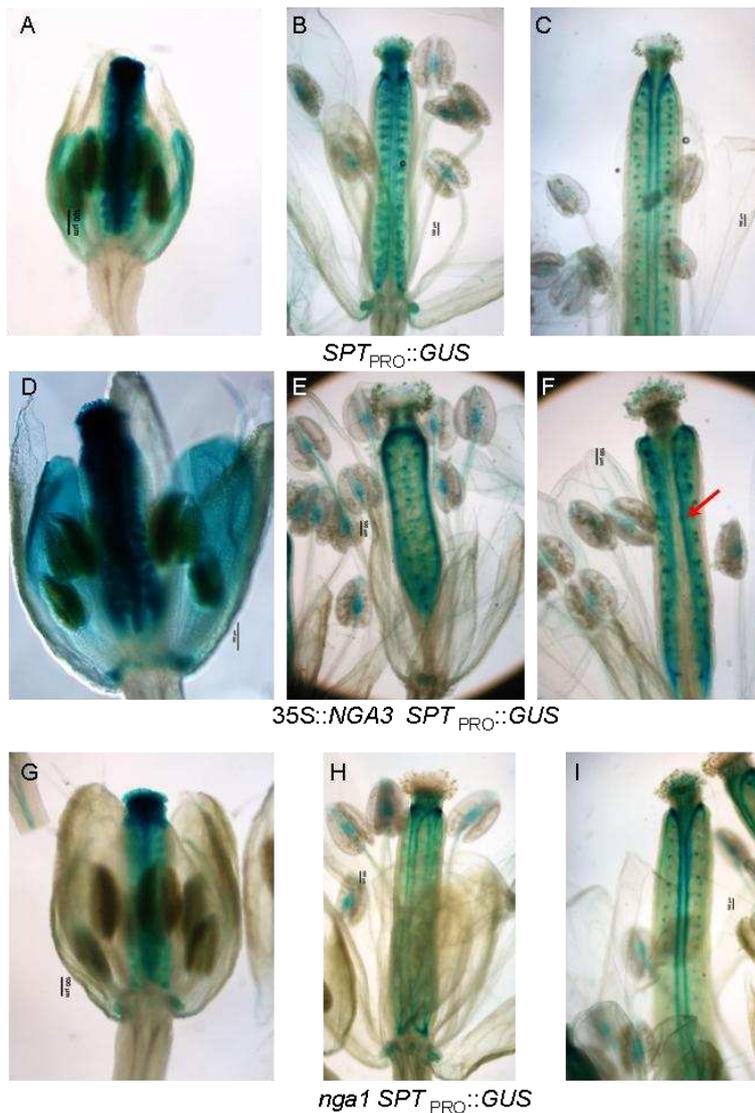


Figura 79. Estudio del patrón de expresión de SPT en diferentes fondos NGA . Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de SPT en inflorescencias de plantas silvestres (**A-B**), de la línea $35S::NGA3$ (**D-F**) y del mutante *nga1* (**G-I**). Gineceos en estadio 12 de (**A**) plantas silvestres, se podía observar una señal intensa en la zona medial del mismo así como en los primordios de los óvulos, (**D**) la línea $35S::NGA3$, la señal se mantiene como en el ecotipo silvestre, y (**G**) el mutante *nga1*, la intensidad de la señal en el ovario se reduce de forma significativa. Gineceos en estadio 14 de (**B**) plantas silvestres, la señal se detecta en estilo y estigma, margen de la valva y primordios de los óvulos, así como en nectarios, (**E**) la línea $35S::NGA3$ y (**H**) el mutante *nga1*, en ambos casos la señal se localiza en las mismas zonas que en el caso del ecotipo silvestre. Gineceos en estadio 14 de (**C**) plantas silvestres, la señal se observa en los mismos tejidos que en el estadio anterior, con una disminución de la señal en óvulos, (**F**) la línea $35S::NGA3$, se detecta una expansión de la señal en la zona de dehiscencia (flecha roja), y (**I**) el mutante *nga1*, no se detectan cambios en el patrón de expresión.

3.3.2. Interacción genética entre ETT y NGA .

El gen ETT , también denominado $ARF3$, codifica un factor de transcripción con un dominio de unión a DNA tipo ARF (Auxin Response Factors), perteneciente, por tanto, a la familia B3. La proteína ETT probablemente actúe mediando la respuesta a auxinas en el gineceo (Sessions et al., 1997; Nemhauser et al., 2000) y al igual que ocurre con otros genes ARF , la expresión de ETT no se induce por auxinas (Nemhauser et al., 2000). Las mutaciones en ETT causan defectos severos en la organización apical-basal del gineceo, con un incremento de las regiones basal y apical y una fuerte

reducción del tamaño del ovario (Sessions et al., 1997; Sessions y Zambryski, 1995), que en algunos aspectos recuerda el fenotipo de las líneas de sobreexpresión de NGA. El papel de ETT promoviendo la formación del ovario parece estar mediada por la represión de SPT en este dominio, restringiendo así su expresión al tracto transmisor y septum en desarrollo. Esto se deduce por el hecho de que las mutaciones *spt* son epistáticas a las *ett*, suprimiendo el desarrollo ectópico de los tejidos apical y abaxial observado en los mutante *ett* (Heisler et al., 2001). ETT también interacciona genéticamente con STY1 durante la fusión del carpelo y la organización apical-basal del gineceo.

Además de su función en el gineceo, ETT, junto con ARF4, es necesario para la morfogénesis y el establecimiento de la polaridad de la hoja (Hunter et al., 2006).

Al analizar el patrón de expresión de ETT en fondo 35S::NGA3 se observó que éste no cambiaba significativamente (fig. 80 E-H). Así pues, tanto en fondo silvestre (fig. 80 A) como en fondo 35S::NGA3 (fig. 80 E), en gineceos en estadio 8 se detectaba señal en los haces vasculares. En estadio 11 (fig. 80 B y F) la señal se podía observar también en los primordios de óvulos. En el resto de estadios del desarrollo del gineceo (fig. 80 C-D y G-H) la señal se detectaba siempre en esas dos zonas del mismo, es decir, en haces vasculares y en óvulos. Así pues, estos resultados parecían indicar que ETT no estaba regulado por NGA.

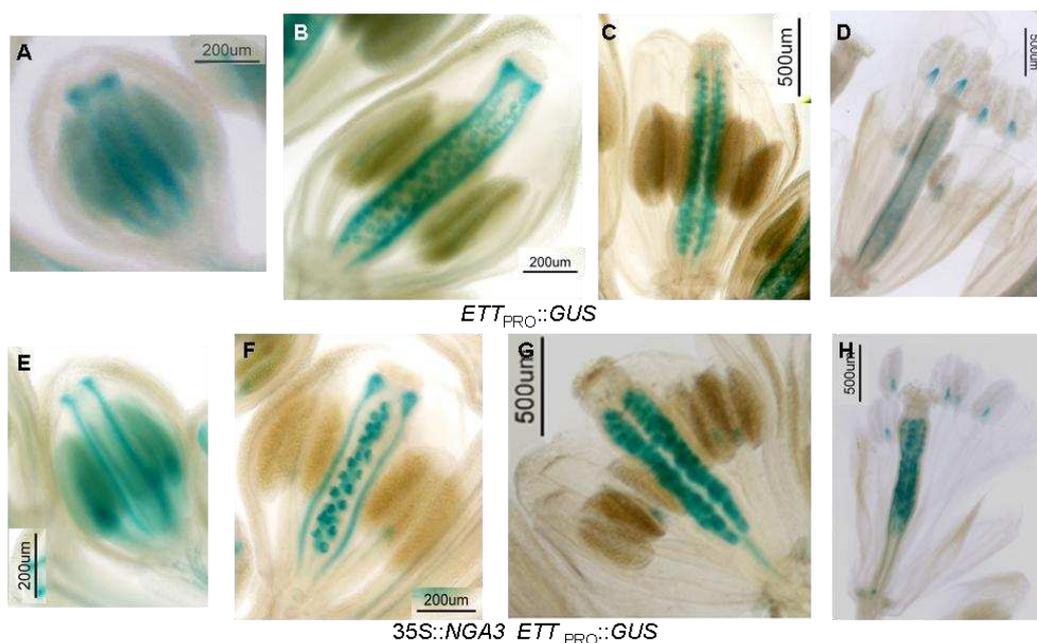


Figura 80. Patrón de expresión de ETT en fondo 35S::NGA3. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de ETT en inflorescencias silvestres (A-D) y 35S::NGA3 (E-H). Gineceo en estadio 8 de (A) plantas silvestres, la señal se detecta en los haces vasculares, y (E) de la línea 35S::NGA3, donde la señal se observa en las mismas zonas que en el ecotipo silvestre. Gineceo en estadio 11 de (B) plantas silvestres y (F) de la línea 35S::NGA3, en ambos casos la señal se detecta en haces vasculares y primordios de óvulos. Gineceo en estadio 12 de (C) plantas silvestres y (G) de la línea 35S::NGA3, en estos fondos la señal se detecta en los primordios de óvulos y más débilmente en haces vasculares. Gineceo en estadio 14 de (D) plantas silvestres y (H) de la línea 35S::NGA3, en ambos la señal se localiza en las mismas zonas que en el estadio anterior, disminuyendo la señal en óvulos.

Para explorar otras posibles interacciones entre ambos factores se llevó a cabo un ensayo de interacción proteína-proteína “in vivo” mediante complementación fluorescente bimolecular (BiFC), el cual se realizó en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas transitoriamente. Durante la visualización de las hojas se detectó señal

YFP en el núcleo (fig. 81), lo cual indicaba que ambas proteínas podían interactuar entre sí para llevar a cabo una función común.

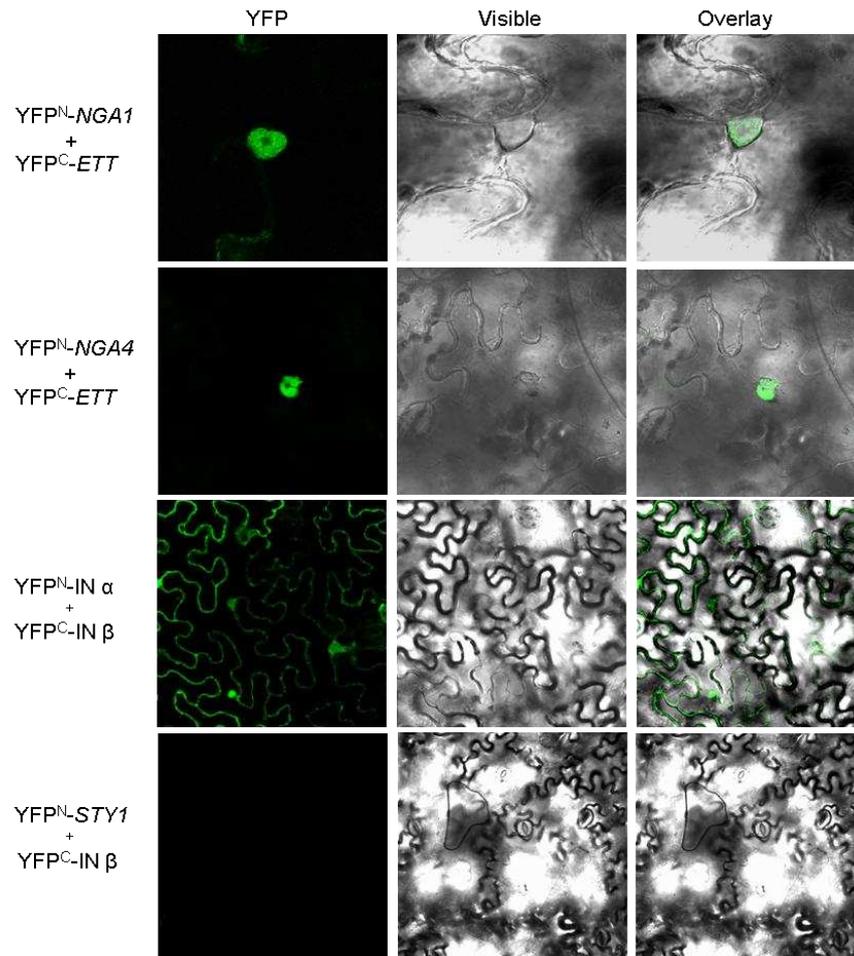


Figura 81. Estudio de interacción proteína-proteína entre *ETT* y *NGA1* y *NGA4*. Fotografía al microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda. Control positivo (YFP^N-IN α + YFP^C-IN β). Control negativo (YFP^N-*STY1* + YFP^C-IN β).

Con la intención de comprobar genéticamente la interacción entre *NGA* y *ETT* se cruzaron las líneas de sobreexpresión de ambos genes (fig. 82). Las plantas obtenidas presentaban un fenotipo en la roseta similar al de la línea 35S::*ETT*, a excepción de que las hojas crecían hacia arriba. Por el contrario, el fenotipo de los frutos era igual al de la línea 35S::*NGA3*.

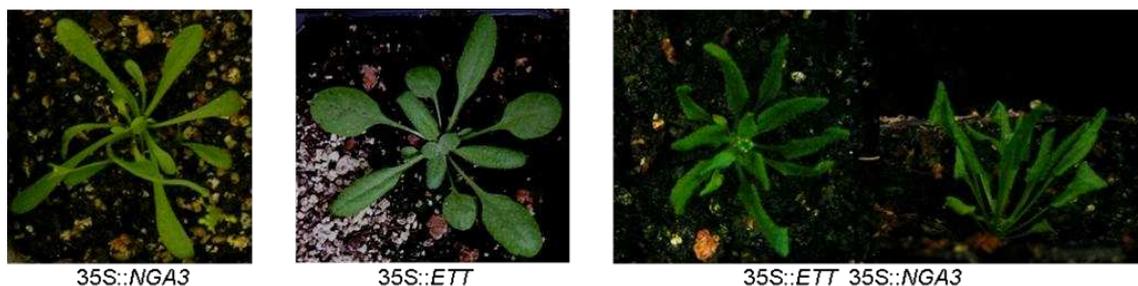


Figura 82. Caracterización fenotípica de la línea 35S::*ETT* 35S::*NGA3*. Fotografía a la lupa de la roseta de las líneas 35S::*NGA3*, 35S::*ETT* y 35S::*ETT* 35S::*NGA3*.

Aunque, puesto que no es objetivo de este trabajo, no caracterizamos en profundidad estos fenotipos foliares, los resultados obtenidos podrían indicar una posible función de los genes NGA en rutas de señalización de auxinas y especificación de la polaridad en hojas, ya que este fenotipo recordaba mucho al del mutante *kan1-2 kan2-1* (Pekker et al., 2005), en el que se modifica la organización abaxial/adaxial de la hoja.

Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no permitían esclarecer la naturaleza de la relación entre ETT y NGA.

Capítulo 4. El papel de los genes *NGA* en la regulación de los genes que participan en la morfogénesis a lo largo del eje medio-lateral del gineceo.

Las interacciones genéticas que dirigen la formación de tejidos en el eje medio-lateral del ovario de *Arabidopsis* están bastante definidas, especialmente las que controlan la formación de la valva y el margen de la valva (ver apartado 4.2 c de la introducción). Se ha propuesto un modelo que explica la diferenciación de estos tejidos en el ovario en base a los fenotipos de diferentes mutantes que afectan a la diferenciación de los mismos y al análisis genético detallado de las relaciones entre los distintos genes implicados (Balanzá et al., 2006; Ostergaard, 2009). Según este modelo la expresión de SHP quedaría restringida al margen de la valva por la acción conjunta de FUL, actuando en la valva, y RPL, actuando en el replum (Roeder et al., 2003). Por tanto, FUL y RPL restringen la actividad de SHP al margen de la valva, donde promueve la expresión de IND y ALC, que son los responsables de la correcta diferenciación de los tejidos en la zona de dehiscencia (Rajani y Sundaresan, 2001; Liljegren et al., 2000, 2004).

Al mismo tiempo, FIL, YAB3 y JAG actúan redundantemente para promover la expresión de FUL y SHP en la valva y el margen de la valva, respectivamente. Para explicar la activación diferencial de estos factores en diferentes dominios se ha propuesto que altos niveles de FIL/YAB3/JAG en la valva activarían la expresión de FUL mientras que niveles inferiores de estos genes en el margen de la valva serían suficientes para activar a los genes SHP. En el replum, RPL también bloquea la actividad FIL/JAG, previniendo la activación de SHP (Dinneny et al., 2005).

Tanto FUL como los genes SHP se expresan en la zona apical del gineceo y, aunque el papel principal de ambos en el desarrollo del gineceo se ha relacionado con el establecimiento del margen de la valva, tanto las mutaciones ful como las shp afectan al desarrollo de las regiones apicales en determinados fondos genéticos (Ferrandiz et al., 2000; Colombo et al., 2009).

El fenotipo de la línea de sobreexpresión de NGA3 recordaba en parte al fenotipo del fruto del mutante ful, ya que, en ambos casos, se observaba un acortamiento y sobrelignificación de las valvas, mayor longitud del ginóforo y el replum ensanchado y en zig-zag. Se ha establecido que el fenotipo del mutante ful es debido fundamentalmente a la expresión ectópica de IND en la valva, ya que en el doble mutante ful ind se suprime en gran medida el fenotipo de sobrelignificación y acortamiento de las valvas y, además, el fenotipo del mutante ful es similar al de la línea de sobreexpresión de IND (Liljegren et al., 2004). Junto con IND, otros factores también contribuyen al fenotipo de ful, puesto que al ir eliminando en fondo mutante ful la actividad de otros genes implicados en la correcta formación de la zona de dehiscencia se rescata completamente el fenotipo ful en las valvas. Tal es así, que sólo en el quintuple mutante ful ind shp1 shp2 alc se recupera prácticamente en su totalidad el tamaño del fruto silvestre (Liljegren et al., 2004).

El fenotipo de las líneas 35S::NGA3 se podría explicar por la existencia de una relación entre los genes NGA y los genes implicados en la diferenciación de la zona de dehiscencia. Si esto fuera así el fenotipo de la línea 35S::NGA3 podría ser debido a que alguno/s de estos genes estuvieran desregulados.

Si se observaba con detalle la zona del margen de la valva se podía comprobar cómo los triples mutantes (fig. 83 C-D) y el cuádruple mutante nga (fig. 83 E-F) parecían presentar defectos en la diferenciación del margen de la valva. Así pues, aunque se apreciaba cierto grado de diferenciación, esta zona no aparecía tan definida

como en frutos de plantas silvestres (fig. 83 A-B). Por el contrario, en la línea 35S::NGA3 (fig. 83 G-H) se observaba una expansión de la zona del margen de la valva.

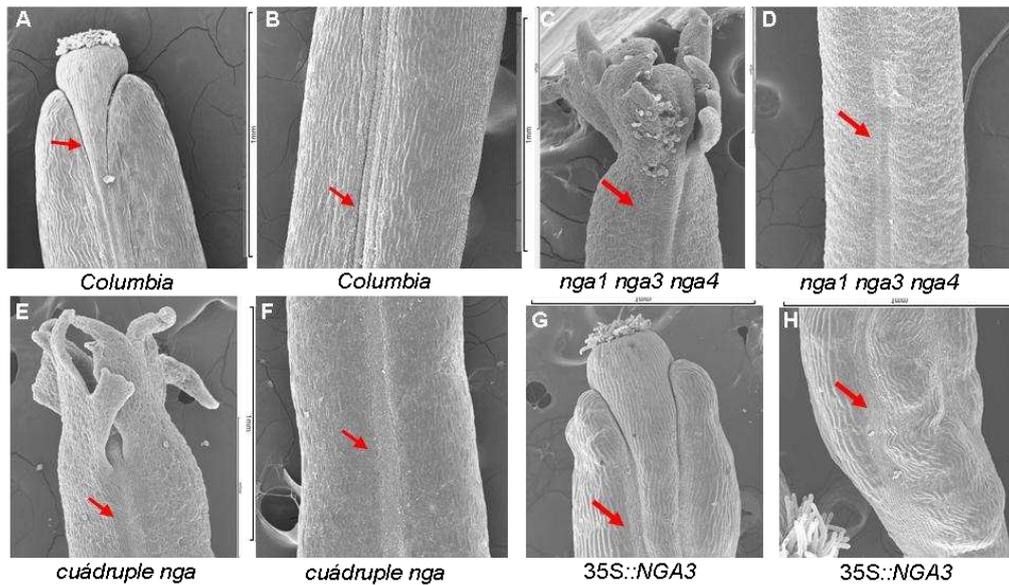


Figura 83. Desarrollo del margen de la valva. (A-B) *Columbia*. (C-D) *nga1 nga3 nga4*. Se puede observar una menor definición de la zona del margen de la valva, que es más evidente en la zona apical del fruto. (E-F) Cuádruple *nga*. No se observa la separación marcada por el margen de la valva entre replum y valva. (G-H) 35S::NGA3. Se observa una expansión del margen de la valva. Las flechas rojas señalan el margen de valva.

Para comprobar si los defectos observados en el margen de la valva de los mutantes *nga* eran consecuencia de la falta de lignificación en la zona de dehiscencia del fruto se llevaron a cabo cortes transversales de frutos incluidos en parafina y su posterior tinción con fluoroglucinol. En ellos no se pudieron observar diferencias significativas en la lignificación de la zona de dehiscencia entre frutos de la línea *nga1nga2nga3nga4* y de plantas silvestres.

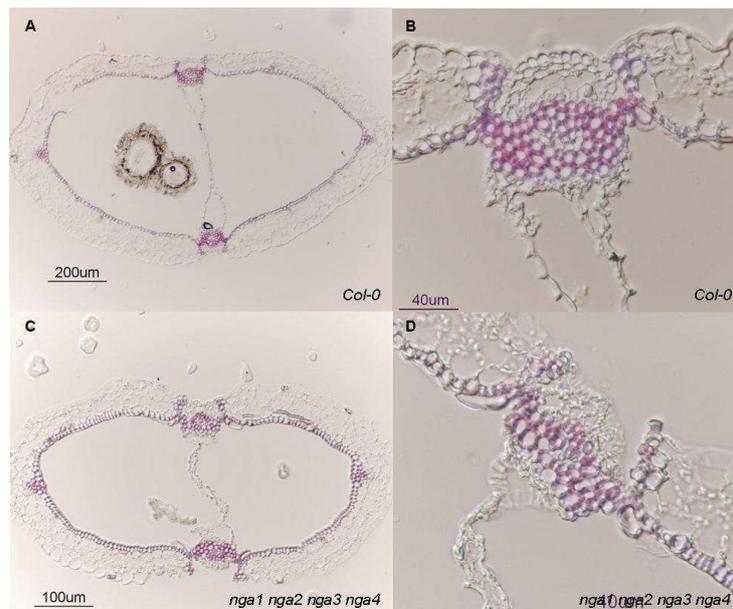


Figura 84. Lignificación de la zona de dehiscencia. (A-B) *Columbia*. (C-D) *nga1 nga2 nga3 nga4*.

Por el contrario, en frutos 35S::NGA3 sí se había observado una lignificación ectópica en la zona de la valva (Trigueros, 2008).

Para explicar las similitudes entre los fenotipos 35S::NGA3 y ful se propusieron distintas hipótesis (fig. 85):

1. Que NGA reprimiera a FUL. Así, al sobreexpresar los genes NGA disminuiría la expresión del gen FUL, lo cual conllevaría la sobreexpresión de los genes de identidad del margen de la valva.

2. Que NGA activara a IND independientemente de SHP. Puesto que el fenotipo del mutante ful es debido fundamentalmente a la desregulación de IND, el fenotipo que observamos en la línea 35S::NGA3 podría ser consecuencia de la expresión ectópica de IND en la valva.

3. Que NGA activara a SHP. Por tanto, al sobreexpresar NGA se sobreexpresaría SHP y, por consiguiente, también lo harían IND y ALC.

Junto a estas hipótesis más sencillas, y teniendo en cuenta que YAB3 había sido identificado como interactor de NGA en un ensayo de doble híbrido de levadura (Trigueros, 2008), podríamos proponer otra hipótesis (4) que implicaría un papel de NGA en la modulación de la activación de FUL y SHP por la ruta FIL/JAG/YAB3, favoreciendo la activación de SHP frente a la de FUL.

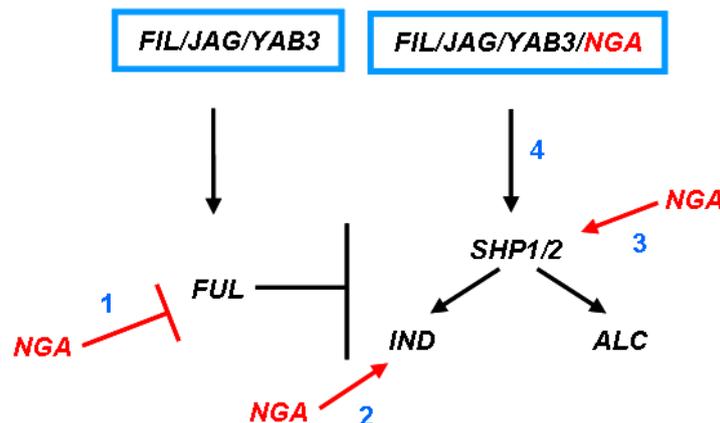


Figura 85. Hipótesis sobre la posible relación entre los genes *NGA* y los genes implicados en el establecimiento del eje medio-lateral.

Para estudiar si era posible descartar o confirmar alguna de estas hipótesis, en primer lugar se analizó si el patrón de expresión de líneas reporteras de los genes implicados en la diferenciación del margen de la valva cambiaba en fondo 35S::NGA3 y en mutantes nga.

La primera hipótesis que se planteó fue una posible interacción entre NGA y FUL. El gen FUL es un factor de transcripción de tipo MADS-box. Su función principal es la especificación de la identidad de las células de la valva para su correcto crecimiento y diferenciación. Además es necesario para prevenir la lignificación de las células de la valva y la elongación del estilo (Gu et al., 1998; Ferrándiz et al., 2000).

Se comenzó estudiando el patrón de expresión de la línea marcadora FUL_{PRO}::GUS en el cuádruple mutante nga y la línea 35S::NGA3. En gineceos en estadio 8 (fig. 86 A), FUL se expresaba en las valvas del carpelo excepto en el extremo apical de las mismas. Sin embargo, en el cuádruple mutante nga la señal de FUL se extendía hasta el extremo apical del gineceo (fig. 86 B). Por el contrario, en fondo 35S::NGA3 la señal se detectaba a niveles mucho más bajos y, únicamente, en una

estrecha franja correspondiente a las valvas, cuyo tamaño estaba reducido en la línea de sobreexpresión (fig. 86 C). Durante el estadio 12, en plantas silvestres (fig. 86 D), FUL se expresa en las valvas y en la parte interna del estilo, no detectándose señal en la zona del margen de la valva, de modo que es posible la aparición de una zona sin expresión de FUL entre las valvas y el estilo. Por el contrario, en el cuádruple mutante *nga* (fig. 86 E) no existe esta separación, sino que la expresión de FUL en este dominio es continua a lo largo de todo el gineceo. En fondo 35S::*NGA3* la separación entre estos dos dominios de expresión es mayor, y los niveles de expresión mucho menores (fig. 86 F). Durante el estadio 13 de desarrollo se siguen observando las mismas diferencias en el patrón de expresión entre gineceos silvestres y mutantes, pero cuando comparamos la expresión de FUL en fondo silvestre (fig. 86 G) y 35S::*NGA3* (fig. 86 H), tanto en el estadio 12 como en el 13, se puede apreciar una reducción significativa del nivel de expresión en el estilo y en las valvas de los frutos 35S::*NGA3*.

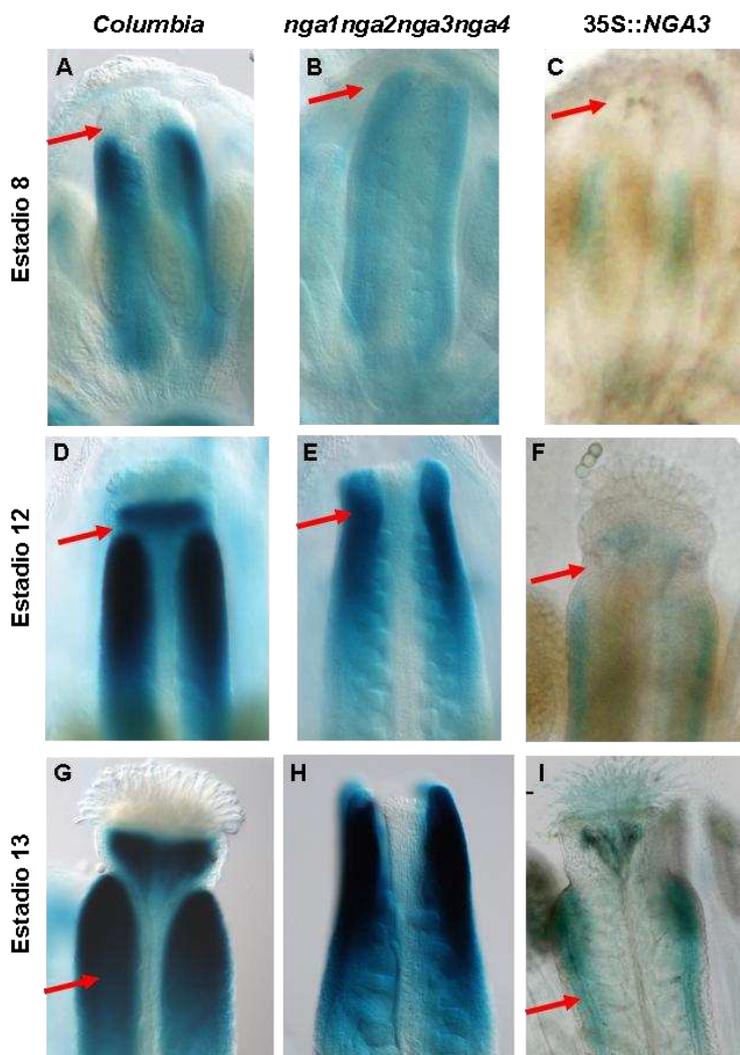


Figura 86. Patrón de expresión de FUL en fondo 35S::*NGA3* y en el cuádruple mutante *nga*. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de FUL en inflorescencias silvestres (A, D y G), del cuádruple mutante *nga* (B, E y H) y la línea 35S::*NGA3* (C, F e I). (A, B, C) Gineceos en estadio 8 de (A) plantas silvestres, se podía observar la falta de señal en la zona apical del mismo (flecha roja), (B) el cuádruple mutante *nga*, se detectaba señal también en la parte apical (flecha roja), y (C) la línea 35S::*NGA3*, se observaba una reducción significativa de la señal en las valvas. (D, E, F) Gineceos en estadio 12: (D) plantas silvestres, se observaba una separación entre la señal de valva y estilo (flecha roja), (E) cuádruple mutante *nga*, la señal era continua (flecha roja) y (F) 35S::*NGA3*, esta separación era mayor. (G, H, I) Gineceos en estadio 13: (G) plantas silvestres, se señala la señal en la valva, (H) cuádruple mutante *nga* y (I) línea 35S::*NGA3*, donde la señal en la valva estaba muy reducida.

De las modificaciones en el patrón de expresión de FUL observadas en diferentes fondos se podía concluir que si no se expresaban los genes NGA la expresión de FUL se expandía, mientras que si se sobreexpresaban la expresión de FUL se reducía, sugiriendo un posible papel de los genes NGA en la represión de FUL.

En segundo lugar se estudió la posible regulación de los genes que dirigen la formación del margen de la valva por los genes NGA.

Se empezó analizando la posibilidad de que NGA activara a IND. IND es un factor de transcripción tipo bHLH (basic helix-loop-helix). Se trata de un factor clave para el control de la especificación de la zona de dehiscencia (Liljegren et al., 2004).

Para ello se estudió el patrón de expresión de la línea marcadora $IND_{PRO}::GUS$ en fondo $35S::NGA3$. En este fondo se detectaba señal en estadios muy tempranos del desarrollo del gineceo (fig. 87 D), estadios en los que no se observaba señal de IND en fondo silvestre (fig. 87 A). En plantas silvestres era a partir del estadio 13 cuando empezaba a detectarse débilmente en la zona del margen de la valva (fig. 87 B). En estadios donde se detectaba señal tanto en fondo silvestre como en fondo $35S::NGA3$ se observaba como en la línea de sobreexpresión la señal se expandía hacia la valva. Esta expansión se hacía mucho más evidente en el estadio 17, en el que el fruto estaba completamente elongado y se detectaba señal en toda la valva (fig. 87 F, G), mientras que en frutos silvestres la expresión de IND estaba restringida al margen de la valva (fig. 87 C). Por tanto, la sobreexpresión de NGA3 conllevaba la desregulación de IND, que empezaba a expresarse ya en estadios tempranos del desarrollo del gineceo y en estadios más avanzados, se ampliaba el dominio de expresión del mismo llegando a extenderse en toda la superficie de la valva.

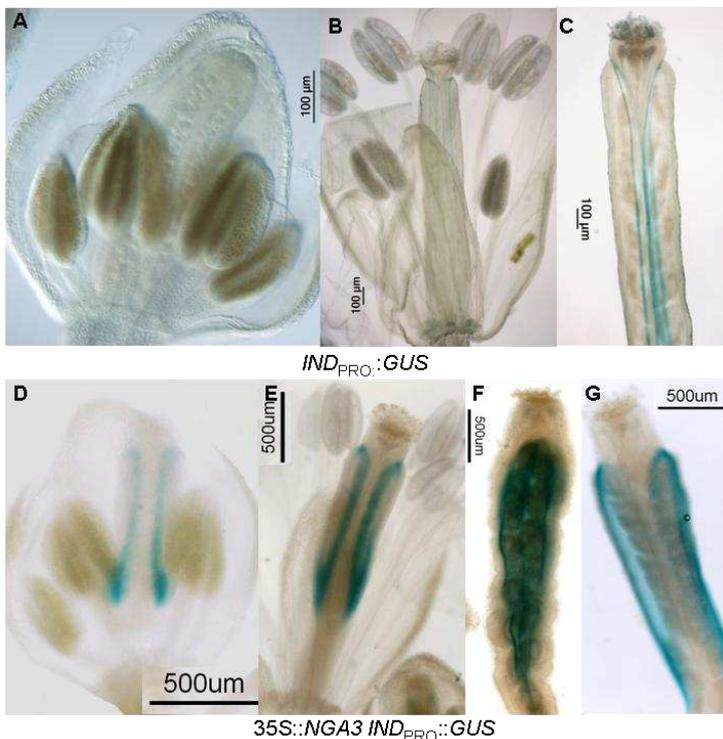


Figura 87. Patrón de expresión de IND en fondo $35S::NGA3$.

Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de IND en inflorescencias silvestres y $35S::NGA3$. Gineceo en estadio 8: (A) plantas silvestres, en este estadio no se detectaba expresión de IND, (D) en fondo $35S::NGA3$, se detectaba señal en la zona que dará lugar al margen de la valva. Gineceo en estadio 14: (B) plantas silvestres, la señal era débil en la zona del margen de la valva, (E) $35S::NGA3$, expansión de la señal. Fruto en estadio 17: (C) plantas silvestres, se detectaba señal en la zona de dehiscencia, (F y G) $35S::NGA3$, IND se expresaba en toda la superficie de la valva.

Por último se analizó la posible interacción entre los genes NGA y SHP. Los genes SHP codifican factores de transcripción de tipo MADS-box. Estos genes son necesarios para la diferenciación de la capa de lignificación y separación del margen de la valva donde activan la expresión de los genes ALC e IND (Liljegren et al., 2000; Liljegren et al., 2004).

En este caso se estudió el patrón de expresión de las líneas marcadoras $SHP1_{PRO}::GUS$ y $SHP2_{PRO}::GUS$ en fondo $35S::NGA3$. En el caso de la línea marcadora para el gen SHP1, en fondo silvestre se detectaba señal ya en estadios tempranos del desarrollo del gineceo. Así, durante el estadio 8 se detectaba en la zona apical del mismo y en la zona medial (fig. 88 A). En estadio 12 (fig. 88 B), la señal se observaba en la zona apical, concretamente en estilo y estigma, en el margen de la valva, en los óvulos y en los nectarios. Durante el estadio 13 (fig. 88 C), la señal en el estilo no se

detectaba pero seguía expresándose en el estigma, así como en el margen de la valva, óvulos y nectarios. Cuando el fruto estaba totalmente elongado (fig. 88 D), la señal quedaba restringida a la zona de dehiscencia y a las semillas. Al comparar con gineceos en el mismo estadio del desarrollo, en fondo 35S::NGA3 se observaron cambios en la distribución de la señal. En estadio 8 (fig. 88 E), la señal se expandía, tanto en la zona apical donde se extendía ligeramente hacia la zona basal como en la zona medial. En estadio 12 (fig. 88 F), al igual que ocurre en fondo silvestre, se detectaba en estilo y estigma, en el margen de la valva, óvulos y nectarios. En estadio 13 (fig. 88 G), la señal se observaba débilmente en el estilo y con mayor intensidad en el margen de la valva, óvulos y nectarios. En estos dos últimos estadios era complicado poder afirmar que tenga lugar una expansión de la señal en la zona del margen de la valva ya que la señal en óvulos era tan intensa que no permitía poder diferenciar con exactitud dicha zona. Pero al observar frutos completamente elongados (fig. 88 H e I) se detectaba la señal en toda la superficie de la valva.

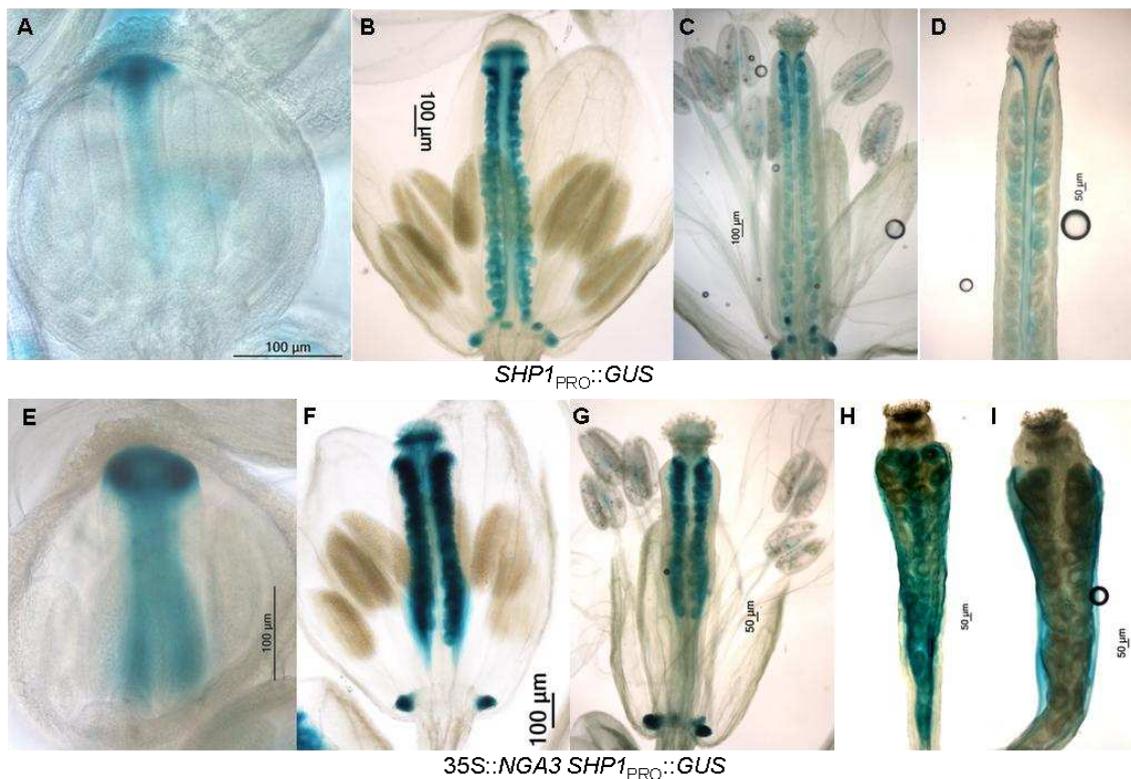


Figura 88. Patrón de expresión de *SHP1* en fondo 35S::NGA3. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *SHP1* en inflorescencias silvestres y 35S::NGA3. Gineceo en estadio 8: (A) plantas silvestres y (E) línea 35S::NGA3, se detectaba la expansión de la señal en la zona apical y medial del gineceo. Gineceo en estadio 12: (B) plantas silvestres, la señal se podía observar en los tejidos apicales, margen de la valva, óvulos y nectarios, (F) línea 35S::NGA3, la señal se detectaba en las mismas zonas que en plantas silvestres. Gineceo en estadio 13: (C) plantas silvestres y (G) línea 35S::NGA3. Fruto en estadio 17: (D) plantas silvestre, *SHP1* se expresaba en la zona de dehiscencia y semillas, (H e I) línea 35S::NGA3, la señal se detectaba en toda la superficie de la valva.

SHP2 tiene un patrón de expresión prácticamente idéntico al de *SHP1*. Así pues, *SHP2* en fondo silvestre se expresaba desde estadios muy tempranos del desarrollo del gineceo. En estadio 8 (fig. 89 A), se detectaba en la zona apical del mismo y en la zona medial, en estadio 10 (fig. 89 B), la señal se observaba en la parte apical, en la zona de dehiscencia, en los primordios de óvulos y, débilmente, en los nectarios. Durante el estadio 12 (fig. 89 C), la señal seguía detectándose en las mismas regiones, aunque la señal en la zona apical se hacía más débil. Ya en el estadio 13 (fig. 89 D) seguía

expresándose en estilo y estigma, así como en la zona de dehiscencia, óvulos y nectarios. Cuando el fruto estaba totalmente elongado (fig. 89 E) la señal quedaba restringida a la zona de dehiscencia. Al comparar con gineceos en el mismo estadio del desarrollo en fondo 35S::NGA3 se observaron cambios en la distribución de la señal similares a los observados para SHP1. En estadio 8 (fig. 89 F), la señal se expandía a casi la totalidad del gineceo, siendo más intensa en las zonas apicales y mediales. En estadio 10 (fig. 89 G), al igual que ocurre en fondo silvestre, se detectaba en la zona apical del gineceo, primordios de óvulos, nectarios y de forma considerablemente más intensa y expandida en la zona que dará lugar al margen de la valva. En gineceos en estadio 12 (fig. 89 H), la señal se detectaba en estilo y estigma, en la valva, óvulos y en nectarios. En estadio 13 (fig. 89 I), la señal en estigma no se detectaba pero sí en el estilo, en toda la superficie de la valva, óvulos y nectarios. En frutos completamente elongados (fig. 89 J,K), a diferencia de lo observado en plantas silvestres, se detectaba la señal en toda la superficie de la valva.

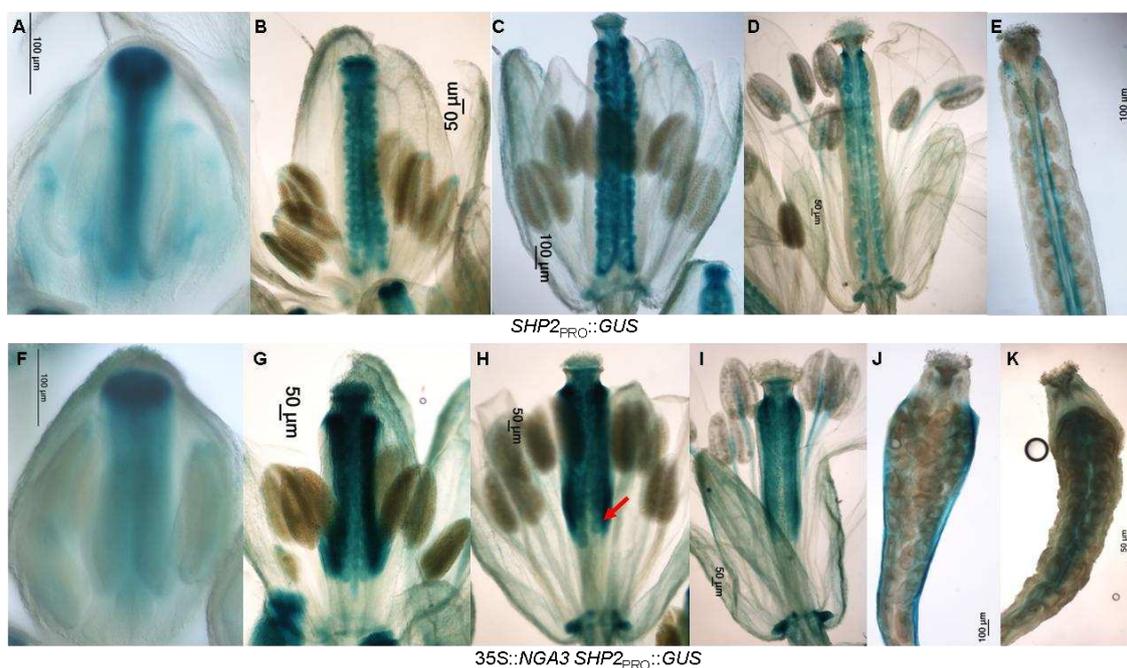


Figura 89. Patrón de expresión de *SHP2* en fondo 35S::NGA3. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de *SHP1* en inflorescencias silvestres y 35S::NGA3. Gineceo en estadio 8: (A) plantas silvestres y (F) línea 35S::NGA3, se observaba la expansión de la señal en la región medial. Gineceo en estadio 10: (B) plantas silvestres, la señal se podía observar en los tejidos apicales, margen de la valva, óvulos y más débilmente en nectarios (G) línea 35S::NGA3, la señal en el margen de la valva se expandía. Gineceo en estadio 12: (C) plantas silvestres, (H) línea 35S::NGA3, se detectaba señal en prácticamente la totalidad de la valva. Gineceo en estadio 13: (D) plantas silvestres y (I) línea 35S::NGA3. Fruto en estadio 17: (E) plantas silvestres, la señal se observaba en la zona de dehiscencia (J-K) línea 35S::NGA, la señal se detectaba en toda la superficie de la valva.

Los resultados de este análisis son compatibles con una posible activación de SHP por NGA. Así, la sobreexpresión de NGA daría lugar a la sobreexpresión de SHP y consecuentemente a la de IND y ALC. Por ello, a continuación se quiso comprobar si al sobreexpresar NGA también se sobreexpresaba ALC. ALC codifica un factor de transcripción tipo bHLH y junto con IND especifica la diferenciación de la capa de separación del margen de la valva (Rajani y Sundaresan, 2001; Liljegren et al., 2004).

En este caso se analizó el patrón de expresión de la línea marcadora para el gen ALC en fondo 35S::NGA3. El gen ALC se expresaba desde estadios muy tempranos del desarrollo del gineceo. En estadio 8 (fig. 90 A), se expresaba débilmente en estilo,

nectarios y en la zona central del gineceo. En estadio 13 (fig. 90 B), se detectaba claramente en estigma, nectarios, en primordios de óvulos y de manera difusa a lo largo de todo el margen de la valva. La señal se intensificaba en estadio 14 (fig. 90 C), observándose con mayor nitidez las zonas de expresión de ALC. En estadio 15 (fig. 90 D) y 17 (fig. 90 E), la señal en el estigma no se detectaba, quedando restringida al margen de la valva, óvulos y nectarios. En fondo 35S::NGA3 la señal era diferente a lo largo de todos estos estadios. En estadio 8 (fig. 90 F), se extendía por todo el gineceo. En estadio 13 (fig. 90 G), la señal se detectaba en estigma, nectarios y primordios de óvulos, al igual que ocurre en fondo silvestre, pero a diferencia de en el fondo silvestre se extendía por la superficie de la valva. En estadio 14 (fig. 90 H), la única diferencia seguía detectándose en la valva en la que la zona de detección de la señal era más extensa. En estadios posteriores, es decir, estadio 15 (fig. 90 I) y 17 (fig. 90 J) se seguía observando una expansión de la señal en la valva, mucho más evidente en la zona basal de la misma.

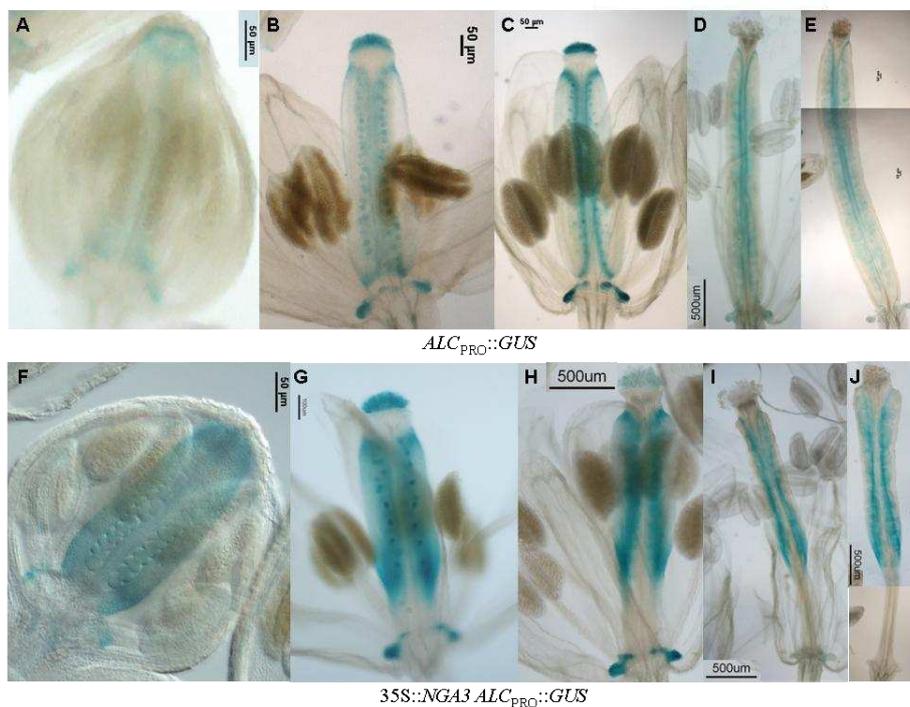


Figura 90. Patrón de expresión de ALC en fondo 35S::NGA3. Detección histoquímica de actividad GUS dirigida por el promotor de ALC en inflorescencias silvestres y 35S::NGA3. Gineceo en estadio 8-9 de (A) plantas silvestres, se podía observar una señal débil en estilo, nectarios y zona central del gineceo, y (F) la línea 35S::NGA3, donde la señal se expresaba en todo el gineceo. Gineceo en estadio 13: (B) plantas silvestres, se detectaba señal en estigma, nectarios, en primordios de óvulos y en el margen de la valva, (G) línea 35S::NGA3, la señal se extendía por toda la superficie de la valva. Gineceo en estadio 14: (C) fondo silvestre y (H) línea 35S::NGA3. Gineceo en estadio 15: (D) plantas silvestres, la señal se detectaba en el margen de la valva, óvulos y nectarios y (I) línea 35S::NGA3, se observaba la expansión de la señal en el margen de la valva. Fruto en estadio 17: (E) plantas silvestres y (J) línea 35S::NGA3.

En resumen, en la línea de sobreexpresión de NGA3 se producía un cambio en el patrón de expresión tanto de FUL, como de SHP, IND y ALC. Estos resultados apoyaban la primera hipótesis que se planteó, es decir, que los genes NGA podrían actuar regulando negativamente la expresión de FUL. Por tanto, la desregulación de SHP, IND y ALC sería consecuencia de la desregulación de FUL. Sin embargo, los resultados obtenidos también eran compatibles con la activación de SHP por los genes NGA y con la cuarta hipótesis planteada, según la cual NGA interaccionaría con el

complejo FIL/JAG/YAB3 favoreciendo la activación de SHP frente a la de FUL. Esta hipótesis era sustentada por varios resultados:

1. La similitud de fenotipos entre la línea de sobreexpresión del gen *NGA3* y el mutante *ful-2* únicamente se observaba en el fruto. El resto de la morfología de las plantas *35S::NGA3* era totalmente diferente a la del mutante *ful*.

2. En un estudio de doble híbrido de levadura realizado en el laboratorio se comprobó que tanto *NGA1* como *NGA3* interaccionaban con *YAB3*.

Con el fin de obtener más datos que permitieran descartar o confirmar alguna de las hipótesis planteadas se decidió estudiar que ocurría si se sobreexpresaban los genes *NGA* en diferentes fondos mutantes.

En primer lugar, se caracterizó la mutación *ind* en fondo *35S::NGA3* (fig. 91). En las líneas obtenidas los frutos perdían parte del fenotipo *35S::NGA3*, ya que la longitud de las valvas era mayor, es más, crecían por encima del estilo formándose una especie de hombros (fig. 91 B-C), y el replum no presentaba esa forma en zig-zag presente en los frutos *35S::NGA3* (fig. 91 D-E). Estas líneas al igual que la línea parental *ind-2* eran indehiscentes, debido a que no se diferencia la zona de dehiscencia (fig. 91 B).

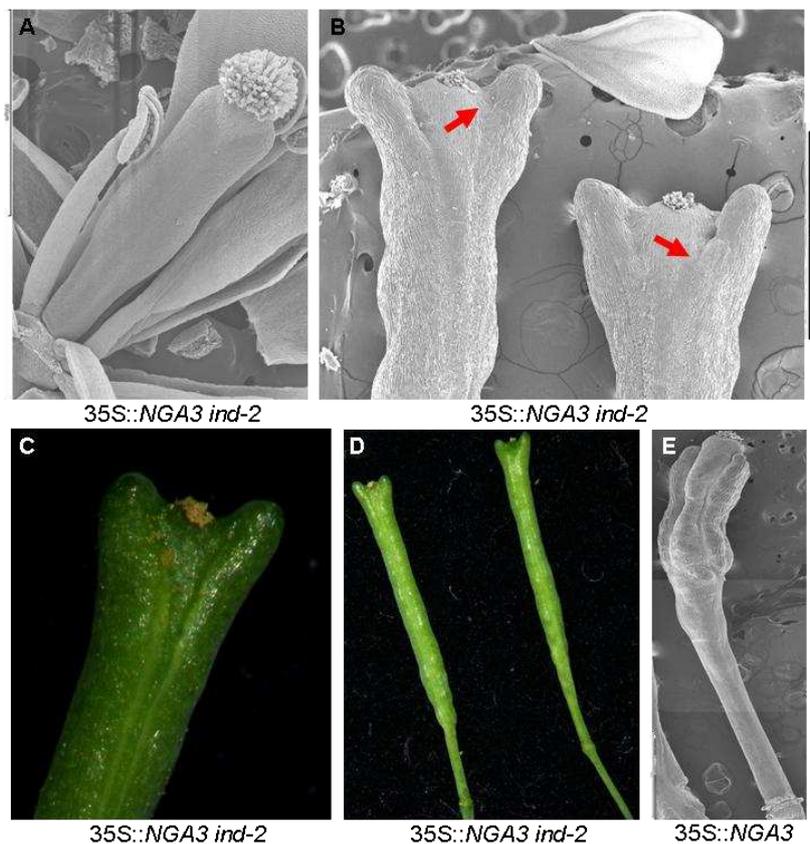


Figura 91. Caracterización fenotípica de la línea *35S::NGA3 ind-2*. (A-D) Línea *35S::NGA3 ind-2*. (A) Fotografía al microscopio electrónico de barrido de una flor en antesis. Detalle de la zona apical de frutos completamente alargados (estadio 17) tomada al (B) microscopio electrónico de barrido y (C) a la lupa, se puede observar la falta de diferenciación de la zona de dehiscencia (flecha roja) y el mayor crecimiento de las valvas. (D) Fotografía a la lupa de frutos en estadio 17. (E) Línea *35S::NGA3*. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de un fruto en estadio 17.

A continuación, se analizó el fenotipo de la línea *35S::NGA3 shp1 shp2* (fig. 92). Estas líneas eran indehiscentes al igual que el doble mutante *shp1 shp2* (fig. 92 A-B) debido a la falta de diferenciación de la zona de dehiscencia (fig. 92 D-H) pero además

se revertía en parte el fenotipo de sobreexpresión de NGA3. Al igual que ocurría en la línea ind-2 35S::NGA3 el replum no presentaba el característico zig-zag (fig. 92 I) observado en la línea de sobreexpresión de NGA3 (fig. 92 J) y la longitud de las valvas era mayor, sobresaliendo ligeramente por encima del estilo (fig. 92 D, F-G).

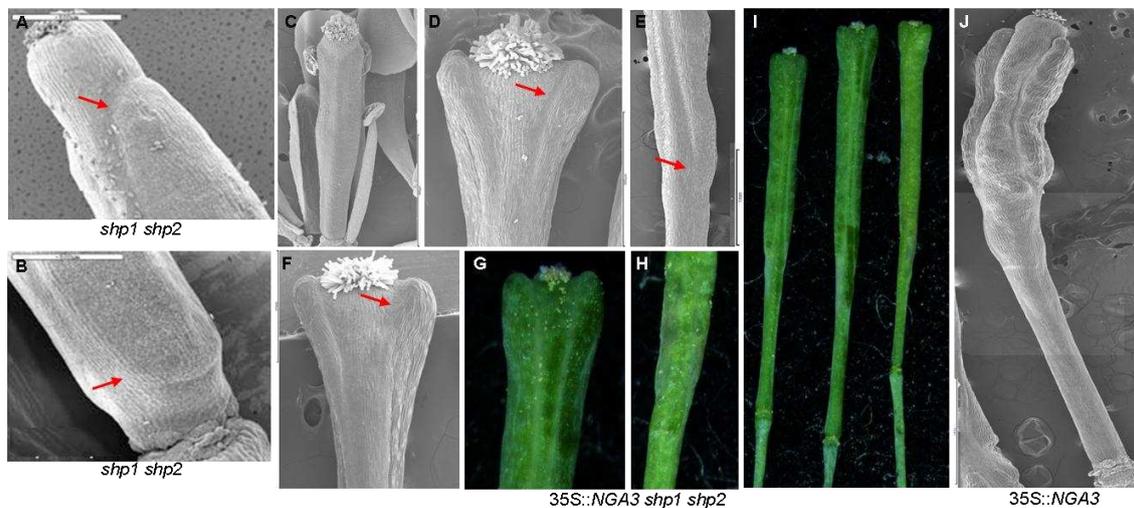


Figura 92. Caracterización fenotípica de la línea 35S::NGA3 *shp1 shp2*. (A-B) Mutante *shp1 shp2*. Fotografía al microscopio electrónico de barrido (A) de la zona apical y (B) basal del fruto totalmente elongado (estadio 17). (C-I) Línea 35S::NGA3 *shp1 shp2*. (C) Fotografía al microscopio electrónico de barrido de una flor en antesis. (D, F-G) Fotografías de la zona apical de frutos en estadio 17, al microscopio electrónico de barrido y a la lupa. (E y H) Detalle de la zona basal de las valvas. (I) Fotografía a la lupa de frutos en estadio 17. (J) Línea 35S::NGA3, fotografía al microscopio electrónico de barrido de un fruto en estadio 17. Las flechas rojas señalan la zona de dehiscencia.

Los fenotipos observados no esclarecían cual de las hipótesis podría ser la correcta. Así la reversión parcial del fenotipo de la línea 35S::NGA3 en fondo ind o shp podía explicarse si NGA fuera un represor de FUL, ya que al eliminar la expresión de genes como SHP o IND se suprimía parcialmente el fenotipo de la línea 35S::NGA3, al igual que sucede con el fenotipo ful en las combinaciones ful shp1 shp2 o ful ind (Liljegren et al., 2004).

Sin embargo, la reversión del fenotipo 35S::NGA3 en fondo shp1 shp2 era mayor que la del fenotipo ful en el triple mutante ful shp1 shp2. Por ello, además de por la represión de FUL, el fenotipo observado en las líneas 35S::NGA3 ind-2 y 35S::NGA3 shp1 shp2 también podría explicarse si NGA, además de reprimir a FUL, activara directamente a SHP, un escenario más compatible con la hipótesis más compleja que implicaría la interacción de los genes NGA con el complejo FIL/JAG/YAB3 favoreciendo la activación de SHP frente a la de FUL.

Con el objetivo de intentar esclarecer si los genes NGA estarían formando parte de este complejo se sobreexpresó el gen NGA3 en fondo yab3. Los frutos del mutante yab3 no presentan ninguna diferencia con respecto a los de plantas silvestres. Así mismos, los frutos de las plantas 35S::NGA3 yab3 eran morfológicamente muy similares a los de la línea de sobreexpresión 35S::NGA3, es decir, presentaban un ginóforo largo, ovario reducido y replum en zig-zag (fig. 93).

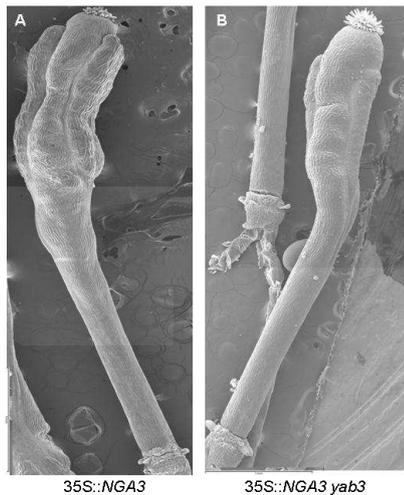


Figura 93. Caracterización fenotípica de la línea 35S::NGA3 yab3. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de frutos en estadio 17 de la línea (A) 35S::NGA3 y (B) 35S::NGA3 yab3.

Por tanto, la pérdida de actividad de YAB3 no conllevaba ningún cambio en el fenotipo de la línea de sobreexpresión, lo cual indicaba que, o bien NGA no necesitaba a YAB3 para activar a SHP y reprimir a FUL y, por tanto, habría que descartar la hipótesis de la formación de un posible complejo FIL/JAG/YAB3/NGA que estaría activando a SHP, o que la falta de actividad de YAB3 podría ser compensada por la actividad de FIL y JAG, siendo posible que únicamente reduciendo los niveles de expresión de los tres genes se observe un cambio en el fenotipo. En cualquier caso, sería necesario seguir trabajando para esclarecer si alguna de las hipótesis planteadas es correcta.

Discusión

1. Caracterización de los genes *NGA*.

1.1. Los genes *NGA* codifican proteínas de la superfamilia B3 de *Arabidopsis*.

Los genes *NGA* pertenecen a la subfamilia de genes *NGATHA* incluida dentro de la familia *RAV*, formada por 13 genes. Esta subfamilia, constituida por cuatro genes (*NGA1-4*), se caracteriza por carecer del dominio de unión a DNA tipo AP2, característico de los miembros de la familia *RAV*. Los cuatro genes *NGA* tienen una organización común, con un dominio de unión a DNA tipo B3 en posición N-terminal y tres cortos motivos conservados en la mitad C-terminal. La similitud de secuencia es alta a lo largo del dominio B3, pero también se extiende al resto de la proteína, siendo más alta entre *NGA1/NGA2* y *NGA3/NGA4*.

En un trabajo sobre la caracterización molecular de *RAV1* se muestra que la unión a DNA se produce de modo cooperativo mediante el dominio B3 y el AP2, que por separado se unen con baja afinidad (Kagaya et al., 1999; Okamuro et al., 1997). Eso hace pensar en la posibilidad de que los genes *NGA*, con un solo dominio B3, podrían “necesitar” dominios de unión a DNA adicionales, como por ejemplo uno de tipo AP2, para aumentar su afinidad al DNA, que podrían ser reclutados mediante interacciones proteína-proteína.

De los tres motivos conservados en las proteínas *NGA*, el primero no lo comparte con ninguna otra proteína de *Arabidopsis*, siendo así específico de esta subfamilia. El segundo motivo incluye el dominio EAR-like característico de la superfamilia de genes B3, por lo cual se ha denominado dominio represor B3 (BRD, “B3 repression domain”), siendo la secuencia consenso de este dominio RLFGV (Ikeda y Ohme-Takagi, 2009). La existencia de este dominio podría indicar un posible papel de los genes *NGA* como represores transcripcionales. La actividad de represores transcripcionales está implicada en muchos procesos del desarrollo de plantas, incluyendo formación de órganos y señalización hormonal. Claros ejemplos los tenemos en los genes *AUX/IAA*, que son reguladores de la respuesta a auxinas (Tiwari et al., 2004), o en los genes *TEM1* y *TEM2* (*RAV2*), que regulan el tiempo de floración (Castillejo y Pelaz, 2008), y que poseen un dominio represor. También otros tres miembros de la familia B3, concretamente tres miembros de la subfamilia *VAL* incluida dentro de la familia *LAV*, tienen dominios de represión tipo BRD (Suzuki et al., 2007; Tsukagoshi et al., 2005; Ikeda y Ohme-Takagi, 2009). Estos miembros de la subfamilia *VAL* parece que ejercen un papel represor en los programas de desarrollo del embrión, probablemente mediante la regulación negativa de los genes *ABI3* y *FUS3*, estrechamente emparentados con los genes *VAL* y que se encuentran sobreexpresados en los mutantes *val1 val2* (Suzuki et al., 2007; Tsukagoshi et al., 2007). Por último, el tercer motivo se encuentra, además de en los genes *NGA*, en otras tres proteínas de *Arabidopsis*, todas ellas de función desconocida y por lo demás poco relacionadas a nivel de secuencia, concretamente las proteínas Q9LM73 (supuesta proteína F-box, At1g20800), Q9LRZ4 (probable fosfatasa 2C 41, At3g16800) y Q9SX93 (supuesta purina permeasa 19, At1g47603).

Recientemente, se ha descrito un clado muy próximo al de los genes *NGA*, constituido por tres genes que también carecen del dominio AP2 (Swaminathan et al., 2008) y a los que se ha denominado *NGA-like* (Alvarez et al., 2009). Los genes *NGA-like* también poseen el dominio represor BRD pero no comparten con los genes *NGA* ninguno de los otros dos motivos conservados (el motivo 1 y 3). Alvarez et al. (2009) observaron que el fenotipo de la línea de sobreexpresión de *NGA-like1* era similar al de

la sobreexpresión de *NGA1*, sugiriendo que quizás ambos genes tengan dianas comunes, aunque esta posibilidad todavía no ha sido explorada en profundidad.

1.2. Caracterización funcional de los alelos *nga1-4* y *nga2-2*.

En este trabajo, hemos abordado la caracterización funcional de los genes *NGA* mediante el estudio de mutantes de pérdida de función así como líneas de expresión constitutiva. El alelo *nga1-4*, alelo con el que se ha realizado este trabajo, posee un T-DNA insertado 13 pb por detrás de la 3'UTR más larga disponible en las bases de datos de ESTs. A pesar de que la inserción no se encuentra en la región codificante ni en las regiones genómicas aguas arriba de ésta, que deben contener los elementos reguladores de su expresión, en el alelo *nga1-4* se produce una disminución de aproximadamente un 23% en el nivel de expresión del gen con respecto a una planta silvestre. Esta reducción es suficiente para que se puedan observar defectos sutiles en el desarrollo de la zona apical del gineceo, similares a los que mostraban los mutantes de los otros genes de la familia. La reducción en los niveles de transcrito sugiere que en la región genómica 3', donde se localiza el T-DNA podría existir alguna secuencia reguladora necesaria para la correcta expresión de *NGA1*.

Sería interesante estudiar el papel de la región 3' genómica en la regulación de la expresión de *NGA1* mediante el análisis de deleciones de la misma. De hecho, si se comparan las secuencias genómicas adyacentes de *NGA1* y *NGA2* se encuentran varias regiones no codificantes conservadas (fig. 94). Es interesante destacar que se han descrito varios ejemplos en la literatura donde se demuestra que los dominios conservados en regiones genómicas no codificantes en general contienen elementos reguladores de la transcripción (como por ejemplo AG y CRC), y por tanto, podríamos esperar que en el caso de *NGA1* y *NGA2*, la secuencias genómicas en 3' de ambos genes fueran importantes para su regulación.

Sequence1 *NGA1*: 1-1487

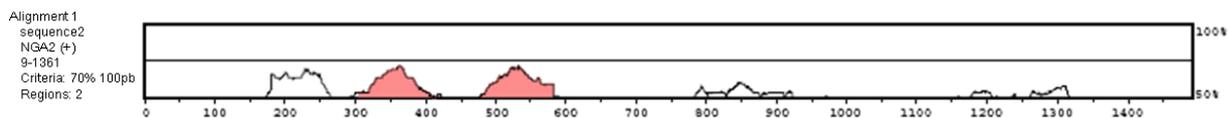


Figura 94. Alineamiento de la región 3' genómica de los genes *NGA1* y *NGA2*. Comparación de aproximadamente 1500pb de las región genómica en posición 3' de *NGA1* con la de *NGA2*, se pueden apreciar dos regiones con una alta homología de secuencia (igual o superior al 70%) (señaladas en rosa). La coordenada cero se sitúa 150pb por debajo del STOP de *NGA1*.

Si se compara el fenotipo del mutante *nga1-4*, que es un alelo presumiblemente, muy débil, con el del mutante *nga1-1* (Alvarez et al., 2009), se puede apreciar como los defectos observados en la zona apical del gineceo de *nga1-1* son mucho más severos. Así pues, en el mutante *nga1-4* (fig 95 B) se observaba un estilo ligeramente más largo y en ocasiones un crecimiento desigual de las valvas mientras que en el caso del mutante *nga1-1* (fig 95 A) se puede observar una reducción del tejido estigmático y ocasionalmente el estilo abierto.

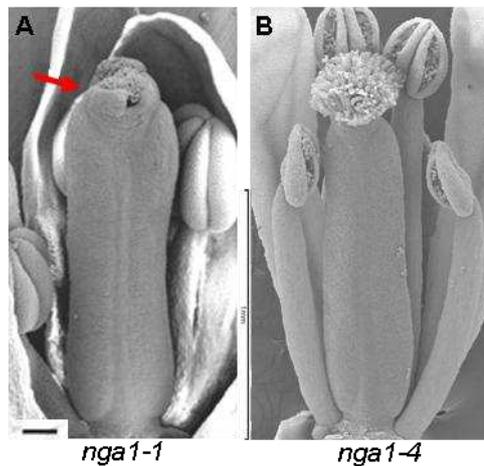


Figura 95. Comparación de fenotipos de los mutantes *nga1-1* y *nga1-4*. Microscopia de barrido del mutante (A) *nga1-1*, presenta defectos en la fusión del estilo (Alvarez *et al.*, 2009) y (B) *nga1-4*, los defectos son prácticamente inapreciables.

El alelo *nga2-2* contiene un dSpm en la posición 570 de la región codificante que impide la transcripción del ARNm completo, pero, sin embargo, permite la transcripción de la región anterior a la inserción. Podríamos esperar que en las plantas *nga2-2* se tradujera una proteína truncada que podría o no ser funcionalmente activa. Esta proteína incluiría el dominio B3 pero no los tres motivos conservados de la familia NGA localizados en posición C-terminal. Es posible que los motivos conservados sean esenciales para la función del gen, aunque para averiguarlo serían necesarios varios experimentos adicionales, incluyendo un estudio de delección de los diferentes motivos.

1.3. Redundancia funcional de los genes *NGA* en el desarrollo de los tejidos apicales del gineceo.

En los mutantes sencillos *nga1-4* y *nga2-2* los defectos en la morfología del carpelo eran sutiles o inapreciables, algo similar a lo que ocurría con el mutante *nga4-3*, previamente caracterizado en el laboratorio. Únicamente cuando los frutos eran observados a grandes aumentos se podía apreciar que mostraban un mayor crecimiento del estilo y en ocasiones un crecimiento desigual de las valvas. Previamente se había demostrado la redundancia funcional de *NGA3* y *NGA4* (Trigueros, 2008), por lo que el débil fenotipo observado en estos mutantes podía ser debido no sólo a la naturaleza débil de los alelos correspondientes, sino también a su redundancia funcional con el resto de genes de la familia. Para comprobar si esto era así se generaron toda una serie de combinaciones de mutantes, y se pudo observar que conforme se aumentaba el número de mutaciones se producía una reducción progresiva en la formación del estilo y estigma, hasta desaparecer totalmente en algunos triples mutantes y el cuádruple mutante. Por el contrario, en estos triples mutantes y el cuádruple mutante, el resto de tejidos del gineceo estaban presentes, lo cual indicaban que los genes *NGA* estaban implicados principalmente en la formación de la zona apical del gineceo.

Los fenotipos más severos en dobles y triples mutantes siempre estaban asociados a la presencia del alelo *nga3-3*. Una explicación probable ha este hecho es que este alelo de lugar a una proteína truncada que, en este caso, podría hacer que este alelo se comportara como un alelo antimorfo, lo que impediría, al menos en parte, que las proteínas codificadas por los otros genes de la familia pudieran realizar su función, y que el fenotipo que viéramos fuera más similar al del cuádruple mutante (Trigueros, 2008). Esta idea también se apoya en el débil fenotipo que muestra el mutante *nga3-1*

obtenido por Alvarez et al. (2009), en el que únicamente se puede apreciar un estilo ligeramente más largo que el de plantas silvestres, y que probablemente corresponde a un alelo nulo ya que contiene una inserción de T-DNA al inicio del dominio B3. En el caso de *nga2-2* también se genera una proteína truncada, pero sin embargo, no parece ser funcionalmente activa, ya que el fenotipo observado es similar al de un mutante nulo *nga2-1* (Alvarez et al., 2009). Es difícil especular cual es la razón de que ambas proteínas truncadas se comporten de un modo diferente, aunque quizás la diferencia radique en que en el mutante *nga3-3* no se transcribe el dominio B3 completo.

Mientras en nuestro caso los fenotipos más fuertes se observaban cuando estaba implicado el alelo *nga3-3*, Alvarez et al. (2009) observan fenotipos más fuertes en combinaciones de mutantes en los que se elimina la expresión de *NGA1*, algo que era de esperar ya que este es el gen de la familia con un nivel de expresión más elevado en inflorescencias silvestres. Estas diferencias radican, como ya se ha comentado antes, en la naturaleza de los alelos *nga1* y *nga3* con los que se ha trabajado. Así pues, Alvarez et al., (2009) apenas observan defectos en el doble mutante *nga3-1 nga4-1* (fig. 96 A) mientras que en el doble mutante *nga1-1 nga3-1* se aprecian defectos importantes en la fusión del estilo y una reducción significativa de las papilas estigmáticas. Cuando se comparan esos dobles mutantes con los obtenidos en el laboratorio (Fig. 96 B y D) se puede observar como, en nuestro caso, *nga1-4 nga3-3* y *nga3-3 nga4-3* muestran prácticamente el mismo fenotipo, con defectos en la fusión del estilo y reducción del tejido estigmático, debido a la presencia del alelo *nga3-3*. El fenotipo de los frutos del triple mutante *nga2 nga3 nga4* (fig. 96 E-F) y del cuádruple mutante (fig. 96 G-H) obtenidos en el laboratorio de Yuval Eshed y los descritos en esta tesis son muy similares, con independencia de los alelos utilizados.

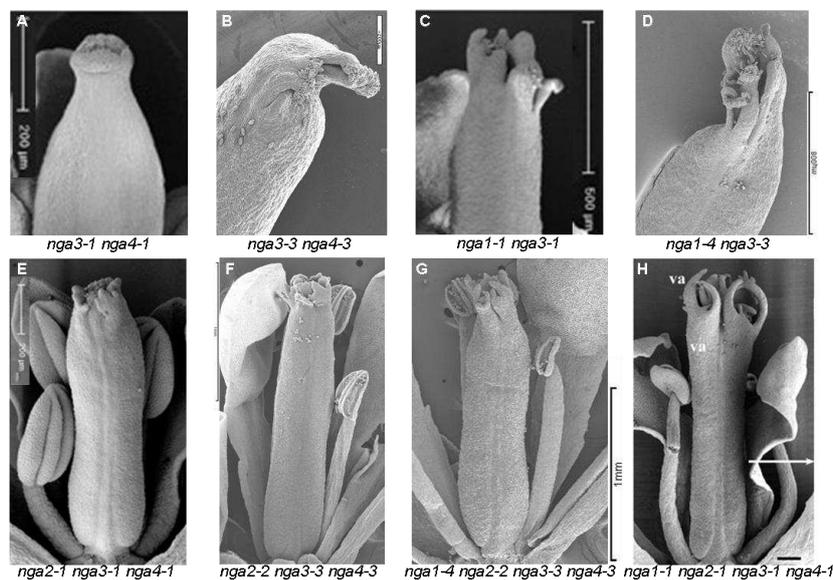


Figura 96. Comparación fenotípica de distintas combinaciones de mutantes *nga* en función de los alelos utilizados. (A) *nga3-1 nga4-1* (Alvarez et al., 2009), (B) *nga3-3 nga4-3*, mientras el mutante mostrado en A apenas muestra defectos en la morfología del gineceo en el fruto mostrado en B se pueden observar defectos en la fusión del estilo así como un crecimiento desigual de las valvas. (C) *nga1-1 nga3-1* (Alvarez et al., 2009), (D) *nga1-4 nga3-3*, en ambas líneas se observa una reducción del estigma y defectos en la fusión del estilo. (E) *nga2-1 nga3-1 nga4-1* (Alvarez et al., 2009), (F) *nga2-2 nga3-3 nga4-3*, en ambas líneas la zona apical aparece muy afectada apareciendo ocasionalmente células del estilo y estigma. (G) *nga1-1 nga2-1 nga3-1 nga4-1* (Alvarez et al., 2009) y (H) *nga1-4 nga2-2 nga3-3 nga4-3*, los gineceos de ambas líneas carecen de estilo y estigma apareciendo el gineceo abierto por la parte apical.

El fenotipo del estilo del cuádruple mutante *nga* había sido previamente descrito en un artículo en el que se utilizaban los genes *NGA* como dianas de un amiRNA específico, para apoyar el uso de los amiRNAs en estudios funcionales (Alvarez et al., 2006). Alvarez et al. (2009) observan que el cuádruple mutante y la línea amiR-*NGA* presentan el mismo fenotipo. Ambas líneas muestran hojas más anchas y aserradas así como más pequeñas que las de plantas silvestres. Las flores tienen los órganos florales reducidos y en el gineceo en lugar del estilo y estigma se forman proyecciones con morfología de valva. Este fenotipo coincide con el de la línea amiR-*NGA* obtenida en nuestro laboratorio. Sin embargo, el fenotipo del cuádruple mutante *nga1-4 nga2-2 nga3-3 nga4-3* muestra algunas diferencias. Las hojas, a pesar de ser aserradas, son del mismo tamaño que las de plantas silvestres y las flores no muestran órganos florales más cortos. Estas diferencias con respecto a la línea amiR-*NGA* probablemente sean debidas a la naturaleza débil del alelo *nga1-4* caracterizado en nuestro laboratorio, y sugieren que el requerimiento de *NGA* en la morfogénesis del carpelo es mayor que en la morfogénesis de otros órganos laterales, puesto que esta actividad residual del alelo *nga1-4* es suficiente para generar órganos laterales menos afectados.

Mediante la caracterización fenotípica del fruto en diferentes combinaciones de mutantes y en la línea amiR-*NGA* se puede comprobar como la actividad de los cuatro genes *NGA* es necesaria para la correcta formación del estilo y estigma en el gineceo. Por tanto, actúan redundantemente en la organización del gineceo de *Arabidopsis* y además esta redundancia es dependiente de dosis, ya que, mientras los mutantes sencillos no muestran defectos o son defectos sutiles en la morfología del carpelo, combinaciones mutantes de mayor orden muestran un aumento significativo de los defectos en el desarrollo de la región apical del gineceo. El incremento gradual en el número de genes de la familia *NGA* comprometidos se correlaciona fuertemente con una disminución progresiva en la formación del tejido estigmático y estilar, así como una reducción en la fusión del carpelo. El hecho de que los mutantes sencillos muestren un fenotipo sutil pero evidente en la morfología del gineceo indica que el tipo de redundancia existente entre los genes de la familia *NGA* es parcial, ya que si fuera completa los mutantes sencillos no mostrarían defectos (Briggs et al., 2006). Ejemplos de estos dos tipos de redundancia son la mostrada por los genes *SHI/STY* (Kuusk et al., 2006) que presentan una redundancia parcial y los genes *SHP* (Liljegren et al., 2000) cuya redundancia es completa.

1.4. Patrón de expresión de *NGA1* y *NGA2*.

Para ambos genes se analizó el patrón de expresión espacio-temporal en inflorescencias tempranas de plantas silvestres, mediante hibridación “in situ” del ARNm y la generación de líneas transgénicas reporteras tanto para *NGA1* como para *NGA2*. En estas líneas se incluyó la región genómica 3', ya que en el mutante *nga1-4* parecía tener alguna función en la regulación del nivel de expresión del gen.

Ambos genes se expresaban en zonas de crecimiento o proliferación celular como son hojas jóvenes, meristemos florales y primordios de sépalos, pétalos, estambres y carpelo.

Durante la fase reproductiva y concretamente durante la formación del gineceo, la expresión de ambos genes se veía modificada conforme avanzaba en el desarrollo, quedando restringida, a partir del estadio 11 del desarrollo floral, a ciertos tejidos del dominio medial, concretamente a la placenta, estilo y primordios de óvulos. Aunque el patrón de expresión de *NGA1* y *NGA2* era muy similar, la señal en todos los estadios del desarrollo era más débil en el caso de *NGA2*.

NGA1 y NGA2 presentan patrones de expresión casi idénticos a los de NGA3 y NGA4, con la diferencia de que para estos dos genes en estadio 11 también se detectaba señal en el estigma.

Si comparamos el patrón de expresión de los genes NGA con los sitios de producción o acumulación de auxina libre durante el desarrollo floral podemos observar ciertas coincidencias. Aloni et al. (2006) describieron los cambios en los sitios de producción de auxina libre que se producían a lo largo del desarrollo floral (fig 97 A). Estos autores indican que las auxinas se empiezan a sintetizar en la zona apical de cada primordio de órgano. Cuando la concentración de auxinas disminuye en los sépalos, quedando limitada a la zona apical de los mismos, los estambres y carpelo empiezan a producir dicha hormona (estadio 6 al 8 del desarrollo floral) (fig 97 A a-b). A continuación, tiene lugar una disminución en la producción de auxinas en los estambres como consecuencia de una incipiente producción de las mismas en el estigma y los pétalos en desarrollo (estadio 9 al 10) (fig. 97 A c). Cuando el estigma está completamente desarrollado se detecta una alta producción de auxinas en este tejido, y una baja producción en los óvulos, nectarios, zona apical de los pétalos y los filamentos de los estambres (estadio 12) (fig. 97 Ad). Finalmente, y una vez se ha producido la germinación de los granos de polen cesa la producción de auxinas libre en el tejido estigmático y empieza en la zona apical del estilo. Por el contrario, la producción de auxinas es elevada en las semillas y nectarios (estadio 15) (fig. 97 Ae).

Si ahora analizamos el patrón de expresión de los genes NGA (fig 97 B) se puede observar como durante los primeros estadios de desarrollo floral los genes NGA se expresan en la zona apical de primordios de órganos, tal como sépalos, estambres o carpelo (fig. 97 B a-b), coincidiendo con el punto donde estos autores indican que comienzan a sintetizarse auxinas. A continuación, la expresión en estambres disminuye, al igual que lo hace la producción de auxinas, y la expresión en el carpelo queda restringida a la zona apical del mismo y la placenta. También se expresan en primordios de pétalos (fig. 97 A c y B c). En el resto de estadios las zonas donde se expresan los genes NGA coinciden con las zonas de máxima producción de auxinas, como pétalos, zona apical del gineceo y primordios de óvulos, aunque también se detectaba expresión de NGA en otras regiones donde no se acumula tanta auxina libre, como sépalos o placenta (fig 97 A d-e y B d-e).

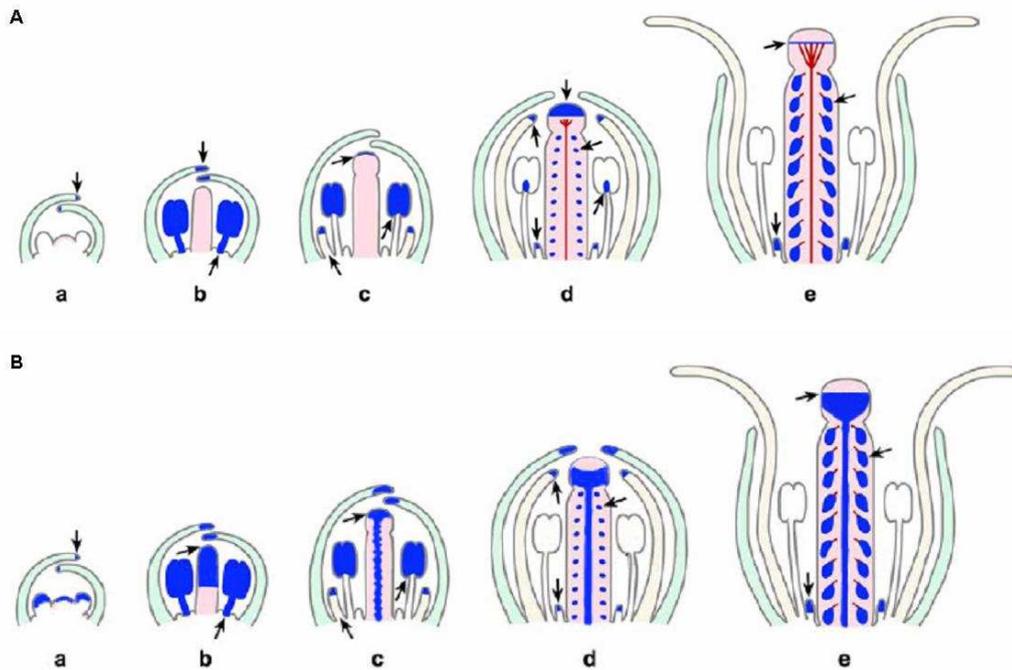


Figura 97. Comparación entre los sitios de máxima producción de auxina libre y de expresión de los genes *NGA* durante el desarrollo floral. (A) Diagrama de los cambios en los sitios de producción y concentración de auxina libre durante el desarrollo floral (detectado por expresión DR5:GUS). En azul se señala la zona donde se acumula la auxina libre y en rojo los haces vasculares. **(a)** Yema floral, se inicia la producción de auxina libre en el extremo distal de sépalos. **(b)** Producción de auxina libre en sépalos y gran producción de la misma en estambres. **(c)** Disminuye la producción de auxinas en los estambres y se inicia la producción de auxinas en pétalos y estigma. **(d)** Gran producción de auxinas en estigma, y menor en óvulos y nectarios. **(e)** Sigue sintetizándose algo en el estigma, pero la mayor producción de auxinas se detecta en las semillas, en nectarios la producción continúa. **(B)** Diagrama del patrón de expresión de los genes *NGA* durante el desarrollo floral (basado en resultados de hibridación “in situ” y actividad GUS). En azul se señala las zonas donde se expresan los genes *NGA*. **(a)** Yema floral, se expresa en el extremo distal de sépalos y primordios de estambres y carpelos. **(b)** La señal se detecta en extremo distal de sépalos, mitad apical del gineceo y en estambres. **(c)** Los genes *NGA* se expresan en estambres, extremo distal de pétalos y sépalos y en la zona apical y la placenta del gineceo. **(d)** Además de en las regiones anteriores se empiezan a expresar en los primordios de óvulos. **(e)** La expresión queda restringida al fruto, concretamente a los óvulos, placenta y estilo. Modificado de Aloni *et al.*, 2006.

Como se puede observar en la figura anterior los genes *NGA* se expresan en todos los órganos florales. Sin embargo, el cuádruple mutante *nga* generado en el laboratorio no presenta cambios evidentes en los órganos florales, a excepción del gineceo. Únicamente en la línea *amiR-NGA* sí se puede apreciar como sépalos, pétalos y estambres presentan modificaciones con respecto a los de plantas silvestres, probablemente como consecuencia de que en esta línea los niveles de expresión de los cuatro genes sea inferior a los del cuádruple mutante *nga*. El cuádruple mutante obtenido en el laboratorio de Yuval Eshed sí presenta órganos florales reducidos (Alvarez *et al.*, 2009), pero este fenotipo no se observa en ningún triple mutante, probablemente como consecuencia de la redundancia funcional existente entre los cuatro miembros de la familia, redundancia funcional que en este caso sería completa, ya que únicamente cuando se ve comprometido el nivel de expresión de los cuatro genes es cuando se puede apreciar un fenotipo evidente en sépalos, pétalos y estambres.

Durante el desarrollo floral el patrón de expresión de los genes *NGA* es muy similar, mientras que durante la fase vegetativa de la planta presentan algunas diferencias, variando también entre la parte aérea y la parte terrestre.

En la raíz NGA2 se expresa en la zona de elongación, que es la responsable del crecimiento en longitud de la misma, mientras que NGA1 o bien no se expresa en este tejido o bien no se detecta expresión. De los cuatro genes de la familia, NGA3 muestra un patrón de expresión en raíz similar al de NGA2, detectándose señal en la zona de elongación de la raíz principal, aunque en raíces secundarias también se expresa en la zona meristemática y en la vasculatura.

La expresión de NGA2 y NGA3 en raíz contrasta con la ausencia de defectos evidentes en el desarrollo de la misma en los mutantes nga, lo cual puede ser debido a que la redundancia funcional de los miembros de la familia NGA enmascara posibles alteraciones en la raíz. Únicamente en el cuádruple mutante nga1-4 nga2-2 nga3-3 nga4-3 se han podido apreciar defectos sutiles en el desarrollo de la raíz. Concretamente esta línea presenta un aumento significativo en el número de raíces laterales así como una alteración del gravitropismo. Es muy probable que los genes NGA tengan alguna función en la raíz, tal y como sugiere su interacción con el gen BRX, un gen implicado en el crecimiento de la misma (Mouchel et al., 2004). El gen BRX fue descubierto tras un estudio realizado por Mouchel et al. (2004) sobre como la variabilidad genética natural de distintos ecotipos silvestres de *Arabidopsis* afectaba a la morfología del sistema radicular. Así se comprobó que el ecotipo Umkirch-1 (Uk-1) presentaba una raíz principal significativamente más corta que el resto, como consecuencia de una mutación en el gen BRX, pero no mostraba ningún otro fenotipo en el resto de la planta. La mutación brx-uk no causa un fenotipo tan evidente en otros fondos genéticos, siendo menos severo en fondo Columbia (Beuchat et al., 2010). Puede que algo similar esté ocurriendo con los genes NGA, y que únicamente en determinados fondos genéticos fuera posible observar un fenotipo evidente en raíz de los mutantes nga.

En cotiledones el patrón de expresión de NGA1 y NGA2 era diferente, ya que, aunque ambos se expresaban en haces vasculares, NGA2 también se expresaba en la capa de células en empalizada situada bajo la epidermis adaxial, coincidiendo con la expresión de NGA3.

En primordios de hojas, NGA1 y NGA2 se expresaban en el extremo distal de las mismas mientras que conforme se desarrollan la señal pasaba a detectarse en hidatodos y tricomas (fig. 100 B). Por otra parte, si analizamos los sitios de acumulación de auxinas durante el desarrollo foliar, se puede comprobar como en un primer momento el extremo distal del primordio de la hoja en desarrollo funciona como sumidero de auxinas (Reinhard et al., 2003) lo que hace que se genere un máximo local en el extremo distal del primordio en desarrollo (Benkova et al., 2003, fig. 100 Ab), mientras que conforme se desarrolla la hoja el extremo distal pasa de ser sumidero a ser fuente de auxinas, y la principal síntesis de auxinas pasa a tener lugar en los hidatodos (Aloni et al., 2003, fig. 100 Ac). Los sitios de producción secundaria de auxina libre se encuentran en la lámina del primordio de hoja, tanto en mesófilo como en epidermis (tricomas) (Aloni et al., 2003) (fig. 100 Ad). Por tanto, si se comparan ambos patrones se puede observar un alto grado de solapamiento, coincidiendo los sitios de expresión de los genes NGA con los de acumulación de auxina libre durante el desarrollo de la hoja.

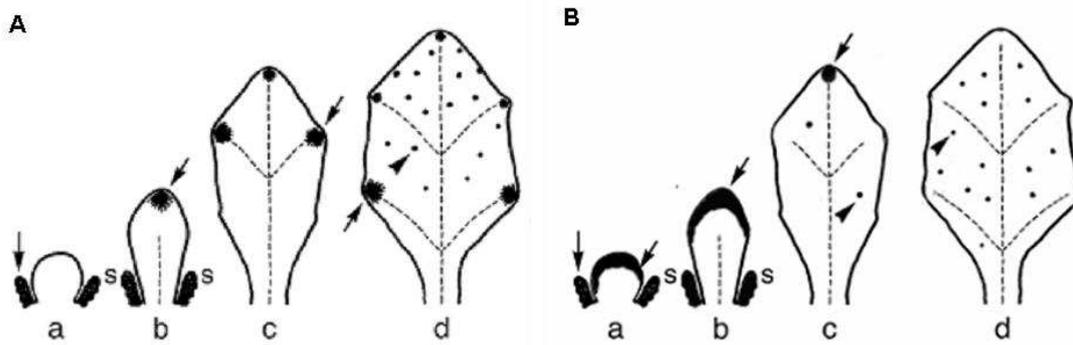


Figura 98. Comparación entre los sitios de máxima producción de auxina libre y de expresión de los genes *NGA* durante el desarrollo del primordio foliar. (A) Diagrama de los cambios en los sitios de producción y concentración de auxina libre durante el desarrollo del primordio foliar (detectado por expresión DR5:GUS). Los puntos negros indican la zona donde se acumula la auxina libre. Las flechas señalan los sitios con una mayor producción de auxinas (a-e). Las puntas de flecha muestran la localización de los sitios producción secundaria de auxinas (d-e). (a) Las auxinas empiezan a producirse en altas cantidades en las estípulas (s). (b) La producción primaria de auxinas tiene lugar en la parte apical del primordio. (c) Elevada producción de auxinas en los hidatodos superiores. (d) Producción primaria de auxinas en los hidatodos más bajos y producción secundaria en la lámina de la hoja. (B) Diagrama del patrón de expresión de los genes *NGA* durante el desarrollo del primordio foliar (basado en resultados de actividad GUS). En negro se señala las zonas donde se expresan los genes *NGA*. Las flechas señalan las zonas de expresión. (a) La señal se detecta en la mitad apical del primordio. (b) Los genes *NGA* se expresan en la parte apical del primordio. (c) Se expresan en hidatodos y en tricomas (punta de fecha). (d) La señal se detecta en tricomas. Modificado de Aloni *et al.*, 2003.

Como se ha podido comprobar, el patrón de expresión de *NGA* en las distintas partes de la planta coincide, en general, con zona de máxima concentración de auxinas, bien por síntesis o por acumulación de las mismas. Por tanto, los genes *NGA* podrían estar implicados en las rutas de biosíntesis o transporte de auxinas.

1.5. Localización subcelular de las proteínas *NGA1* y *NGA2*.

Las proteínas *NGA1* y *NGA2* se localizaban tanto en el núcleo como en el citoplasma. La localización nuclear de las proteínas *NGA1* y *NGA2* puede ser debida a la presencia de secuencias aminoacídicas que indican una señal de localización nuclear (NLS, "Nuclear Localization Signal"). Cuando se realiza la búsqueda de NLSs en las secuencias de *NGA1* y *NGA2* se encuentran dos secuencias peptídicas candidatas de señales de localización al núcleo, concretamente las secuencias *RRRP* y *RRPK*, situadas en el caso de *NGA1* en las posiciones 137 y 138, respectivamente, y en el caso de la proteína *NGA2* en las posiciones 125 y 126 (fig. 99).

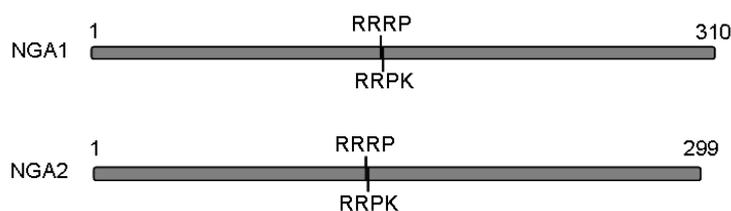


Figura 99. Esquema de las proteínas *NGA1* y *NGA2*. En el esquema se representan diferentes predicciones de secuencias de localización nuclear tanto para *NGA1* como para *NGA2*.

Si revisamos en la literatura se puede observar como son muchos los factores de transcripción que son regulados por un transporte citoplasmático-nuclear. Así pues, estos factores se pueden localizar en el núcleo, citoplasma o en ambos compartimentos. Cada vez se conoce un mayor número de factores de transcripción cuyas proteínas se acumulan en el citoplasma y únicamente se transportan al núcleo en respuesta a un estímulo específico. Este hecho ha llevado a que se realizaran diferentes trabajos enfocados en averiguar los mecanismos que controlan la entrada de proteínas al núcleo. Por ejemplo, las proteínas KNOX de arroz muestran patrones de localización citoplasmática y nuclear; además estos patrones cambian con tratamientos hormonales. Así, la aplicación de giberelinas o auxinas hace que las proteínas no se localicen en el núcleo (Kuijt et al., 2004).

Por tanto, no es tan excepcional que las proteínas NGA1 y NGA2, a pesar de codificar presuntos factores de transcripción, también se acumulen en el citoplasma. En este trabajo no se han llevado a cabo estudios encaminados a dilucidar cuáles podrían ser los mecanismos de regulación de localización subcelular de los factores NGA. Sin embargo, cuando se han llevado a cabo estudios de interacción proteína-proteína mediante ensayo BiFC, los complejos formados únicamente se localizan en el núcleo, excepto en el caso de la interacción con CRC, que también se localizan en el citoplasma, sugiriendo así que las interacciones proteicas podrían ser importantes para la determinación de la localización subcelular de NGA.

1.6. Efecto de la sobreexpresión de *NGA* en la morfología del fruto.

Al igual que los mutantes de pérdida de función, las líneas de sobreexpresión ponen de manifiesto la posible implicación de los genes NGA en la distribución de tejidos a lo largo del eje apical-basal del gineceo, ya que la sobreexpresión de los genes NGA también conllevaba cambios en la distribución de dichos tejidos.

Así pues, la sobreexpresión de NGA1, al igual que la de NGA3 (Trigueros et al., 2009) conllevaba un mayor desarrollo de la zona basal (ginóforo) del gineceo y una reducción de la zona medial (ovario). El fenotipo de la línea 35S:NGA1 era similar al de la línea 2 de 35S:NGA3 (pMT17.2) (Trigueros, 2008), pero era más débil que el observado en la línea pMT17.1 (Trigueros et al., 2009). Sin embargo, en un trabajo previo al desarrollo de esta tesis se obtuvieron líneas transgénicas en las que se expresaban los genes NGA1, 3 y 4, bajo el control de un doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en un vector pBin19, todas ellas con fenotipos en fruto muy similares (fig. 100) (Trigueros et al., 2009; Ferrándiz C. resultados no publicados). Estas líneas mostraban fenotipos mucho más severos a los observados en las líneas de sobreexpresión tanto de NGA1 como de NGA3 cuando se utilizaron vectores del tipo pGreen. En las líneas derivadas de pBIN19 los frutos presentaban un fenotipo similar al del mutante *ful*, pero en generaciones sucesivas el fenotipo se atenuaba rápidamente. Este fenómeno de atenuamiento parece asociado al silenciamiento génico de los transgenes. Por ello se generaron nuevas líneas de sobreexpresión utilizando el vector pGreen con el que se reduce la incidencia del silenciamiento génico, ya que no se suelen producir inserciones en tándem y en la mayoría de los casos ocurren en un solo locus (Hellens et al., 2000). Estas líneas, a pesar de mostrar fenotipos más débiles, parecen más estables, ya que el fenotipo observado se mantiene en generaciones sucesivas. Una posible explicación es que las líneas con fenotipos estables podrían tener un nivel de sobreexpresión del gen no muy elevado, por ello sería interesante llevar a cabo una qRT-PCR que nos permitiera cuantificar el nivel de expresión del gen NGA1 en las líneas 35S::NGA1 obtenidas y

analizar si existe una correlación entre los niveles de expresión, el fenotipo observado y la estabilidad del mismo.



Figura 100. Fenotipo del fruto causado por la sobreexpresión de los genes *NGA*. Morfología del fruto de las diferentes líneas de sobreexpresión para cada uno de los genes *NGA* bajo el control de un doble promotor 35S. Fotografía modificada de Trigueros *et al.*, 2009.

La similitud de fenotipo entre las líneas de sobreexpresión sugiere que los cuatro genes codifican proteínas con actividades semejantes y que las diferencias sutiles entre los fenotipos de algunos mutantes sencillos podrían estar más bien relacionadas con las pequeñas diferencias en sus patrones de expresión.

Otro tipo de conclusiones que podrían extraerse de las líneas transgénicas obtenidas serían acerca de la actividad transcripcional de los factores *NGA*. Cuando se compara el fenotipo de la línea de sobreexpresión de *NGA1* con el de las líneas 35S:*NGA1*::VP16 se pueden observar varias diferencias. En primer lugar, el tamaño del fruto de la línea 35S:*NGA1*::VP16 es mucho menor al de la línea 35S:*NGA1*, sobre todo en el caso de la línea 2. En segundo lugar, presentan un menor crecimiento de las valvas, es decir, una disminución del tamaño del ovario, con mayor desarrollo de las regiones basal (ginóforo) y apical (estigma), aunque, en general, las alteraciones fenotípicas en ambas líneas afectan a la morfogénesis del gineceo en el mismo sentido.

Así pues, nuestras observaciones sugerían que *NGA1* podría comportarse como un activador transcripcional, ya que la sobreexpresión de *NGA1* y la expresión de la proteína quimérica *NGA1*::VP16 dan lugar a fenotipos similares, aunque con un número de líneas tan reducido, el potencial de este análisis es bastante limitado. Serían necesarias muchas más líneas para extraer unas conclusiones fiables.

De hecho, recientemente se ha descrito que la superfamilia de genes B3, a la que pertenecen los genes *NGA*, posee un dominio represor EAR-like característico de la misma y al que se ha denominado dominio represor B3 (BRD, “B3 repression domain”), cuya secuencia consenso es RLFGV (Ikeda y Ohme-Takagi, 2009). Se asume que los factores de transcripción que poseen este motivo son represores transcripcionales, aunque este punto todavía ha de ser validarlo experimentalmente. En animales, se ha comprobado la bifuncionalidad de los factores de transcripción, los cuales pueden actuar como activadores o represores transcripcionales, dependiendo del contexto molecular (interactores, modificaciones posttraduccionales, etc) o los genes diana (Adkin *et al.*, 2006). En plantas, el factor de transcripción WRKY53 actúa como un activador o represor transcripcional dependiendo de la secuencia cercana a la W-box (Miao *et al.*, 2004). Es posible que el gen *NGA1* actúe como un activador o represor transcripcional dependiendo de donde se exprese y con que proteínas interaccione. Por otro lado, algunos trabajos publicados (Ohta *et al.*, 2001) indican que en el caso de tratarse de un dominio represor potente el efecto del dominio VP16 podría quedar enmascarado y la proteína de fusión se comportaría como un represor, por lo que se debería, a ser posible, eliminar el dominio represor de la construcción *NGA*::VP16 y

comparar su actividad con la de la proteína quimérica ya generada para intentar esclarecer este punto.

2. El papel de los genes *NGA* en las rutas de señalización hormonal.

Los genes *NGA* se expresan en zonas asociadas a altos niveles de auxinas. Además, la pérdida o ganancia de función de estos genes recuerda, en parte, a la de genes implicados en rutas de biosíntesis o señalización por auxinas. En general, los fenotipos asociados a la pérdida de función *NGA* recordaban a los producidos por la menor síntesis de auxinas o la menor sensibilidad a las mismas, como ocurre en los mutantes *axr* y *aux*, que son insensibles a la auxina presente, o *yuc*, cuyo fenotipo es debido a una disminución en la síntesis (Timpte et al., 1995; Hobbie et al., 2000; Cheng et al., 2007), mientras que los fenotipos de las líneas de sobreexpresión de *NGA* recordaban a los producidos por sobreproducción de auxinas, como los de la línea de sobreexpresión de *YUC* (Woodward et al., 2005; Kim et al., 2007). Todo ello hizo que se llevaran a cabo toda una serie de experimentos orientados al estudio de una posible participación de los genes *NGA* en la síntesis o señalización de auxinas.

En primer lugar se observó que el cuádruple mutante *nga* y la línea *amiR-NGA* mostraban respuesta a auxinas clásicas, como la dominancia apical, gravitropismo o el número de raíces laterales, notablemente alteradas. Además, el desarrollo vascular en el gineceo de los mutantes *nga* estaba reducido.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de NPA a inflorescencias de mutantes *nga* sugerían que el fenotipo de las líneas mutantes no era consecuencia de una reducción de auxinas en la región apical, ya que la posible acumulación de éstas como consecuencia del bloqueo del PAT no rescataba el fenotipo del cuádruple mutante *nga*. Hipótesis alternativas eran que este efecto pudiera deberse a una menor sensibilidad de los mutantes *nga* a las auxinas o a que no hubiera auxinas en la zona apical del gineceo de los mutantes *nga*, de modo que eso haría que no se acumularan al inhibir el transporte.

El hecho de que las líneas *NGA3_{PRO}::iaaL* imitaran los fenotipos de los dobles mutantes *nga1 nga3* y *nga1 nga2* en el gineceo y que la aplicación directa de auxinas en el extremo apical del gineceo revertiera, al menos parcialmente, el fenotipo de la línea *amiR-NGA*, permitían descartar la posibilidad de que los fenotipos observados fueran debidos a una menor sensibilidad de los mutantes a las auxinas presentes, apoyando la idea de que los defectos en la fusión del estilo causados por la pérdida de función de los genes *NGA* eran causados por una falta total de auxinas en el extremo apical del gineceo. Algunos autores hacen referencia a que la acumulación de auxinas en la zona apical del gineceo es consecuencia de una síntesis directa de auxinas en este dominio (Aloni et al., 2006), de modo que una posible explicación sería que los mutantes *nga* podrían tener afectada la ruta de biosíntesis de auxinas en esta zona. Por ello, se estudió un posible cambio en el patrón de expresión de genes implicados en la biosíntesis de esta hormona, concretamente de los genes *YUC4* y *YUC2* pertenecientes a la familia *YUCCA* (*YUC*) y que son los dos únicos miembros de la familia con expresión fuerte en el extremo apical del gineceo (Cheng et al., 2006). Los genes que constituyen esta familia codifican enzimas clave en la ruta de biosíntesis de auxinas y además se expresan en la parte apical del gineceo solapando con el dominio de expresión de los genes *NGA* (Cheng et al., 2006). Por tanto, si estos genes fueran los responsables de la síntesis de auxinas en el extremo apical del gineceo, la falta de expresión de los mismos debería suponer la desaparición de la fuente de auxinas. En este trabajo se ha podido observar que la pérdida de actividad *NGA* conlleva la falta de expresión de los genes

YUC2 y YUC4 en esta zona. Por tanto, los datos obtenidos hasta este momento sugieren que una de las funciones principales de los genes *NGA* en el desarrollo del pistilo es la de inducir la biosíntesis de auxinas en el extremo apical del gineceo a través de la regulación de la expresión de los genes *YUC*, y que estos serían los responsables directos de dicha síntesis. Así, en el cuádruple mutante *nga* no se expresarían los genes *YUC* en el extremo apical del gineceo, se eliminaría la síntesis de auxinas en este dominio y esto podría explicar la ausencia de cambios en los mutante *nga* tras la aplicación de NPA.

Las auxinas parecen estar estrechamente relacionadas con brasinoesteroides, ya que ambas hormonas están implicadas en el control de determinados procesos del desarrollo. Este hecho fue confirmado con la caracterización del gen *BRX*, para el que se ha descrito que actúa como nexo de unión entre la síntesis de brasinoesteroides y la señal de auxinas manteniendo los niveles necesarios de brasinoesteroides para permitir la acción adecuada de las auxinas (Mouchet et al., 2006). Parece que la acción conjunta de *BR* y auxinas es importante para el control de la elongación, pero parece que esta interacción quizás sea diferente en diferentes tejidos. Por otra parte, se han identificado genes de las familias *GH3*, *SAUR* y *AUX/IAA* como dianas comunes de la señalización por *BR* y auxinas (Goda et al., 2004; Nemhauser et al., 2004). Estos resultados sugieren que la interacción entre *BR* y auxinas es extensa y compleja. Un ejemplo más de esta interacción es el hecho de que *BRX* interactúe físicamente con *NGA1*, un gen que a partir de nuestros resultados parece implicado en la señalización por auxinas (Scacchi et al., 2009). En este trabajo, se sugiere que *BRX* regula la transcripción de genes como un coregulador transcripcional mediante su interacción física con factores de transcripción como *NGA1*. Sin embargo, aunque el papel de *NGA1* en el desarrollo de la raíz no se ha estudiado en detalle, es importante señalar que *NGA1* es un factor de transcripción con un dominio B3, el cual está también presente en la familia *ARF* de factores de transcripción. Por tanto, una posibilidad es que la familia de proteínas *BRX* y de factores transcripcionales *NGA* formaran una nueva pareja de factor transcripcional-coregulador, conceptualmente similar a la del complejo *AUX/IAA-ARF*, y que su actividad fuera también controlada por las auxinas (Scacchi et al., 2009).

3. El papel de los genes *NGA* en la morfogénesis a lo largo del eje apical-basal del gineceo.

3.1. *STY* y *NGA* son necesarios para la especificación del estilo.

La correcta formación de los tejidos apicales del fruto es esencial para la polinización y posterior fecundación de los óvulos. En el cuádruple mutante *nga* la parte apical del gineceo carece de los tejidos característicos del estilo y el estigma, y además se presenta con bordes irregulares y no fusionados. Los frutos del cuádruple mutante *nga* terminan en estructuras similares a horquillas en cuyos extremos en ocasiones aparecen células del estilo, aunque en muy pequeña proporción. Además se produce una reducción importante en la fertilidad del fruto, reflejada en el bajo número de semillas producidas y traducándose en un tamaño muy reducido de la silicua.

El fenotipo de los mutantes múltiples *nga* es muy similar al de otros mutantes múltiples en otra familia de factores de transcripción, la familia *SHI/STY* (Kuusk et al., 2002; 2004), cuyos mutantes múltiples presentan una disminución significativa del tejido estigmático y estilar y del tamaño del gineceo (Kuusk et al., 2006). Los paralelismos funcionales entre los factores *NGA* y *SHI/STY* son muy llamativos, ya que no únicamente los mutantes son muy similares fenotípicamente sino que el patrón de

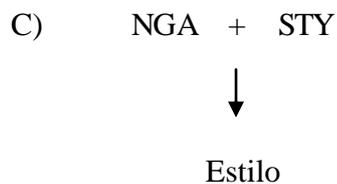
expresión de los genes SHI/STY también es muy parecido al de los genes NGA. El gen STY1, que posee un patrón de expresión representativo de la familia, se expresa en muchos tejidos a lo largo del desarrollo de la planta. En plántulas la señal se observa en el hipocotilo, cotiledones y en primordios de hojas y raíz. En hojas en desarrollo se expresa en la parte apical del margen de la hoja y en hidatodos. En el gineceo, la señal se detecta en estilo y estigma desde el estadio 6 del desarrollo floral hasta antesis y además también se expresa en óvulos jóvenes (Kuusk et al., 2002). Los genes de esta familia son redundantes funcionalmente y esta redundancia, al igual que en la familia NGA, es dependiente de dosis. Todo ello sugiere una relación funcional importante entre ambas familias.

Una hipótesis sencilla que podría explicar la redundancia funcional entre ambas familias era que existiera una regulación directa entre ambos factores y que ello diera lugar a la formación del tejido estilar:



Sin embargo, cuando se estudia el patrón de expresión de las líneas STY1_{PRO}::GUS en fondo mutante nga y en líneas de sobreexpresión de NGA3, y de las líneas NGA3_{PRO}::GUS en fondo mutante styl-1 sty2-1 (Trigueros, 2008), no se apreciaron cambios en los mismos. Por otra parte, la sobreexpresión de NGA3 no rescataba el fenotipo del mutante styl-1 sty2-1 ni la de STY1 el fenotipo de la línea amiR-NGA, respectivamente. Por tanto, ni STY ni NGA son capaces de dirigir la formación del estilo en ausencia de la expresión del otro.

Los experimentos descritos parecían descartar que los genes NGA regulasen la expresión de los genes SHI/STY y, así mismo, los genes SHI/STY no parecían regular a los genes NGA. Todo ello señalaba la posibilidad de que ambos factores actuaran conjuntamente para especificar los tejidos apicales del gineceo.



Cuando se cruzan las líneas 35S::STY1 y 35S::NGA3, el fenotipo de las líneas obtenidas cambia drásticamente respecto al de los parentales. Se trata de plantas de porte significativamente menor al de las parentales, con frutos muy pequeños en los que las proporciones relativas de los diferentes dominios funcionales parecen iguales a los de una planta silvestre. Cuando estos frutos son observados a grandes aumentos se puede apreciar que presentan un fenotipo muy llamativo, y es la aparición de células de la epidermis del estilo a lo largo de toda la superficie de la valva. Este cambio fenotípico únicamente se da en la epidermis de la valva, no ocurre en ningún otro tejido del fruto. Este fenotipo daba solidez a la posibilidad de que ambas proteínas actuaran conjuntamente para dirigir la especificación de las células del estilo.

La sobreexpresión de NGA o STY por separado tiene efectos, tanto en la morfología del carpelo como en la de la planta, distintos a los de la sobreexpresión conjunta. Podemos especular que esto sea debido a que el conjunto de sus dianas cuando actúan independientemente son diferentes a las que podría tener un hipotético complejo STY/NGA. Un caso similar es lo que ocurre con SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP), un factor de transcripción tipo MADS box. Durante la fase vegetativa altos niveles de expresión de este gen hacen que la planta no lleve a cabo la transición floral permaneciendo en estado vegetativo (Hartmann et al., 2000). En el momento en que empieza a expresarse AGL24, otro factor de transcripción tipo MADS box, ambos forman un heterodímero que cambia completamente de actividad, promoviendo ahora la transición floral (Yu et al., 2002; Michaels et al., 2003). Cuando la identidad del meristemo floral se ha establecido, los genes SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1), AGL24 y SVP forman un nuevo complejo proteico que ahora actúa promoviendo la activación de los genes de identidad floral de tipo B y C (Liu et al., 2009). Así se muestra como los factores de transcripción son reciclados para llevar a cabo funciones diferentes en función de los genes que se expresen en cada momento y de los diferentes complejos proteicos que puedan formar, reflejando así la complejidad de los procesos del desarrollo.

El hecho de que la formación ectópica de células del estilo sólo tuviera lugar en la epidermis de las valvas, sugería la posibilidad de que, para dirigir la formación de este tipo celular, fuera necesaria la presencia de factores adicionales que no estarían presentes en todo el gineceo, sino sólo en el dominio donde se producía la transformación observada. De entre todos los genes posibles nos decantamos por CRC porque se expresa en este dominio y además el mutante tiene defectos en la fusión del estilo. En primer lugar, se comprobó que CRC interaccionaba físicamente tanto con STY1 como con NGA1 y además, en presencia del mismo se observó que STY1 y NGA1, que por sí solos no interaccionan, eran capaces de hacerlo.

Mediante la obtención de las líneas 35S::NGA3 *crc-1*, 35S::STY1 *crc-1* y 35S::NGA3 35S::STY1 *crc-1*, se pretendió validar genéticamente la posibilidad de que el trímero formado por STY, CRC y NGA fuera el responsable de la correcta formación del estilo en el gineceo. Cuando se sobreexpresa NGA3 en un fondo mutante *crc* los fenotipos que se observaban eran aditivos, es decir, el estilo no se formaba correctamente y los frutos presentan, al igual que ocurre con la línea de sobreexpresión, un acortamiento de la valvas, ginóforo más largo y replum en zig-zag. La sobreexpresión de STY1 en fondo mutante *crc* daba lugar a frutos con defectos en la fusión de la zona apical del gineceo iguales a los del mutante *crc*. Por tanto, la sobreexpresión de NGA o STY no rescataba los defectos en el estilo del mutante *crc*.

La sobreexpresión conjunta de STY1 y NGA3 en fondo *crc* no revertía el fenotipo del mutante *crc*, lo cual parecía indicar que era necesaria la presencia de los tres factores para la correcta formación de la zona apical del gineceo. Pero el resultado más significativo y que nos indicó si en realidad NGA, STY y CRC actuaban conjuntamente para la especificación de las células del estilo, fue la morfología de la epidermis de la valva. Cuando se observaron las células de la epidermis de la valva se comprobó que presentaban la morfología característica de este tipo celular y no la de las células del estilo, como ocurría en la línea 35S::NGA3 35S::STY1. Es decir, la falta de actividad del gen CRC revertía el cambio de identidad de las células de la epidermis de la valva observado en la línea 35S::NGA3 35S::STY1, y además tampoco se reducía drásticamente la diferenciación de células de la epidermis del estilo en el extremo apical del gineceo.

Por tanto, parece que es necesaria la presencia de los tres factores para la correcta formación del estilo y el solo hecho de que uno de ellos no se exprese de forma correcta da como resultado los defectos vistos en el extremo apical del gineceo en los diferentes mutantes sencillos por separado.

3.2. *NGA* y su posible relación con el gen *YUC4*.

Es probable que *NGA* pueda estar regulando la expresión de los genes *YUC2* y *YUC4* directamente, ya que en el promotor de ambos genes se han encontrado secuencias similares a los sitios de unión del dominio B3 del gen *RAV1* (Kagaya et al., 1999). *RAV1* es, como los genes *NGA*, miembro de la familia *RAV* y comparte una alta similitud de secuencia en el dominio B3 con ellos, por lo que es probable que puedan reconocer las mismas secuencias de DNA. El sitio de unión para el dominio B3 de *RAV1*, determinado mediante experimentos de selex, es caCCTG pero la región más conservada dentro de este motivo es CCTG (fig. 101; Kagaya et al., 1999).



Figura 101. Secuencias de los promotores de los genes *YUC2* y *YUC4*. Se muestra parte del promotor de ambos genes así como las primeras bases de la región codificante. Se indica en naranja el inicio de la región codificante, en rojo las secuencias similares al sitio de unión del dominio B3 de *RAV1* (Kagaya et al., 1999) y en azul el sitio de unión de *STY1* (Eklund et al., 2010).

Como ya se ha comentado anteriormente, la pérdida de actividad *NGA* conlleva la falta de actividad de *YUC4* en la zona apical del gineceo. Sin embargo, fuera de la región apical del gineceo, las proteínas *NGA* parecen no ser necesarias para la activación transcripcional de *YUC4*, ya que el patrón de expresión en el resto de la flor es igual al de plantas silvestres. Por otro lado, la sobreexpresión de *NGA3* no conlleva ningún tipo de modificación en el patrón de expresión de *YUC4* en la flor. Todo ello sugiere que en estos dominios de expresión la activación de los genes *YUC* es llevada a cabo por otros factores.

Como ya se ha descrito anteriormente, *YUC4* es una diana directa de *STY1* (Eklund et al., 2010). A pesar de ello, en el estilo tampoco se observa un cambio significativo cuando se sobreexpresa *STY1*, de modo que probablemente ni *STY1* ni *NGA3* sean capaces de activar por sí solos la expresión de *YUC4*, pero ambos sean

necesarios para su activación. Por ello, nos planteamos la posibilidad de que STY y NGA fueran requeridos de forma conjunta para activar a YUC. Para comprobarlo se llevó a cabo la sobreexpresión de STY1 y NGA3 en fondo YUC4_{PRO}::GUS, y no se observó ningún cambio significativo en la señal detectada en el estilo, siendo esta igual a la observada cuando únicamente se sobreexpresa STY. De modo que STY y NGA no deben ser capaces de activar a YUC sin la participación de factores adicionales.

Para confirmar este resultado se realizó un ensayo de actividad transitoria del promotor de YUC4 dirigiendo la expresión del gen de la LUC. Los resultados obtenidos indicaban que la presencia conjunta de STY y NGA no conllevaba un nivel de expresión de la LUC mayor al detectado cuando sólo se agroinfiltra STY1, a pesar de que ambos sean necesarios para la activación de YUC4. Por tanto, la activación de YUC4 por STY y NGA podría tener lugar por rutas independientes o, al igual que ocurre en la especificación de las células del estilo, quizás sea necesaria la presencia de factores adicionales para que lleven a cabo la regulación de la expresión de YUC4. Puesto que ya se había observado que CRC interaccionaba con NGA y STY para llevar a cabo la especificación de las células del estilo y, además, el mutante *crc* presenta defectos en el estilo, región donde se expresan los genes YUC, se decidió estudiar si, también en este caso, CRC era necesario para la activación de YUC4 en el estilo. Cuando se analizaron los resultados no se observó un aumento significativo de los niveles de expresión del gen de la LUC. Además, si el supuesto trímero formado por STY1, NGA1 y CRC fuera el responsable de la activación de YUC4, se hubiera observado una modificación en el patrón de expresión de dicho gen en fondo 35S:NGA3 35S:STY1, cosa que no ocurría.

Por tanto, parece que se requieren funciones génicas adicionales junto con la actividad NGA para regular YUC4, sugiriendo un escenario complejo de regulación espacio temporal de los genes YUC.

3.3. La compleja relación entre *SPT* y *NGA*.

SPT es un gen implicado en muchos procesos, como por ejemplo la germinación, el desarrollo del carpelo o el control del tamaño de las hojas (Heisler et al., 2001; Groszmann et al., 2008, 2010; Ichihashi et al., 2010). Durante los diferentes estadios del desarrollo del gineceo, SPT se expresa de un modo muy dinámico en diferentes dominios. Así pues, hasta el estadio 7 se expresa en la región medial. La expresión está limitada a la región interna, excepto en el ápice donde se extiende a la cara externa del gineceo. Durante los estadios 9-11, la expresión se detecta en el septum y estigma en desarrollo y en el tracto transmisor. Dentro del gineceo también se expresa en primordios de óvulos y en la zona de dehiscencia de frutos maduros (Heisler et al., 2001). Además, SPT también se expresa en pétalos y estambres, en el meristemo apical del tallo y en hojas jóvenes (Heisler et al., 2001).

Algunos autores han sugerido un papel de SPT en la interpretación del gradiente de auxinas a lo largo del eje apical-basal del gineceo en desarrollo (Nemhauser et al., 2000) apoyándose en el rescate de los defectos en el estilo del mutante *spt* tras ser tratados con un inhibidor del transporte de auxinas. Este tratamiento no tiene ningún efecto en la longitud de las valvas de los mutantes *spt*, al contrario de lo que ocurre en plantas silvestres o en otros mutantes como *sty1-1 sty2-1*, *ant-8* o *jag-1*, por lo que otros autores han señalado que podría deberse a que SPT tenga funciones diferentes en el estilo y el ovario, promoviendo el crecimiento del estilo y reprimiendo la formación del ovario en respuesta a auxinas o, alternativamente que SPT afectara al transporte de auxinas en el gineceo, bien directa o indirectamente (Staldal et al., 2008).

Se sabe que SPT está reprimido por ETT, ya que SPT se expresa ectópicamente en el mutante *ett* y el fenotipo de *ett* se suprime parcialmente por la pérdida de actividad de SPT (Heisler et al., 2001). Por otro lado, la expresión de SPT está regulada positivamente en la zona del margen de la valva por IND (Groszmann et al., 2010), un factor de transcripción necesario para el desarrollo de la zona de dehiscencia (Liljegren et al., 2004). En mutantes *ind* y en plantas transgénicas con una mutación en el supuesto sitio de unión de IND al promotor de SPT, la expresión de SPT en la zona de dehiscencia desaparece (Groszmann et al., 2010). Al igual que IND, ALC también es necesario para la diferenciación de la zona de dehiscencia. SPT parece también estar relacionado con este factor. Se trata de un factor de transcripción tipo bHLH, igual que SPT, y a diferencia del resto de miembros de la familia, sólo ALC comparte el dominio hélice anfipático característico de SPT (Groszmann et al., 2010). Además ambos se expresan en la zona de dehiscencia (Rajani y Sundaresan, 2001; Heisler et al., 2001), aunque no se ha estudiado en profundidad las posibles interacciones genéticas entre ambos.

El patrón de expresión de STY solapa con el de SPT durante los estadios 6 al 10 del desarrollo floral (Kuusk et al., 2002; Heiler et al., 2001). Además, el fenotipo del doble mutante *sty1-1 spt-2* indica la existencia de una fuerte interacción sinérgica entre ambos genes (Sohlberg et al., 2006; Kuusk et al., 2002, 2006). Posteriormente, se ha observado que en líneas *35S::SPT:VP16* se produce la expresión ectópica de STY2, indicando que SPT podría estar regulando a STY2. Sin embargo, en el mutante *spt* STY2 sigue expresándose en el tejido estilar, lo que sugiere que su activación por parte de SPT podría ser redundante con otros factores (Groszmann et al., 2008).

SPT se expresa durante los estadios 8 al 11 del desarrollo floral en la región medial y apical del gineceo coincidiendo con las zonas donde se expresan los genes NGA. Además, los fenotipos observados en las combinaciones de mutantes entre *spt* y *nga* indican la existencia de una interacción sinérgica entre ambos genes.

Los resultados obtenidos parecen situar a SPT por encima de NGA en las vías que regulan el desarrollo de la región apical del gineceo, ya que la sobreexpresión de NGA rescataba los defectos en la fusión del estilo del mutante *spt*. Sin embargo, el patrón de expresión de NGA no cambia en fondo *spt-2* o *35S::SPT*, lo cual podría explicarse si, al igual que con STY2, la activación de NGA por parte de SPT fuera redundante con otros factores. Por otro lado, la pérdida de actividad de SPT también revertía, al menos parcialmente, el fenotipo de la línea *35S::NGA3*, y asimismo, el patrón de expresión de SPT cambiaba en fondo mutante *nga*. Todo ello parecería indicar lo contrario, es decir, que NGA estaría regulando directa o indirectamente a SPT, y que esta regulación sería importante para la función de NGA en la organización apical-basal del gineceo.

Los resultados del análisis efectuado no son suficientes para esclarecer con precisión la naturaleza de la interacción entre SPT y NGA. En cualquier caso, los datos de que disponemos apuntan a que la interacción es compleja, incluyendo un cierto grado de redundancia entre ambos y posiblemente una regulación cruzada o retroalimentada

3.4. La interacción entre *ETT* y *NGA*.

Sessions y Zambryski (1995) sugieren que ETT promueve la formación del ovario y restringe la diferenciación de las células del estilo y estigma al extremo apical del gineceo en desarrollo y del ginóforo en el extremo basal. ETT ha sido propuesto como el encargado de interpretar el gradiente de concentración de auxinas en el gineceo

(Nemhauser et al., 2000), especificando así la organización apical-basal en el primordio de este órgano floral (Sessions y Zambryski, 1995).

Varias evidencias experimentales apuntan a una posible relación funcional entre ETT y NGA. Por un lado, las mutaciones en ETT causan defectos severos en la organización apical-basal del gineceo, con un incremento de las regiones basal y apical y una fuerte reducción del tamaño del ovario (Sessions et al., 1997; Sessions y Zambryski, 1995), que en algunos aspectos recuerda al fenotipo de las líneas de sobreexpresión de NGA. El papel de ETT promoviendo la formación del ovario parece estar mediado por la represión de SPT en este dominio, restringiendo así su expresión al tracto transmisor y septum en desarrollo, ya que en el doble mutante *ett spt* se suprime parcialmente el fenotipo del mutante *ett* (Heisler et al., 2001). Podemos encontrar cierto paralelismo con lo que ocurre en líneas *35S::NGA3 spt*, en las que se rescata parcialmente el fenotipo de la línea de sobreexpresión. Además, si se analiza el patrón de expresión de NGA3 en un fondo mutante *ett* se observa un aumento de la expresión de NGA3 en el estilo descendiendo ligeramente hacia las valvas y en el ginóforo (Trigueros, 2008), por lo que parece que ETT, al igual que lo hace con SPT, estaría reprimiendo a NGA restringiendo su expresión a la zona apical del gineceo.

ETT interacciona genéticamente con *STY1* durante el establecimiento de la organización apical-basal del gineceo, ya que se ha comprobado que en el doble mutante *styl ett-1* se suprime parcialmente el fenotipo del mutante *ett*, al producirse una disminución del tejido estigmático (Sohlberg et al., 2006). El fenotipo del doble mutante *styl ett-1* es muy similar al de la línea *nga3-3 nga4-3 ett-1* (Trigueros, 2008), en el que también se observa una reducción significativa del número de papilas estigmáticas, lo cual sugiere que ETT y NGA podrían tener una relación funcional semejante a la de ETT y *STY* y que, en ambos casos, SPT podría participar como diana de ETT y aguas arriba de *STY/NGA*.

Por último, ETT y NGA también parecen interactuar durante el desarrollo de la hoja. Las hojas de la roseta de la línea *35S::NGA3* son más estrechas y alargadas que las de plantas silvestres, un fenotipo similar aunque más severo que el de las líneas de sobreexpresión de ETT. La morfología de la roseta en las líneas *35S::ETT 35S::NGA3* recuerda en parte al fenotipo de las hojas de roseta observado en los mutantes *axr1* (Timpte et al., 1995) y *axr6* (Hobbie et al., 2000), ambos genes implicados en respuestas a auxinas, que presentan también hojas enrolladas, pero a diferencia de lo que ocurre en estos mutantes, en la línea *35S::ETT 35S::NGA3* las hojas crecen perpendiculares al suelo. Las hojas arrugadas y con crecimiento prácticamente perpendicular al suelo se han observado también en líneas donde se elimina la expresión de los genes *KAN1* y *KAN2* (Pekker et al., 2005), organizadores clave de la polaridad abaxial/adaxial de la hoja. Concretamente los genes *KAN* actúan promoviendo la identidad abaxial de la hoja y lo hacen conjuntamente o en paralelo con ETT y *ARF4* (Pekker et al., 2005). Para saber si el fenotipo obtenido en la línea *35S::ETT 35S::NGA3* es consecuencia de alteraciones en el establecimiento de la polaridad de las hojas habría que analizar con detalle los tipos celulares que la constituyen, cosa que no se ha abordado en este trabajo. Por tanto, no podemos concluir que el fenotipo obtenido sea consecuencia de los mismos cambios a los que se debe el del mutante *kan1-2kan2-1*. Aun así, podemos especular que en presencia de NGA, ETT interactúe con éste, lo cual viene reforzado por el hecho de que ambas proteínas interactúan físicamente, promoviendo la identidad adaxial de la hoja o impidiendo que interactúe con *KAN* y, por tanto, el correcto desarrollo de la región abaxial de la hoja.

4. Implicación de los genes de la zona de dehiscencia en la formación del extremo apical del gineceo.

A pesar de que NGA participa principalmente en la organización apical-basal del gineceo, el fenotipo de la línea de sobreexpresión parecía indicar que también participaba en la organización medio-lateral del mismo, al observarse una expansión de la zona del margen de la valva y del replum, a costa de una reducción de las valvas.

El fenotipo observado en las líneas de sobreexpresión se podría explicar mediante dos opciones muy sencillas; por una parte podría deberse a la represión de los genes del margen de la valva, concretamente de FUL o, por el contrario ser consecuencia de la activación de los genes del margen de la valva, como es el caso de SHP o IND. Tendríamos una tercera opción, algo más compleja que implicaría la activación de los genes del margen de la valva como consecuencia de una interacción directa de los genes NGA con el complejo FIL/JAG/YAB3 (fig. 102).

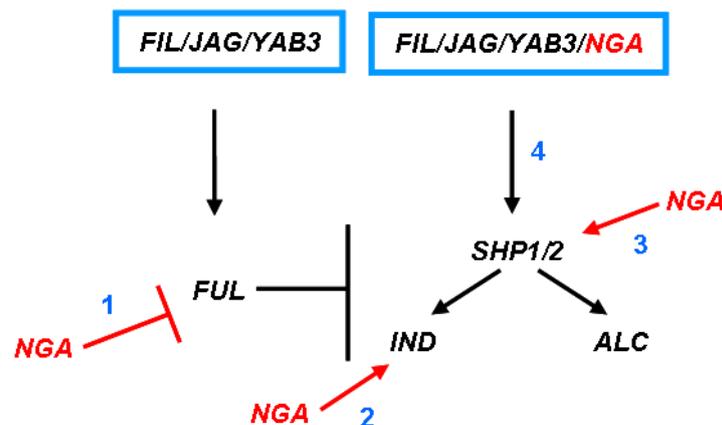


Figura 102. Hipótesis sobre la posible relación entre los genes *NGA* y los genes implicados en el establecimiento del eje medio-lateral.

De las cuatro hipótesis planteadas y a partir de los resultados obtenidos, se podría descartar la posible activación directa de IND por parte de los genes *NGA*, ya que cuando se sobreexpresaban los genes *NGA* no sólo se observaban cambios en el patrón de expresión de IND sino también se veían afectados los niveles de expresión de los genes *ALC* y *SHP*, que no están regulados por IND. Además el fenotipo de la línea de sobreexpresión se revertía significativamente en fondo mutante *shp*, cosa que sólo ocurre débilmente, por ejemplo, con el fenotipo del mutante *ful* en fondo *shp1 shp2*. Por tanto, si *NGA* activara a IND independientemente de *SHP*, no deberíamos observar este efecto ya que en *35S::NGA3 shp1 shp2*, IND debería estar sobreexpresado y los fenotipos que observáramos deberían ser similares a los del mutante *ful*.

La primera hipótesis planteada, es decir, la represión de *FUL* por parte de *NGA*, se veía apoyada por la similitud en los fenotipos de los frutos de la línea *35S::NGA3* y el mutante *ful-2* y los cambios en el patrón de expresión de *FUL* en diferentes fondos. Así, si no se expresaban los genes *NGA* la expresión de *FUL* se expandía a la zona apical del gineceo en desarrollo, mientras que si se sobreexpresaban, la expresión de *FUL* se reducía de forma significativa. La expresión de *SHP* también se veía modificada en función del nivel de expresión de los genes *NGA*. Así pues, en la línea *amiR-NGA*, *SHP1* no se expresaba en el dominio apical del gineceo (Alvarez et al., 2009), mientras que en la línea de sobreexpresión de *NGA3* la señal se expandía. También se ha observado la reversión parcial del fenotipo de la línea de sobreexpresión de *NGA3* en fondo *ind-2* y *shp1 shp2*, lo cual recuerda a lo que ocurre en los mutantes *ful* donde la

pérdida de la actividad de *ind*, *shp1* y *shp2* rescataba parcialmente los defectos observados en el fruto. Por tanto, estos resultados favorecerían la hipótesis de que los genes *NGA* podrían actuar reprimiendo la expresión de *FUL*. Así, en el cuádruple mutante *nga*, la expansión de *FUL* a la zona apical del gineceo impediría la expresión de *SHP* en esta zona y en las líneas *35S::NGA3*, la represión de *FUL* en las valvas permitiría la expresión ectópica de los genes de margen de valva.

Sin embargo, otros datos apuntaban a que la represión de *FUL* por *NGA* podía no ser suficiente para explicar los resultados obtenidos, y que había que considerar la posible activación adicional de *SHP* por parte de los genes *NGA*. Así, Alvarez et al. (2009) propusieron que los genes *NGA* estarían activando a los genes *SHP* en el estilo, ya que en fondo *amiR-NGA* la expresión de *SHP1* en la zona apical del gineceo se perdía, y al expresar ectópicamente *NGA* en estambres, dirigido por el promotor de *AP3*, se desarrollaban parches de tejidos en las anteras que expresaban *SHP* y mostraban características de estilo y estigma, a pesar de que en las anteras *FUL* no se expresa. Además, la reversión del fenotipo *35S::NGA3* en fondo *shp1 shp2* era mayor que la del fenotipo *ful* en el triple *ful shp1 shp2*. Todas estas evidencias experimentales parecen así favorecer la hipótesis de que los genes *NGA* podrían estar modulando la activación de *SHP* y la represión de *FUL*.

En cualquier caso, para intentar esclarecer si *NGA* podría activar a *SHP* independientemente de la actividad de *FUL* se está generando el quintuple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4 ful* en combinación con el reportador *SHP1::GUS*. En esta línea se analizará si se produce algún cambio en el patrón de expresión de *SHP* cuando no se expresan ni los genes *NGA* ni *FUL*. Si la falta de expresión de *SHP* en fondo *nga* es consecuencia únicamente de la desrepresión de *FUL*, al no expresarse *FUL* en *nga1-4 nga3-3 nga4-3*, la señal de *SHP* debería ser igual o más expandida que en plantas silvestres, mientras que si *SHP* continúa sin expresarse en la zona apical será porque es necesaria la actividad de los genes *NGA* para la activación de *SHP*. Experimentos adicionales que podríamos abordar para apoyar esta hipótesis sería el estudio de la posible unión de las proteínas *NGA* al promotor de *FUL* y *SHP* bien por inmunoprecipitación de cromatina o mediante un ensayo de la actividad transitoria del promotor de *FUL* o *SHP* dirigiendo la expresión del gen de la *LUCIFERASA*.

Recientemente, Colombo et al. (2010) atribuyen un nuevo papel a los genes *SHP* en la formación del estilo y estigma, ya que sus estudios sugieren una redundancia funcional de los genes *SHP1*, *SHP2*, *ANT* y *CRC* en el control del desarrollo del estilo y estigma. Además, *FUL* también parece tener un papel en la correcta formación del estilo, ya que se ha descrito que los mutantes *ful* tienen estilos estrechos y alargados en fondos genéticos donde el gen *ERECTA* está activo (Ferrandiz et al, 2000a). Estos resultados junto con la ausencia de defectos en la zona de dehiscencia del cuádruple mutante *nga*, sugieren que *NGA* podría estar regulando a *FUL* y *SHP* en la zona apical del gineceo, donde podrían ser importantes para el correcto establecimiento de demarcación entre ovario y estilo/estigma.

Como hemos propuesto anteriormente, los genes *NGA* podrían llevar a cabo la activación de *SHP* y/o la represión de *FUL* a través del complejo formado por *FIL/YAB/JAG*. Esta hipótesis viene respaldada por la interacción observada entre las proteínas *YAB3* y *NGA* (Trigueros, 2008), aunque el fenotipo de la línea *35S::NGA3 yab3* nos indicaría que, o bien la activación de *SHP* por parte de los genes *NGA* no requiere de la actividad de *YAB3*, o que la falta de actividad de *YAB3* se ve compensada por la actividad de *FIL* y *JAG*. En esta línea de estudio sería conveniente comprobar una posible interacción física entre los genes *NGA* y, *FIL* y *JAG*.

A lo largo de todo el estudio realizado sobre el papel de los genes *NGA* en el desarrollo del gineceo se puede observar como la actividad de *NGA* viene modulada por diferentes interacciones proteína-proteína, de modo que dependiendo de donde se exprese y los factores que lo acompañen, la función que desempeña parece ser diferente. Por ejemplo, en la zona apical del gineceo, los factores *NGA* interactúan con *CRC* y *STY* para dirigir la formación del estilo, mientras que en hoja parece interactuar con *ETT* para el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial. Los resultados descritos en este apartado también parecen indicar que la interacción de *NGA* con *YAB3* (y quizás con *FIL*) podría ser también importante para la regulación de los genes implicados en el desarrollo de las valvas y el margen de la valva, delimitando sus dominios de expresión también en la zona apical del gineceo.

5. Posible localización de *NGA* en las rutas que controlan el desarrollo del gineceo.

A continuación, y a partir de los resultados obtenidos, hemos intentado colocar a los genes *NGA* en las rutas hasta el momento conocidas en el establecimiento de los distintos ejes del desarrollo del gineceo. En la organización apical-basal, *NGA* (fig 103 A) junto con *STY*, y probablemente un tercer factor aún desconocido, estarían activando la expresión de *YUC4* y por consiguiente la biosíntesis de auxinas, mientras que *NGA* y *STY* junto con *CRC* serían los responsables de la correcta formación de las células del estilo. No es posible determinar con precisión la relación entre los genes *NGA* y los genes implicados en el establecimiento del eje medio-lateral, aunque en general, los resultados favorecen la idea de que los genes *NGA* estarían favoreciendo la activación de *SHP* frente a la de *FUL* y/o reprimiendo directamente a *FUL*, probablemente mediante su participación en el complejo formado por *FIL* y *YAB3*.

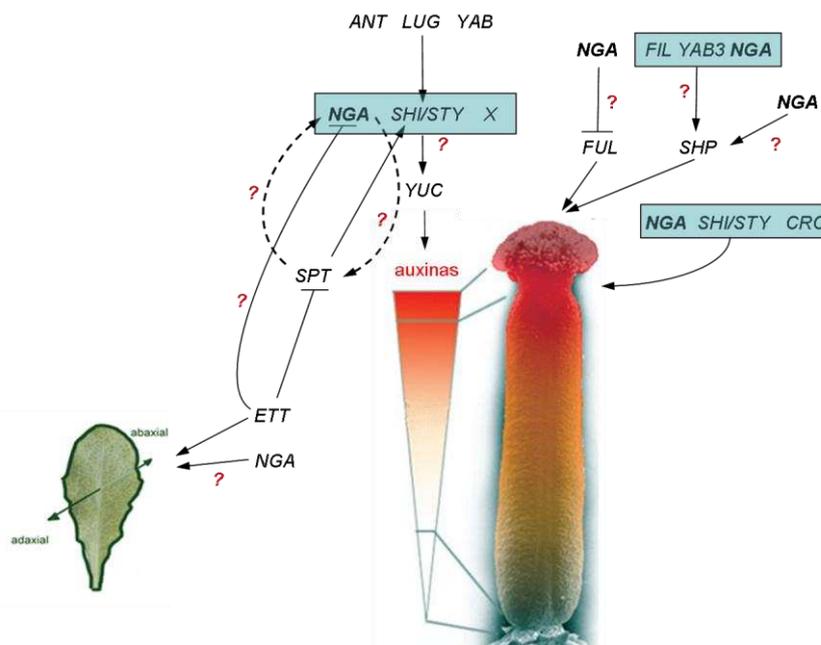


Figura 103. Modelo del papel de los genes *NGA* en el desarrollo del gineceo. Esquema de las interacciones genéticas que determinan la organización de los tejidos en la región apical del gineceo. *STY*, *CRC* y *NGA* promueven el desarrollo del estilo en la región apical del gineceo. Además tanto *NGA* como *STY* activarían a los genes *YUC* implicados en la síntesis de auxinas en el extremo apical del gineceo, con la intervención de un tercer factor. Los genes *NGA* favorecerían la activación de *SHP* frente a la de *FUL* mediante su interacción con el complejo *FIL/YAB3*, o bien actuarían reprimiendo a *FUL*. Los signos de interrogación y las líneas en rojo indican posibles interacciones no confirmadas experimentalmente.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1- La caracterización funcional de los genes NGA ha puesto de manifiesto que:

a) NGA1 y NGA2 son necesarios para la correcta formación de la región apical del gineceo.

b) NGA1 y NGA2 junto con los otros dos genes que constituyen la familia NGA actúan de forma parcialmente redundante dependiente de dosis en el desarrollo de la región apical del gineceo, y son esenciales para la formación del estilo y del estigma.

b) Los genes NGA también participan en la morfogénesis de otros órganos laterales, como los órganos florales y las hojas.

2. Los genes NGA parecen estar implicados en la ruta de biosíntesis de auxinas, probablemente a través de la activación de los genes YUC,

3. El estudio de las interacciones genéticas que tienen lugar entre los genes NGA y otros genes implicado en el desarrollo del gineceo nos han permitido situar a la familia NGA dentro de las rutas genéticas que controlan los procesos de desarrollo del mismo:

a) NGA actúa cooperativamente con STY1 y CRC para dirigir la correcta formación del estilo, probablemente mediante la formación de un complejo proteico.

b) ETT y NGA parecen actuar de forma conjunta para la correcta formación de la hoja.

c) Los genes NGA participan en la regulación de la expresión de FUL y SHP, genes implicados en el desarrollo del eje medio-lateral del gineceo que también parecen tener un papel importante en el desarrollo de las regiones apicales del mismo. Esta regulación podría consistir bien en la activación de SHP, la represión de FUL o bien mediante su interacción con el complejo formado por FIL/YAB para favorecer la activación de SHP frente a la de FUL en el estilo.

Materiales y Métodos

1. Material biológico y condiciones de cultivo.

1.1. Material bacteriano.

1.1.1. Cepas bacterianas.

En este trabajo se han utilizado las siguientes cepas bacterianas:

Cepa	Referencia/origen	Uso
DH5 α (<i>E. coli</i>)	Hanahan (1983)	Clonaje de vectores
HB101 (<i>E. coli</i>)	Takara	Clonaje de vectores
ElectroMAX DH10B TM (<i>E. coli</i>)	Life Technologies	Clonaje de vectores
C58 pMP90 (<i>A. tumefaciens</i>)	Koncz y Schell (1986)	Clonaje de vectores binarios utilizados para la transformación de plantas.
C58 pJIC (<i>A. tumefaciens</i>)		Clonaje de vectores pGreen (Hellens, <i>et al.</i> , 2000) utilizados para la transformación de plantas.
DB3.1 TM (<i>E. coli</i>)		Clonaje de vectores portadores del gen suicida <i>ccdB</i> .

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas.

1.1.2. Medios de cultivo bacteriano.

- **Medio LB (Luria-Bertani-Medium)** pH7.5: 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl. El pH se ajusta con NaOH.

- **Medio SOC:** 20gr de peptona, 5gr de extracto de levadura, 2mL de NaCl 5M, 2,5mL de KCl 1M y 960mL de agua, una vez autoclavado se le añaden 10mL de MgCl₂ 1M, 20mL de glucosa al 40% y 10mL de MgSO₄ 1M.

1.1.3. Suplementos de los medios de cultivo bacterianos.

Normalmente los suplementos añadidos son antibióticos. En la siguiente tabla se muestran los diferentes suplementos utilizados, las concentraciones de las soluciones stock y el disolvente en el que se preparan, y las concentraciones de trabajo.

Antibiótico	Stock	Disolvente	Concentración de trabajo	
			E.coli	A.tumefaciens
Ampicilina (Amp)	100mg/mL	H ₂ O	100 μ g/mL	100 μ g/mL
Carbenicilina (Cb)	100mg/mL	H ₂ O	100 μ g/mL	100 μ g/mL
Kanamicina (Kn)	50mg/mL	H ₂ O	50 μ g/mL	50 μ g/mL

Espectinomicina (Spec)	100mg/mL	H ₂ O	100µg/µl	-
Rifampicina (Rf)	20mg/mL	Metanol 90%	-	100µg/mL
Hygromicina (Hyg)	50mg/mL	H ₂ O	100µg/mL	-
X-Gal	40mg/mL	DMSO	80µg/mL	-
Amicacina	50mg/mL	H ₂ O	50µg/mL	50µg/mL
Zeocina	50mg/mL	H ₂ O	50µg/mL	50µg/mL
Basta	50mg/mL	H ₂ O	-	-
Tetraciclina	5mg/mL	ETOH 50%	-	-

Tabla 2: Suplementos utilizados en el trabajo con bacterias.

1.1.4. Condiciones de cultivo de microorganismos.

Los cultivos líquidos de *E. coli* se incubaron a 37°C en agitación a 220 rpm o/n. El cultivo sólido se realizó en placa a 37°C o/n.

Los cultivos líquidos de *A. tumefaciens* se incubaron a 28°C en agitación a 200 rpm o/n. El cultivo sólido se realizó en placa a 28°C durante 2 días.

Los cultivos bacterianos se almacenaron de forma permanente en glicerol al 50% a -80°C.

1.2. Material vegetal.

1.2.1 Líneas utilizadas.

En este trabajo se han utilizado las siguientes plantas de *Arabidopsis thaliana*:

Ecotipo silvestres:

Genotipo	Código	Referencia
Col-0	N1092	Redei, 1962

Líneas mutantes:

Genotipo	Ecotipo	Mutágeno	Referencia
ett-3	Ler La0	EMS	Sessions y Zambryski, 1995
ett-13	Col-0	T-DNA	Pekker et al., 2005
ful-2	Col-0	EMS	Ferrándiz et al., 2000 ^a
spt-2	Ler	EMS	Alvarez y Smith, 1999
shp1-1	Ler	T-DNA	Liljegren et al., 2000
shp2-1	Ler	T-DNA	Kempin et al., 1997

sty1-1	Col-0	Transposón Ds	Kuusk et al., 2002
sty2-1	Col-0	Transposón Ds	Kuusk et al., 2002
crc-1	Ler	EMS	Alvarez y Smyth, 1999
ind1-2	Col-0	EMS	Liljegren et al., 2004
nga3-3	Col-0	Transposón Spm	Trigueros et al., 2009
nga4-3	Col-0	Transposón Spm	Trigueros et al., 2009
nga2-2	Col-0	Transposón dSpm	Trigueros et al., 2009
nga1-4	Col-0	T-DNA	Trigueros et al., 2009

Líneas transgénicas:

Línea	Ecotipo	Referencia
35S::STY1	Col-0	Kuusk et al., 2002
35S::SPT	Ler	Groszmann et al., 2008
35S::ETT (pMNG50)	Col-0	Este trabajo
35S::NGA1 (pMNG48)	Col-0	Este trabajo
35S::NGA3 (pMT17)	Col-0	Trigueros et al., 2009
35S::NGA1:VP16 (pMNG56)	Col-0	Este trabajo
IND _{PRO} ::GUS (GT140)	Ler	Liljegren et al., 2004
ALC _{PRO} ::GUS (GT142)	Ler	Sundaresan et al., 1995
FUL _{PRO} ::GUS	Ler	Gu et al., 1998
SHP1 _{PRO} ::GUS	No-0	Baum et al., 2001
SHP2 _{PRO} ::GUS	No-0	Savidge et al., 1995
SPT _{PRO} ::GUS	Ler	Groszmann et al., 2010
STY1 _{PRO} ::GUS	Col-0	Kuusk et al., 2002
YUC4 _{PRO} ::GUS	Col-0	Cheng et al., 2006
YUC2 _{PRO} ::GUS	Col-0	Cheng et al., 2006
35S::GFP:NGA1 (pMNG15)	Col-0	Este trabajo
35S::GFP:NGA2 (pMNG16)	Col-0	Este trabajo
5'NGA2::NGA2:GUS:3'NGA2 (pMNG41)	Col-0	Este trabajo
5'NGA1::NGA1:GUS:3'NGA1 (pMNG35)	Col-0	Este trabajo
5'NGA2::NGA2:GFP:3'NGA2 (pMNG64)	Col-0	Este trabajo
5'NGA1::NGA1:GFP:3'NGA1 (pMNG63)	Col-0	Este trabajo
amiR-NGA (pMNG19)	Col-0	Este trabajo

1.2.2. Condiciones de cultivo en el invernadero.

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en fitotrones en condiciones de día largo (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad), con una temperatura en un rango de entre 21 a 23°C y una humedad controlada de aproximadamente el 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).

Las semillas se sembraron en macetas de plástico de 12 cm de diámetro o en alveolos plástico de 6.5 x 6.5 x 5 cm con una mezcla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1), previamente esterilizada a -80°C durante 20 min. Las bandejas se cubrieron con plástico y se mantuvieron en oscuridad y a 4°C , durante tres días, a fin de sincronizar la germinación (estratificación). Transcurrido ese tiempo se llevaron al fitotrón. Cuando aparecía el primer par de hojas se agujereó el plástico en distintos puntos de la bandeja, y el número y tamaño de los agujeros se fue aumentando progresivamente hasta que, al cabo de dos o tres días se eliminó por completo. Eliminado el plástico las bandejas se regaron con agua destilada y una vez a la semana con solución Hoagland n°1, suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

1.2.3. Medios de cultivo de plantas.

-**Medio Murashige i Skoog con sacarosa (MSS)** pH 5.9 se utilizó para cultivar plantas en placas Petri y en condiciones estériles.

Composición: Murashige & Skoog (Duchefa) médium, que incluye vitaminas, 2.2g/L, MES 0.5g/L, sacarosa 10g/L. Se ajustó el pH con KOH y se añadieron 10g/L de agar bacteriológico.

1.2.4. Suplementos de medio de cultivo de plantas.

Los suplementos añadidos a los medios fueron antibióticos y herbicidas. En la siguiente tabla se muestran los diferentes suplementos utilizados, las concentraciones de las soluciones stock y el disolvente en el que se preparan, y las concentraciones de trabajo.

			Concentración de trabajo
Antibiótico	Stock	Disolvente	A.thaliana
Kanamicina (Kn)	50mg/mL	H ₂ O	50μg/mL
Hygromicina (Hyg)	50mg/mL	H ₂ O	15μg/mL
Basta	50mg/mL	H ₂ O	12μg/mL placa 0,05% spray
Tetraciclina	5mg/mL	ETOH 50%	10μg/mL

Tabla 3: Suplementos utilizados en el trabajo con plantas.

1.2.5. Condiciones de cultivo “*in vitro*”.

El cultivo *in vitro* de Arabidopsis en placas de Petri, se realizó en cabinas con condiciones de día largo (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) y temperatura constante de 25°C . En este caso la luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo Grolox 36W (Sylvania) con una intensidad de $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$.

1.3. Construcciones.

1.3.1. Vectores.

1.3.1.1. Vectores de clonaje de productos de PCR.

Las clonaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de los fines requeridos (Tabla 4).

pGEM-T Easy (Promega): vector intermediario utilizado para clonar fragmentos amplificados por PCR y secuenciarlos, ya que posee sitios de unión para los cebadores T7 y SP6. Presenta el gen de resistencia a ampicilina.

pCRII (Dual promoter TA Cloning kit Invitrogen): vector intermediario para clonar fragmentos amplificados por PCR y su posterior secuenciación, ya que posee sitios de unión para los cebadores SP6 y T7. El plásmido pCRII confiere resistencia a kanamicina y ampicilina.

pCR8/GW/TOPO (Invitrogen): vector intermediario utilizado para clonar fragmentos amplificados por PCR teniendo como objetivo introducirlos posteriormente en plásmidos de destino mediante la reacción de Gateway. Podemos secuenciar los fragmentos clonados usando los cebadores M13 directo y reverso. Este plásmido confiere resistencia a espectinomicina.

pENTR1A (Invitrogen): vector intermediario utilizado para clonar mediante digestiones un fragmento amplificado por PCR y clonado en otro vector, para posteriormente introducirlo mediante reacción Gateway en un plásmido de destino. Confiere resistencia a kanamicina.

pDONR 221/pDONR Zeo (Invitrogen): vectores intermediarios utilizados para clonar el inserto en un plásmido de destino mediante la reacción de Gateway. Nos permite secuenciar dicho inserto con los cebadores M13 directo y M13 reverso. El pDONR 221 incluye el gen de resistencia para kanamicina y el pDONR Zeo para zeocina.

pDONR 201 (Invitrogen): vector intermediario utilizado para clonar el inserto en un plásmido de destino mediante reacción de Gateway. Presenta el gen de resistencia a kanamicina.

1.3.1.2. Vectores para expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

pEGAD: vector utilizado para la expresión de proteínas fusionadas al extremo C-terminal de la proteína fluorescente verde. La expresión está bajo el control del promotor constitutivo 35S. Incluye el gen de resistencia a kanamicina para bacterias y el de basta para plantas.

pYFC43: vector utilizado para la expresión de proteínas fusionadas a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente amarilla. La expresión está bajo el control del promotor constitutivo 35S. Confiere resistencia a Kanamicina. Para más información sobre este vector se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.

pYFN43: vector utilizado para la expresión transitoria de proteínas fusionadas a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente amarilla. La expresión está bajo el control del promotor constitutivo 35S. Al igual que el vector anterior incluye el gen de resistencia a kanamicina. Para más información sobre este vector se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.

pBin19G1: vector utilizado para evitar el silenciamiento génico que se puede producir al infiltrar plantas de *Nicotiana*. Confiere resistencia a kanamicina (Voinnet et al., 2003).

pGreenII 0800-5 LUC: vector utilizado para la expresión del gen de la Luciferasa bajo el control de un promotor de interés. También sobreexpresa el gen de la Renila. Confiere resistencia a kanamicina (Hellens et al., 2005).

pEarleyGate100: vector utilizado para la sobreexpresión transitoria de la proteína de interés bajo el control del promotor constitutivo 35S. Este vector también se utilizó para transformar plantas. Incluye los genes de resistencia a kanamicina para bacterias y basta para plantas.

1.3.1.3. Vectores de transformación de plantas.

Estos vectores se utilizaron para obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

pGreen (Hellens, 2000): Al no tratarse de un vector binario necesita de un segundo vector denominado pSoup o pJIC, el cual contiene todas las funciones trans necesarias para la integración del T-DNA que porta el vector pGreen. Para más información sobre el sistema pGreen se puede consultar la página web www.pgreen.ac.uk. Se utilizó para clonar el gen de interés bajo el control del promotor constitutivo 35S en el vector pGreen II 0029.

pCHF3: vector que permite clonar el gen de interés bajo el control del promotor constitutivo 35S. Posee el gen de resistencia a espectinomicina para bacterias y kanamicina para plantas.

Listado de los vectores utilizados:

Plásmido	Características	Origen/referencia
pGEM-T Easy	Amp ^r , lacZ, sitios de unión para los cebadores T7 y Sp6.	Promega
pCRII	Amp ^r , Kan ^r , lacZ, sitios de unión para los cebadores T7, Sp6 y M13 directo.	Invitrogen
pCR8/GW/TOPO	Spec ^r , sitios de unión para los cebadores M13 directo, M13 reverso, GW1 y GW2.	Invitrogen
pENTR1A	Kan ^r .	Invitrogen
pDONR 221	Kan ^r , sitios de unión para los cebadores M13 directo, M13 reverso y T7.	Invitrogen
pDONR 201	Kan ^r .	Invitrogen
pDONR Zeo	Zeocina ^r , sitios de unión para los cebadores M13 directo, M13 reverso y T7.	Invitrogen
pEGAD	Kan ^r (bacterias) y Basta ^r (plantas).	pBin19
pYFN43	Kan ^r	pMDC43
pYFC43	Kan ^r	pMDC43
pBin19G1	Kan ^r	pBin19

pGreenII 0800-5 LUC+	Kan ^r	pGreenII 62-SK
pEarleyGate100	Kan ^r (bacterias) y Basta ^r (plantas).	Invitrogen
pGreenII0029	Kan ^r	JIC
pCHF3	Spec ^r (bacterias), Kan ^r (plantas), con terminador.	

Tabla 4. Plásmidos utilizados en esta tesis.

Amp^r: Resistencia a ampicilina. Kan^r: Resistencia a kanamicina. Spec^r: Resistencia a espectinomicina. Hyg^r: Resistencia a hygromicina. *lacZ*: región N-terminal del gen de la β -galactosidasa.

1.3.2. Construcciones realizadas.

Ver anexo II.

2. Tratamientos aplicados a plantas.

2.1. Aplicación exógena de NPA.

Se sembraron en tierra diferentes mutantes nga junto con el control Columbia y se estratificaron las bandejas durante una semana con el fin de sincronizar la germinación de las semillas. Una vez sacadas las bandejas al fitotrón y transcurridas tres semanas y media una de ellas fue tratada mediante pulverización con una disolución de NPA a 100 μ M con silwet L-77 al 0.01% y otra con una solución control con silwet L-77 al 0.01%. Las bandejas fueron tratadas un mismo día dos veces, con un margen de siete horas entre tratamiento y tratamiento. Una vez tratadas se taparon hasta el día siguiente para asegurarse de que el NPA penetrara en la planta. A la mañana siguiente se pulverizaron con agua destilada para eliminar el exceso de NPA y se destaparon las bandejas. Posteriormente se fijaron en FAE (ver apartado 3.1.5.1) para ser observadas al microscopio flores en estadio 12 o13.

2.2. Aplicación exógena de auxinas.

Para la microaplicación de ácido indolacético (IAA) se disolvieron 80mg del mismo en 2ml de etanol, y posteriormente se fue añadiendo poco a poco a 10g de lanolina hasta formarse una pasta homogénea. La pasta obtenida se aplicó en el extremo apical del gineceo, con la ayuda de una pipeta o espátula y bajo la lupa, hasta que la parte apical quedó completamente cubierta de lanolina. Se pintaron flores en los primeros estadios del desarrollo. Los frutos se observaron a las dos semanas del tratamiento.

3. Metodologías.

3.1. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.

3.1.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.

3.1.1.1. Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis*.

Se utilizaron dos protocolos distintos de extracción de DNA genómico, el segundo produjo mejores resultados al realizar las posteriores reacciones de PCR.

A) DNA genómica de plantas para PCR: descrito en ARABIDOPSIS A Laboratory Manual (Weigel y Glazebrook) pag: 168-169.

El material de partida fue una hoja de roseta (aproximadamente 1/2-3/4 del tamaño de una tapa de eppendorf). A la cual, tras ser machacada con la ayuda de una varilla de plástico, se le añadieron 400µL del tampón de extracción. A continuación se mezcló con el vórtex y después de ser centrifugado se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se precipitó el DNA con isopropanol, y a continuación se hizo un lavado con etanol al 70%. Eliminado completamente el etanol se resuspendió el DNA en 100µL de TE o agua miliQ.

Solución:

Tampón de extracción.

		<u>Stock</u>
200mM Tris-HCl (pH 7.5)	20mL	2M
250mM NaCl	10mL	5M
25mM EDTA (pH 8)	10mL	0.5M
0.5% SDS	10mL	10%
H ₂ O	150mL	

Volumen final	200mL	

B) Método de extracción de ácidos nucleicos para genotipado por PCR (Berendzen et al, 2005).

Se partió de aproximadamente 10mg de material (una hoja joven pequeña o un disco del tamaño de una tapa de eppendorf) y se congeló la muestra en nitrógeno líquido. A continuación se añadieron 100µl de la disolución de sacarosa y se machacó el tejido con la ayuda de una varilla de plástico autoclavada. Posteriormente se añadieron 100µl más de la disolución y se incubó inmediatamente a 95-100°C durante 10min. Tras ser centrifugado se transfirieron 100µl del sobrenadante a un tubo nuevo.

Solución:

Disolución de sacarosa.

		<u>Stock</u>
50mM Tris-HCl (pH 7.5)	0.5ml	2M
300mM NaCl	1.2ml	5M
300mM Sacarosa	2gr	
H ₂ O		

Volumen final	20ml	

C) Método de extracción de DNA genómico para análisis southern (A. Sessions, comunicación personal).

El material del que se partió fue un trozo de hoja de un tamaño 3 veces superior a la tapadera de un tubo de 1,5mL que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las hojas se machacaron en presencia de nitrógeno líquido con la ayuda de una varilla de plástico autoclavada. Se dejaron descongelar las muestras y se le añadieron 600mL de tampón de lisis al 1X. A continuación se incubaron las muestras a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo se añadieron 300mL de fenol/CHCl₃/IsoOH y se sometieron a un nuevo periodo de incubación. Tras centrifugar las muestras se transfirió la fase superior a un tubo nuevo conteniendo 50μL de NaOAc 3M (pH=5) y 550μL de isopropanol y se mezcló homogéneamente. Se centrifugaron las muestras y se decantó el sobrenadante. A continuación se lavó el DNA con etanol al 70% y una vez que se hubo evaporado todo el etanol el DNA se resuspendió en 40μL de TE.

Soluciones:

1. Tampón de lisis 10X:

		<u>Stock</u>
3.5M NaCL	35mL	5M
10mM Tris (pH=7.6)	250μL	2M
10mM EDTA (pH=8)	1mL	0.5M
dd H ₂ O	13,75mL	

	50mL	

2. Tampón de lisis 1X:

		<u>Stock</u>
1X lisis	1mL	10X
50mM EDTA	1mL	0.5M
7M urea	4,2gr	
2% Sarcosyl	0,2gr	

	10mL	

3.1.1.2. Extracción de ARN total de *Arabidopsis*.

La extracción de ARN se llevó a cabo para la síntesis de cDNA (ver apartado 3.1.3.1).

El ARN total se extrajo utilizando el kit RNeasy ® Plant Minikit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se utilizaron 4μg de ARN total en un volumen final de 20μL para la realización de un tratamiento con DNasa.

Si este ARN se iba a utilizar en una RT-PCR semicuantitativa el tratamiento adicional de eliminación del DNA genómico presente se realizó mediante tratamiento con 50 unidades Kunitz (Kunitz, 1950) de DNasa I (RNase-free DNase set (50), QIAGEN) durante 30 minutos a 37°C. Tras inactivar la enzima y centrifugar el sobrenadante se pasaba a un tubo nuevo.

Si el ARN iba a ser utilizado para una qRT-PCR se llevaba a un volumen final de 20μL y el tratamiento con DNasa se realizaba utilizando el kit Turbo DNA-free™ (Ambion) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

3.1.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Para la cuantificación de DNA y RNA se aplicó la ecuación de la Ley de Lambert-Beer que expresa que la concentración de ácidos nucleicos ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) es la absorbancia neta a 260 nm por el coeficiente de extinción molar que en el caso del DNA en solución acuosa es 50 y para el RNA es 40. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron mediante el espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies) que permite la medida directa de la concentración de una muestra sin diluir utilizando volúmenes de un

microlitro. Además se analizó la calidad de los ácidos nucleicos con la relación A_{260}/A_{280} indicando valores entre 1,7 y 2 un nivel de pureza alto.

3.1.3. Manipulación de ácidos nucleicos.

3.1.3.1. Retrotranscripción (síntesis de cDNA).

En el caso de ARN para RT-PCR semicuantitativa tras el tratamiento con DNasa la síntesis de cDNA se llevó a cabo con el Kit First Strand cDNA synthesis (Amersham Biosciences).

En el caso de ARN para qRT-PCR tras el tratamiento adicional con DNasa I se redujo el volumen de las muestras a 8µl, ya que es el volumen máximo que acepta la reacción de retrotranscripción. Para la síntesis de cDNA se utilizó el Kit Super Script™ First-Strand. Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Tras la síntesis de cDNA las muestras se diluyeron a un volumen de 90µl, en mi caso se llevaron a un volumen final de 60µl. El cDNA se cuantificó y se dejó a una concentración final de 200ng/µl.

3.1.3.2. Amplificación del DNA mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Para amplificar fragmentos de DNA se ha utilizado el método de la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) (Saiki et al., 1998), utilizando cebadores específicos y como molde DNA de diversa naturaleza incluyendo DNA plasmídico o genómico, fragmentos obtenidos por PCR o cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción del ARN.

Para amplificar fragmentos por PCR para su posterior clonación se utilizaron DNA polimerasas termoestables comerciales, concretamente la Pfu turbo DNA Polymerase (Stratagen) que se caracteriza por tener una baja tasa de error y la EcoTaq (Ecogen). Estas enzimas tienen sus propios tampones de reacción que se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El diseño de los cebadores específicos para cada gen se realizó de forma manual teniendo en cuenta la longitud (entre 16 y 25 nucleótido), contenido de GC superior al 40%, extremos 3' ricos en GC y temperatura de fusión (T^a_m) similar en cada pareja de cebadores. Los cebadores utilizados fueron sintetizados por Invitrogen. Cuando a los fragmentos amplificados se les querían añadir sitios de restricción las secuencias se añadían a los extremos 5' de los correspondientes cebadores. La información sobre los cebadores se especifica en el anexo I.

Las condiciones generales de PCR utilizadas para la amplificación de DNA han sido:

- 2µl de DNA molde.
- 2µl (1-1.25µM) de cada cebador (a una concentración de 20µM).
- 4µl (1.25 mM) de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido.
- 0.5µl de Pfu turbo DNA polymerase (STRATAGEN).
- 0.25µl de EcoTaq DNA polymerase (ECOGEN).
- 5µl de tampón de la EcoTaq DNA polymerase.
- H₂O hasta un volumen final de 50µl.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research), con las siguientes etapas:

94°C 10 min	} 30/35ciclos
94°C 30 seg	
AA°C 45 seg	
72°C B min	
72°C 5 min	
20°C infinito	

AA= temperatura óptima de hibridación de los cebadores, calculada como 4°C por debajo de la menor T^m de la pareja de cebadores, oscila entre 45 y 65°C. La T^m se calcula según la fórmula $[4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)]$.

B= tiempo de extensión, depende de la longitud del fragmento a amplificar (aproximadamente 1min por cada Kb de DNA).

3.1.3.3. Análisis "southern blot".

3.1.3.3.1. Extracción y purificación de DNA genómico.

Ver apartado 3.1.1.1-C.

Obtenido el DNA se procede a su cuantificación mediante comparación con patrones de concentración conocida en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

3.1.3.3.2. Digestión con enzimas de restricción.

Se digirió 1µg de DNA genómico con 10 unidades (1µL) de la correspondiente enzima en un volumen final de 30µL. Además también se añadió espermidina 1mM para mejorar la digestión. Transcurridas 3 horas, se añadieron otras 10 unidades de enzima y se dejó 3 horas más.

3.1.3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa.

La separación del DNA en función de su tamaño se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa, normalmente al 0,7%, de 20cm de longitud, en tampón TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 66 mM y EDTA 2 mM pH 8.0) al 1X y $8 \cdot 10^{-5}$ % (p/v) de bromuro de etidio según se indica en Sambrook, et al. (1989). La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 65V hasta que el frente de migración estuvo a unos 3cm del final del gel. El DNA se visualizó con iluminación UV para comprobar que se había digerido correctamente, obteniendo una foto del mismo. Previamente a la carga en el gel, se le añadió a las muestras el tampón de carga 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas) a una concentración final de 1x y se empleó el marcador de peso molecular GeneRulerTM DNA Ladder Mix (MBI Fermentas).

3.1.3.3.4. Transferencia.

Antes de la transferencia a la membrana el gel fue sometido a diferentes tratamientos. Se realizaron tres lavados de 2min en H₂O para eliminar el exceso de bromuro de etidio, un lavado de 30min para la desnaturalización del DNA en solución desnaturalizante (NaOH 0.5M, NaCl 1.5M). Un lavado de 2min en H₂O y finalmente dos lavados de 15min en solución neutralizante (NaCl 1.5M, Tris-HCl 0.1M pH=7).

Realizados los anteriores lavados se comprobó, con tiras de papel indicador, que el pH era neutro. El DNA fue transferido del gel a una membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham) para su posterior hibridación. La transferencia se realizó por capilaridad en presencia de un tampón de elevada fuerza iónica (SSC 20X) según el procedimiento habitual descrito por Sambrook et al. (1989), que consiste en colocar, de abajo a arriba, dos cubetas con SSC 20X separadas por una plataforma donde se colocaron las siguientes capas:

1. 2 o 3 hojas de papel Whatman empapadas en SSC 20X lo suficientemente largas para que se sumergieran en ambas cubetas. Este papel hizo de puente para la absorción por capilaridad del tampón de transferencia SSC 20X.
2. El gel bañado en SSC 20X colocado con los pocillos boca abajo y con una esquina cortada.
3. La membrana de nylon, del tamaño del gen y con la misma esquina cortada, bañada en SSC 20X, es importante que la membrana está perfectamente adherida al gel.
3. 2 o 3 papeles de Whatman del mismo tamaño que el gel.
5. Se cubrió con parafilm el papel de Whatman que comunicaba las dos cubetas evitando la zona donde estaba el gel y capas sucesivas, así prevenimos la transferencia por zonas donde no estaba nuestra muestra.
6. Encima de los 2 o 3 papeles de Whatman del tamaño del gel (paso 4), se pusieron dos montones de servilletas o papel absorbente, uno en cada sentido.
7. Finalmente, se colocó encima un vidrio o una bandeja pequeña y un peso para hacer presión sobre el gel, como podría ser una botella de un litro llena. Se dejó transferir toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, tras recuperar la membrana (manejar con pinzas) se dejó secar sobre un papel de filtro. La fijación del DNA se realizó exponiendo la cara de la membrana que había estado en contacto con el gel a iluminación UV-C en un Stratalinker UV1800 (Stratagene).

- **Tampón SSC 20X:** NaCl 3M, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (citrato trisódico) 0.3M.

3.1.3.3.5. Hibridación, lavados y detección de la señal.

Las hibridaciones se realizaron con sondas marcadas radiactivamente. Se llevó a cabo en tubos de hibridación de 4cm de diámetro y 28cm de longitud, en un horno de hibridación Roller-Blot Hybridiser HB-3D a 65°C.

Previamente a la incubación con la sonda radiactiva, la membrana se prehibridó durante 30min en 20mL de solución de hibridación (NaCl 0.6M, TrisHCl 120mM pH 8, EDTA 8mM, SDS* 0.1% p/v, pirofosfato sódico 0.1%, sulfato de dextrano 10% p/v, BSA 0.02% p/v, PVP 0.02% p/v). Posteriormente las sondas marcadas radiactivamente (5X10⁶cpm de sonda) se desnaturalizaron por ebullición a 100°C durante 5min, justo antes de utilizarla, y se enfriaron rápidamente en hielo durante 30min. A continuación se añadió la sonda radioactiva a 20mL de la solución de hibridación descrita previamente y, con ello, se hibridó la membrana. La membrana se hibridó a 65°C

durante 16 horas en un horno de hibridación. Tras la hibridación, las membranas se sometieron a un lavado con SSC 2X a temperatura ambiente, un lavado de 15min en SSC 2X a 65°C y dos lavados de 30min con SSC 0.2X, SDS* 0.5% (p/v) a 65°C. Una vez lavadas, las membranas se sellaron con una bolsa de plástico o con papel de plástico transparente y se colocaron en cassetes HipercassetteTM (Amersham Biosciences) junto con películas sensibles a rayos X Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech). Durante el tiempo de exposición se mantuvieron a -80 °C y finalmente fueron reveladas en una procesadora automática M-35-X-OMAT (Kodak).

3.1.3.4. Determinación de los niveles de transcrito.

3.1.3.4.1. PCR semicuantitativa.

Para analizar los niveles de transcrito mediante RT-PCR semicuantitativa se realizaron PCRs con oligonucleotidos específicos para cada gen de interés incluyendo en todos los casos la amplificación del gen endógeno *eIF1 α* como control de la reacción empleando como DNA molde el cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción de ARN total. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con un número de ciclos bajo con el fin de establecer una relación lineal entre la cantidad de producto amplificado y la cantidad de transcrito inicial en la reacción

La tabla 5 recoge el programa de PCR, los cebadores y las bandas esperadas en el experimento de RT-PCR semicuantitativa para el gen *NGA1* y *NGA2*.

Como control interno se utilizó el *Factor de Elongación 1 α* cuya PCR se detuvo al ciclo 22, se utilizaron los cebadote *eIF1 α 1* y *eIF1 α 2* que amplifican una banda de 500pb.

Mutante	Programa de PCR	Cebadores
nga1-4	94°C 10 min	oMNG32 y oMNG33 Amplifican una banda de 864pb
	94°C 30 seg	
	52°C 45 seg	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min	
	20°C infinito	
nga2-2	94°C 10 min	oMNG29 y oMNG30 Amplifican una banda de 717pb oMNG29 y oMNG31 (localizados antes de la inserción) Amplifican una banda de 336pb
	94°C 30 seg	
	56°C 45 seg	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min	
	20°C infinito	

Tabla 5. Programa de PCR utilizado en la RT-PCR

3.1.3.4.2. 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 30-80 % y amplicones entre

50-150 pb. En el anexo I se puede encontrar la relación de cebadores empleados para cada uno de los genes analizados.

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^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 µl empleando 10 µl de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1.2 µl de cada uno de los dos cebadores a una concentración de 5 µM para dejarlos a una concentración final 0.3 µM y 6 µl de cDNA. La mezcla de reacción SYBR[®] Green PCR Master Mix 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, el fluoróforo ROX que permite ajustar las posibles variaciones entre las muestras debidas a errores en el pipeteo, el tampón de la reacción, los dNTPs con dUTP y la enzima AmpliTaq Gold[®] DNA Polimerasa. Para cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas empleando placas MicroAmp[™] Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) y se llevaron a cabo en el aparato 7500 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, 1 min., 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 UBQ21 en las mismas muestras, según la fórmula:

$$2^{-\left(\text{Ct}_{\text{gen A}} - \text{Ct}_{\text{ACT2/8}} - \left(\text{Ct}_{\text{gen A}} - \text{Ct}_{\text{ACT2/8}} \right) \right)}$$

(muestra problema) (muestra control)

3.1.3.5. Manipulación de fragmentos de DNA necesarios para sondas o para generación de construcciones.

3.1.3.5.1. Digestión de fragmentos de DNA o de vectores plasmídicos.

La digestión de los fragmentos de DNA o de los vectores recombinantes se realizó con enzimas de restricción normalmente en un volumen final de 20 µl. A esta reacción se le añadió el tampón 1X correspondiente en cada caso, 5 U de la/s enzima/s de restricción (MBI Fermentas o Roche) y una cantidad variable de DNA según el propósito de la digestión. Las digestiones se incubaron en un termobloque Termomixer compact (Eppendorf[®]) durante un tiempo mínimo de 1 horas y máximo de 6 horas a la temperatura óptima para cada enzima. En el caso digestiones dobles se utilizaron aquellos tampones compatibles para la actividad de ambas enzimas, siguiendo las especificaciones del fabricante. Si se trataba de digestiones dobles secuenciales la

primera enzima se inactivaba por calor a la temperatura y el tiempo indicado por el fabricante y a continuación se añadía la segunda enzima.

3.1.3.5.2. Desfosforilación de vectores plasmídicos.

Para la desfosforilación de vectores plasmídicos digeridos previamente con enzimas de restricción se añadió al volumen de la digestión el correspondiente volumen del tampón de la fosfatasa al 1X y 1U de la enzima fosfatasa alcalina rAPid (Roche) por cada microgramo de vector digerido. La reacción se mantuvo 10min a 37°C en el caso de que la enzima dejase extremos 5' salientes o 30min a 37°C en caso de que los extremos fueran recesivos. Posteriormente se inactivó la enzima a 75°C durante 2min.

3.1.3.5.3. Purificación de fragmentos de DNA o productos de PCR de geles de agarosa.

Si en la PCR únicamente se amplificaba la banda de interés directamente era limpiada utilizando el Kit UltraClean™ PCR Clean-up™ Sample (MO BIO Laboratories, Inc.).

Los fragmentos de DNA y vectores que habían sido digeridos así como las PCR en las que aparecía más de una banda o se utilizaba como molde un vector eran cargadas en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TBE al 1X (Tris 90 mM, ácido bórico 66 mM y EDTA 2 mM pH 8.0) y bromuro de etidio 0.05% (p/v). La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de entre 90V y 120V. Previamente a la carga en el gel, se les añadió a las muestras el tampón de carga 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas) a una concentración final de 1x y se emplearon los marcadores de peso molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas) para localizar el tamaño de la banda esperada. La banda de interés visualizada con iluminación UV fue cortada del gel con un cuchilla y a continuación purificado el DNA.

Para la purificación del DNA se utilizó el kit Qiaex II Gel Extraction Kit y QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La extracción y purificación de DNA por este método se basa en la solubilización de la agarosa y la absorción selectiva de los ácidos nucleicos en una membrana de gel de sílice, en presencia de una elevada concentración de sal. La elución del DNA se llevó a cabo en 10mM Tris-HCl pH 8. Los fragmentos de DNA y vectores purificados se utilizaron en posteriores reacciones de ligación (ver apartado 1.3.6.).

3.1.3.6. Reacción de ligación entre fragmentos y plásmidos.

3.1.3.6.1. Clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR.

Estos fragmentos se clonaron en plásmidos intermedios que permitían su posterior secuenciación, tal como el pGem-Teasy (Promega), PCRII (Invitrogen) o PCR8 (Invitrogen). Para ello se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

3.1.3.6.2. Clonaje de fragmentos de DNA y plásmidos digeridos.

Para la clonación de los fragmentos de interés en los distintos vectores plasmídicos se llevaron a cabo reacciones de ligación con una relación estequiométrica vector:inserto de 1:1, 1:3 o 1:5 con el fin de optimizar la reacción. Para calcular la

relación molar existente (1:1) entre un fragmento y vector concreto se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad de inserto (ng)} = \frac{\text{Cantidad de vector (ng)} \cdot \text{Tamaño del inserto (kB)}}{\text{Tamaño del vector (Kb)}}$$

Las reacciones de ligación se realizaron normalmente en un volumen final de 10µl conteniendo la cantidad recomendada de vector linearizado y desfosforilado (según el caso) y de inserto, tampón de ligación 1x y 5 U de la T₄ DNA ligasa (Roche o Promega). Las reacciones se mantuvieron a 16 °C durante una noche. Los productos de las reacciones de ligación se emplearon directamente para la transformación bacteriana.

3.1.3.6.3. Clonaje de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway.

Para la clonación utilizando el sistema Gateway se mezclan en un tubo de 1.5ml entre 50-150ng (1-7µl) del vector que contiene el fragmento de interés, 150ng del vector de destino, 2µl de la enzima LR ClonaseTMII (Invitrogen) y tampón TE a pH 8 hasta completar un volumen final de 10µl. La reacción se incubó durante una hora a 25°C. Transcurrido este tiempo se añadió 1µl de la solución de proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10min.

3.1.3.7. Manipulación de microorganismos para la transformación de productos de ligación y de vectores plasmídicos.

3.1.3.7.1. Obtención de células electrocompetentes de *E.coli*.

En primer lugar, se reestiraron las células en un cultivo en placa de LB para *E.coli*, para que las células de partida fueran frescas. Posteriormente, se inocularon 25mL de medio SOC con una colonia aislada y se dejó crecer o/n a 37°C y agitación (220 rpm). Al día siguiente se inoculó un cultivo de 1L de medio SOC con 10mL (relación 1/100 v/v) del precultivo crecido o/n, y se incubó a 37°C en agitación hasta que la absorbancia fue de entre 0.5-0.8. Inmediatamente después se enfriaron en hielo entre 15min y una hora. A continuación se centrifugaron 10min a 600rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1L de glicerol al 10% a 4°C y se centrifugaron 10min a 6000rpm a 4°C. Tras decantar el sobrenadante el sedimento se resuspendió en 500mL de glicerol al 10% a 4°C y se centrifugó durante 10min a 6000rpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20mL de glicerol al 10% a 4°C. Posteriormente se centrifugaron 10min a 6000rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 o 3mL de glicerol al 10% a 4°C y se hicieron alícuotas de 40µL que fueron almacenadas a -80°C.

3.1.3.7.2. Obtención de células electrocompetentes de *A.tumefaciens*.

En primer lugar se reestiran las células en un cultivo en placa de LB con rifampicina para *A. tumefaciens*. Posteriormente se creció durante toda la noche un precultivo de 5mL de medio SOC, inoculado con una colonia aislada, en agitación (200rpm) a 28°C. A continuación se inoculó un cultivo de 200mL de medio SOC con 2mL (relación 1/100 v/v) del precultivo crecido toda la noche, y se incubó a 28°C en

agitación hasta que la absorbancia fue de entre 0.5-0.7. Inmediatamente se enfriaron las células en hielo entre 15min y una hora. Transcurrido este tiempo se centrifugaron 10min a 6500rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 200mL de glicerol al 10% a 4°C. Se centrifugó otros 10min a 6000rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100mL de glicerol al 10% a 4°C y se centrifugaron 10min a 6000rpm a 4°C. Se decantó el sobrenadante. En el siguiente paso las células se resuspendieron en 4mL de glicerol al 10% a 4°C y se centrifugó 3min a 12000rpm a 4°C. Tras decantar el sobrenadante el sedimento se resuspendió en 1mL de glicerol al 10% a 4°C. Se centrifugó 3min a 12000rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Por último, el sedimento se resuspendió en 0.5mL de glicerol al 10% a 4°C y se hicieron alícuotas de 40μL que se almacenaron a -80°C.

3.1.3.7.3. Transformación de células competentes de *E.coli* por electroporación.

La transformación de células de *E.coli* se utilizó para amplificar el DNA plasmídico. Para ello, en primer lugar se descongela en hielo una alícuota de células competentes. A continuación se añadió entre 1-2μl (20-200ng) 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 utilizó el aparato Gene PulseTM (BioRad), con las siguientes condiciones:

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

Tras el pulso eléctrico se añadió a la cubeta 1 ml de LB sin antibióticos. Las células se transfirieron a un tubo limpio e se incubaron 1 h a 37°C y 220 rpm. Transcurrido ese tiempo se plaquearon 50μl y el resto en placas de LB sólido con el antibiótico adecuado. Las bacterias se incubaron a 37°C o/n.

Las bacterias se seleccionaron por digestiones del DNA plasmídico.

3.1.3.7.4. Transformación de células competentes de *Agro* por electroporación.

La transformación de células de *Agro* se utiliza para la obtención de plantas transgénicas o para la expresión transitoria en tabaco. Se utilizaron dos cepas de *Agro*, la C58PMP90 en el caso de tratarse de un plásmido binario y la C58 portadora del plásmido auxiliar pSoup para aquellos plásmidos que no poseían todas las funciones trans necesarias para la integración del T-DNA. Al igual que en el caso de *E.coli* en primer lugar se descongela en hielo una alícuota de células competentes. A continuación se añade 1μl (20-200ng) de DNA y se homogeniza. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0.1cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo y sometió a un pulso eléctrico. Para ello se utilizó el aparato Gene PulseTM (BioRad), con las siguientes condiciones:

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

Tras la electroporación se añadió 1 ml de LB sin antibióticos a la cubeta. Las células se transfirieron a un tubo limpio y se incubaron 3h a 28°C y 200 rpm. Transcurrido ese tiempo se plaquearon 50µl y el resto en placas de LB sólido con el antibiótico adecuado. Las bacterias se incubaron a 28°C durante 2 días.

3.1.3.8. Purificación de plásmidos bacterianos.

3.1.3.8.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E.coli*.

A partir de las placas anteriores se realizaron precultivos de colonias independientes crecidas en 4ml de LB suplementado con el antibiótico adecuado, se dejaron crecer o/n a 37°C y 220rpm. El kit utilizado para la purificación fue el Fast Plasmid Mini Kit (Eppendorf). Para las preparaciones de plásmidos a media escala se partió de un volumen de cultivo bacteriano de 100 ml y el kit utilizado fue el Plasmid Midi Kit (QIAGEN).

3.1.3.8.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *Agro*.

A partir de las placas anteriores se hicieron precultivos de colonias independientes en 4ml de LB con los antibióticos correspondientes, se dejaron crecer o/n a 28°C y 200rpm. El kit utilizado para la purificación fue el FastPlasmid Mini Kit (Eppendorf). La pureza del DNA plasmídico no era suficientemente alta para poder realizar un análisis de restricción del mismo. Por ello se utilizó 1 µl de este DNA para volver a transformar E coli; de dos de los clones transformantes de E coli obtenidos de ese modo, se hizo un precultivo de 4ml y se analizó la presencia del plásmido de interés en las colonias retransformada.

3.1.3.9. Secuenciación de productos de PCR y vectores plasmídicos.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia-CSIC) mediante secuenciación automática, utilizando el sistema Abi Prism 377.

3.1.4. Diseño del microRNA artificial (Schwab *et al.*, 2006):

Para el diseño de un microRNA artificial hay que tener en cuenta una serie de requerimientos:

Para diseñar la secuencia del amiR, la cual debe tener una longitud de 21pb, hay que tener en cuenta que en la posición 1 debe haber un uracilo (U), en la posición 10 una adenina (A) y en la posición 19 una guanina (G) o una citosina (C). Además, es necesario que tenga una región 5' inestable y el contenido en GC debe estar alrededor del 50%.

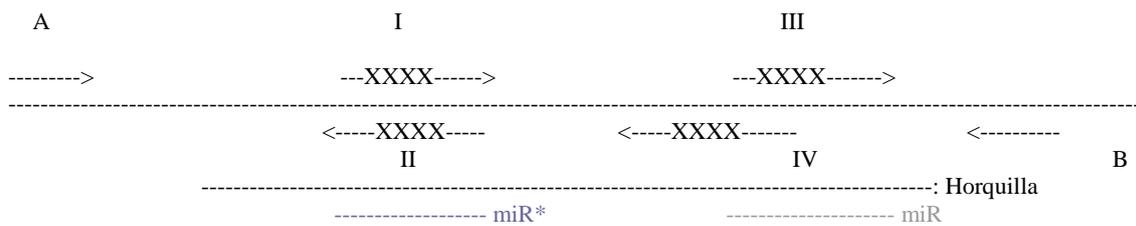
Los requerimientos para el reconocimiento de la secuencia diana son que debe emparejar con todas las secuencias diana de la posición 2 a la 12 del microRNA, no debe haber más de 3 bases diferente de la posición 13 a la 21 del microRNA y debe tener una energía libre de al menos un 75% (<-30kcal/mol) de la correspondiente a un apareamiento perfecto.

El diseño del microRNA se puede realizar con el programa “Web MicroRNA Designer” que se puede encontrar en la página <http://wmd.weigelword.org>. Este programa nos da los 4 cebadores (I al IV) específicos que necesitamos para obtener el microRNA artificial.

El molde utilizado para realizar las PCR fue el vector RS300, se trata de un vector pBluescript (SK) con el miR319a.

Para la sustitución del microRNA presente en el plásmido RS300 por el microRNA específico de los genes NGA se llevaron a cabo un total de cuatro PCRs combinando los diferentes cebadores diseñados con anterioridad (fig. 104).

1)



2) Cebadores:

A: 5' CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C 3'

B: 5' GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G 3'

3)

I	II	III	IV
miR*sense	miR*anti	miR-sense	miR-anti

4)

	Sentido	Antisentido	Molde
a	A	II	RS300
b	I	IV	RS300
c	III	B	RS300
d	A	B	a+b+c

Figura 104. Sustitución del miR319a del plásmido RS300 por el microRNA específico para los genes NGA. 1) Representación esquemática del fundamento de las PCRs a realizar en la que se señala la localización y sentido de los cebadores utilizados dentro de la horquilla y la localización de la región que se va a sustituir con las PCRs (miR* y miR). 2) Cebadores A y B, específicos del vector. 3) Nombre de cada uno de los cebadores señalados en el esquema. 4) Combinaciones de cebadores necesarios en cada PCR así como el molde sobre el cual se debe realizar.

Para las reacciones a, b, c las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

5µL Tampón Pfu (con Mg ⁺⁺).	95°C 2'	} 24 ciclos
5µL dNTPs (2mM)	95°C 30"	
2µL de cada cebador (10µM)	55°C 30"	
2µL del DNA plasmídico (dilución 1:100)	72°C 40"	
0.5µL de Pfu	72°C 7'	
33.5µL de agua	4°C infinito	
Volumen final de 50µL		

La PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE al 1X. Al igual que con el resto de PCRs se cortó la banda de interés pero cuando se llevó a cabo la purificación de la misma se resuspendió en 20 μ L de agua.

Para la reacción d las condiciones cambiaban ya que esta PCR se realizó a partir de las 3 PCRs anteriores con los siguientes parámetros:

5 μ L Tampón Pfu (con Mg ⁺⁺).	95°C 2'	} 24 ciclos
5 μ L dNTPs (2mM)	95°C 30"	
2 μ L de cebador A	55°C 30"	
2 μ L de cebador B	72°C 1'30"	
0.5 μ L PCR a	72°C 7'	
0.5 μ L PCR b	4°C infinito	
0.5 μ L PCR c		
0.5 μ L de Pfu		
34.5 μ L de agua		
Volumen final de 50 μ L		

En esta ocasión el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE al 1X. Al igual que en el caso anterior se cortó la banda y al purificarla se resuspendió en un volumen final de 20 μ L de agua.

Así se sustituyeron las regiones microRNA* y microRNA de la horquilla (azul) por una secuencia artificial (rojo) (fig. 105).

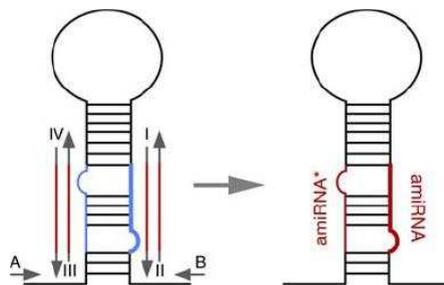


Figura 105. Esquema de la horquilla del microRNA. Se señala la localización de los cebadores utilizados para las PCR's seriadas mediante las cuales se sustituyo el microRNA de la horquilla del miR319a (representado en azul), presente en el plásmido RS300 por el microRNA específico para los genes *NGA* (representado en rojo).

El producto de PCR obtenido a partir de la reacción d se clonó en el vector pGem-Teasy y posteriormente se secuenció utilizando los cebadores T3 y T7 que forman parte del fragmento amplificado.

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

Estudio del patrón de expresión mediante hibridación “*in situ*”.

Se siguió el protocolo descrito por Cristina Ferrándiz y Allen Sessions en Weigel y Glazebrook, 2002 pag. 195- 203. Este protocolo se utilizó para analizar la expresión de los cuatro genes *NGA* en inflorescencias de plantas silvestres. Consta de los siguientes pasos:

3.1.5.1. Fijación.

Las muestras se recogieron en viales de cristal que contenían el fijador FAE. A continuación se someten a un vacío de 20 minutos tras el cual se cambió el fijado por otro fresco y dejaron las muestras a temperatura ambiente 1h30min-2h (en este punto se pueden guardar las muestras en EtOH 70% a 4°C). Transcurrido este tiempo, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación en series de etanol en concentraciones crecientes, concretamente al 70% y al 95%, de 30min cada una, tiñendo finalmente el tejido con Eosin Y en EtOH 95% a temperatura ambiente durante ~2h. A continuación se deja en esta solución durante toda la noche a 4°C.

3.1.5.2. Imbibición y moldeado de bloques.

Posteriormente se incubaron las muestras durante 1-2h en EtOH 100% y en concentraciones crecientes de histoclear (National Diagnostic) en etanol (histoclear 25%/ EtOH 75%, histoclear 50%/ EtOH 50% e histoclear 75%/ EtOH 25%). Para finalmente incubar durante 1-2h en histoclear 100%.

A continuación se añadió un volumen igual de lentes de parafina Paraplast-Plus (Sherwood Medical) o parafina fundida y se incubaron o/n a 58-60°C. Al día siguiente se sustituyó la mezcla por parafina 100% y se realizaron cambios con parafina nueva cada 3 horas hasta la total eliminación del histoclear.

Por último, se montaron las muestras y para lo cual fue necesaria una placa caliente a ~55°C, moldes metálicos y bases desechables para el microtomo. Tras enfriar los bloques a 4°C se cortaron con el microtomo a 8µm. Con la ayuda de una lupa se determinó la zona de interés, que fue la que se montó en los porta. Para ello, se cortaron las tiras en trozos de ~1.5cm (lo que es el ancho del porta) y se flotaron en un baño a 42-45°C para eliminar las arrugas del tejido.

Las tiras se recogieron con un porta rotulado con lápiz y se dejaron escurrir verticalmente hasta que no quedó agua retenida. Finalmente el tejido se fijó al porta incubándolo en una placa a 45°C o/n.

3.1.5.3. Preparación de la sonda.

En primer lugar se amplificó mediante PCR el cDNA de los cuatro genes NGA. Para NGA1 se utilizaron los cebadores oMNG17 y oMNG28 y el producto resultante se clonó en el plásmido PCR11, obteniendo el plásmido pMNG10. Para NGA2 se utilizaron los cebadores oMNG1 y oMNG2 y el producto resultante se clonó en el plásmido pGem-Teasy, al plásmido obtenido se le denominó pMNG14. NGA3 se amplificó con los cebadores OMT1 y OMT2, y el producto resultante se clonó en el plásmido pGem-Teasy (Promega) obteniendo el plásmido pMT1. Por otra parte se utilizó el plásmido CFM110 que contiene 300 pb de la región 3' codificante de NGA4 amplificada a partir del BAC F1104 con los cebadores F1104-ISHd y F1104-ISHu y clonada en el plásmido PCR11.

Para obtener la sonda se linearizaron ~5-10µg de plásmido. Las enzimas utilizadas para ello fueron XbaI para pMNG10 y pMT1, BglII para pMNG14 y BamHI para CFM110. Tras comprobar en un gel de agarosa que se había digerido por completo se precipitó con EtOH y resuspendió en H₂O. El plásmido lineal se utilizó como molde para la transcripción "in vitro", para generar las ribosondas antisentido, que se realiza en un volumen final de 20µl. A esta reacción se le añadió el tampón de la reacción de transcripción correspondiente al 1X, 40U RNasin (Protector inhibidor RNasa) (1µl),

DIG RNA-labeling mix (10X, Roche), 20U ARN polimerasa T3/T7/SP6 (Roche Diagnostics) (2 μ l) (SP6 en el caso de pMNG32 y pMT1 y T7 en el caso de pMNG14 y CFM110) y 2 μ g de DNA molde. La reacción se incubó en un termobloque durante 90min a 37°C.

Tras la incubación se añadió 1 μ l (10U) de DNasa libre de RNasa (Amersham) y se incubó 15min a 37°C. Para comprobar la transcripción se cargó 1 μ l en un gel al 1.5%.

A continuación, se precipitaron las sondas con 1 μ l de tRNA de levadura a una concentración de 10 μ g/ μ l, 25 μ l de NH₄OAc (acetato amónico) 7.5M, 220 μ l de EtOH absoluto y 36.5 μ l de H₂O miliQ estéril, a -80°C durante al menos una hora. Transcurrido ese tiempo se centrifugó 30min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó con EtOH 80%, evaporado totalmente el etano se resuspendió en 10 μ l de H₂O miliQ estéril. En este punto se puede guardar la sonda a -80°C hasta su cuantificación.

3.1.5.4. Cuantificación de la sonda.

Con 1 μ l de la sonda se prepararon diluciones 1/20, 1/250, 1/1000 y 1/2500. A los 19 μ l de sonda restantes se les añadió 91 μ l de tampón de hibridación (guardar a -80°C). Aplicamos 1 μ l de cada dilución a una membrana de nailon (“dot blot”) y cuando estuvo seca realizó un “cross-link” para fijar la sonda con luz UV.

El revelado de la membrana se realizó con una tira control con distintas concentraciones de ARN marcado con digoxigenina (*RNA Scripts Test*, Roche Diagnostics; fig. 106) en un tubo desechable (como para crecer cultivos) de ~15ml. Se mojaron las tiras en TBS 1X durante ~2min, a continuación se incubaron en “blocking/TBS” durante ~10min, y en TBS 1X con el anticuerpo Anti-DIG-Ab (1/3000) durante ~15min. La membrana se lavó en tampón de detección sin sustrato durante ~1min y finalmente se reveló con tampón de detección con sustrato (150 μ l de NBT (100 mg/ml) y 150 μ l de BCIP (50 mg/ml) por cada 100 ml de tampón; Roche Diagnostics) hasta que se vea en la tira control el último punto o sino se dispone de tira control durante 12min.

La concentración de sonda a utilizar en cada caso fue la que más se aproximó al penúltimo punto de la tira. Tener en cuenta que la sonda de la que partíamos ya la hemos diluido 1/10, de modo que la concentración final que tenemos en el tampón de hibridación y que corresponde a cada punto es 1/2, 1/25, 1/100 y 1/250.

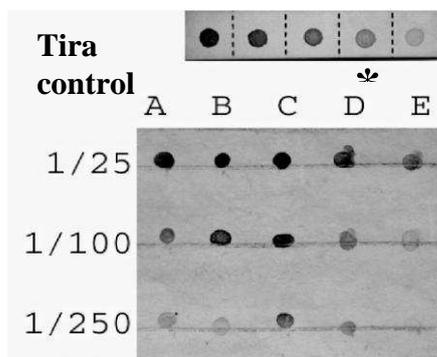


Figura 106. Cuantificación simultánea de varias ribosondas (A-E). En la parte superior aparece una tira control que contiene cantidades estandarizadas de ARN marcado con digoxigenina. La concentración de sonda cuya mancha se aproxime al penúltimo punto de la tira (asterisco) es, en principio, la más adecuada.

3.1.5.5. Prehibridación.

Desparafinar los cortes mediante dos lavado con histoclear(HC) 100% durante 10min. Hidratar los cortes en series crecientes de EtOH de ~2min cada uno (2X 100%,

95%, 70%, 50%, 35%) para finalmente realizar dos lavados con H₂O miliQ estéril de ~2min.

A continuación se llevó a cabo la hidrólisis de las proteínas mediante un tratamiento de 20min en HCl 0.2M a temperatura ambiente. Posteriormente se sometió al tejido a una incubación con proteinasa K (1µg/ml) en el tampón de la proteinasa al 1X durante 15min a 37°C. Los portas se lavaron en PBS 1X durante 2min y se bloqueó la proteinasa K con 2mg/ml de glicina (limpia, de alta pureza) en PBS 1X durante 2min. Posteriormente se realizaron dos lavados de dos minutos en PBS y se refijó el tejido en 4% de formaldehído en PBS (30ml del FA 37% en 270ml de PBS) durante 10min. Transcurrido ese tiempo se llevaron a cabo dos lavados de 5min en PBS y, nuevamente, se deshidrató el tejido en series de EtOH de 2min cada una (2X H₂O miliQ esteril, 30%, 50%, 70%, 95% y 2X 100%). Finalmente se escurrieron y secaron los portas mediante un vacío de 20min o bien se dejaron secar en al campana durante al menos 1h.

3.1.5.6. Hibridación y lavados.

En primer lugar se diluyó la sonda, a la concentración adecuada, en tampón de hibridación y se desnaturalizó a 80°C durante 2min. Mientras los portas se precalientan a 45°C en una placa. Se aplicaron 300µl de sonda en un porta y se colocó otro porta enfriado encima (a modo de “sándwich”). Gracias al sistema *Probe-On-Plus*, al enfrentar los portaobjetos en forma de sándwich con los tejidos hacia el interior, se genera un espacio donde la solución de hibridación contacta con el tejido. Los portas se incubaron toda la noche en una caja húmeda bien sellada con film a la temperatura de hibridación (50-54°C).

Al día siguiente se separaron los portas en solución de lavado (formamida al 50% en SSC 2X) y se hicieron dos lavados de 90min a la temperatura de hibridación.

3.1.5.7. Inmunodetección.

Se lavaron los portas en TBS durante 5min. A continuación se pasaron a jarras Coplin y se incubaron en solución bloqueante (0.5% Roche blocking en TBS) durante 1h. Transcurrido ese tiempo se lavaron en 1%BSA/0.3%(v/v) Triton X-100/TBS durante 30min. Posteriormente se incubaron entre 90-120min en la solución anterior con el anticuerpo anti-DIG-ab (dilución 1:3.000) (AP conjugated anti-DIG, Fab fragment (Roche)). Luego se hicieron tres lavados de 20min en 1%BSA/0.3%(v/v) Triton X-100/TBS y un lavado de 5min en tampón de detección sin sustrato (el tampón de detección está formado por el tampón de detección A y B en proporciones iguales, es decir, 1:1) que pasado ese tiempo fue sustituido por tampón de detección con sustrato. Por cada 100 ml de solución de detección se añadieron 150 µl de NBT (100 mg/ml) y otros 150 µl de BCIP (50 mg/ml). En esta solución se incubó en oscuridad durante un periodo que osciló entre una noche y varios días.

3.1.5.8. Observación de los resultados.

Para observar las muestras se paró la reacción en agua. 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 cubreobjetos y se procedió a su observación.

Soluciones:

3.7% FAE (preparar fresco).

50% EtOH	50ml	<u>Stock</u> 100%
5% Ácido Acético	5ml	Glacial
3.7% Formaldehido	10ml	37%
H ₂ O dd	<u>35ml</u>	
	100ml	

Tampón de hibridación.

SSC 6X	3ml	<u>Stock</u> 20X
SDS 3%	1.5ml	20%
50% Formamida	5ml	100%
100 µg/ml tRNA	0.1ml	10mg/ml
H ₂ O dd	<u>0.4ml</u>	
	10ml	

SSC 20X

NaCl	175.3g
Na citrato	88.2g
H ₂ O dd	<u>800ml</u>
Ajustar el volumen a 1L	

PBS 20X (autoclavado).

NaCl	160g
KCl	4g
Na ₂ HPO ₄	28.8g
KH ₂ PO ₄	4.8g
H ₂ O dd	<u>700ml</u>
Ajustar el pH a 7.4 y llevar a 1L	

Tampón proteinasa K 5X (autoclavado).

Tris 0.5M	60.55g
EDTA 0.25M	93.06g
Ajustar el pH a 8 y llevar a 1L	

TBS 10X (autoclavado).

Tris (pH7.5) 1M	121.1g
NaCl 4M	233.6g
Ajustar el volumen a 1L	

Tampón de detección 10X (autoclavado).

<u>Tampón de detección A 10X</u>	
Tris (pH9.5) 1M	121.1g
NaCl 1M	58.4g
Ajustar el volumen a 1L	

<u>Tampón de detección B 10X</u>	
MgCl ₂ 0.5M	101.6g
MgCl ₂ .6H ₂ O	
Ajustar el volumen a 1L	

3.2. Metodología de plantas.

3.2.1. Fertilización cruzada.

Durante todo el trabajo ha sido necesaria la fertilización cruzada de plantas de *Arabidopsis* para la obtención de dobles, triples y cuádruples mutantes. El procedimiento para cruzar plantas de *Arabidopsis* consiste en emascular la flor madre eliminando los estambres cuando aún son inmaduros. La flor padre se cogió en antesis, 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.

3.2.2. Esterilizado de semillas.

Las semillas se esterilizaron utilizando un método basado en alcoholes. En primer lugar se colocó en un tubo de 1.5ml la cantidad correspondiente de semillas. A cada tubo se le añadieron 900µL de una solución de esterilizado (compuesta por etanol 70% (v/v) y 0.005% Tritón X-100 (v/v)) y se agitaron durante 3min. Tras eliminar la solución anterior, se añadieron 900µL etanol 96% (v/v) y se agitó durante 1min. Transcurrido ese tiempo se tomaron con la pipeta las semillas y se depositaron encima de un papel de filtro estéril que previamente habíamos doblado por la mitad, para facilitar la diseminación de las semillas. Una vez se había evaporado el alcohol y ayudándonos con unas pinzas y una punta estéril se fueron distribuyendo las semillas uniformemente por la placa. Finalmente se sellaron las placas con esparadrapo (MicroporeTM) y se mantuvieron durante 3 días a 4°C en oscuridad. Pasados estos 3 días se trasladaron a la cabina de cultivo in vitro.

3.2.3. Obtención de plantas transgénicas

Para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron plantas silvestres del ecotipo Columbia 0. La transformación se realizó siguiendo una versión modificada del método descrito por Bechtold et al., (1993) en el que se utiliza el detergente Silwet L-77 (LEHLE SEEDS; Clough y Bent, 1998) para facilitar la entrada de la bacteria.

Se sembraron aproximadamente 60 semillas en macetas de 11 cm de diámetro y se crecieron en el fitotrón en condiciones de día largo. A medida que iban creciendo se fueron eliminando plantas para que no crecieran demasiado apretadas, dejando aproximadamente 30 semillas por maceta. Una vez las plantas habían hecho la transición floral y cuando la última hoja caulinar se había separado unos 2-3 cm del ápice de la inflorescencia principal, éste se decapitó para eliminar la dominancia apical e inducir así la proliferación de las inflorescencias laterales. Una vez decapitadas, las plantas se dejaron unos 4 días más antes de la infiltración. Tres días antes de la infiltración (día -3) se inocularon, en un tubo de 50ml, 10 ml de LB, con 100 µg/ml de rifampicina y el antibiótico correspondiente, con la cepa de *A.tumefaciens*, portadora de la construcción de interés, y se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28°C, con agitación de 200 rpm. Al día siguiente (día -2), se inocularon 600 ml de medio LB (en un matraz de 1L) suplementado con el antibiótico correspondiente con el precultivo de 10 ml y se dejó crecer durante 48h a 28°C con agitación. El día de la infiltración (día 0) a las plantas se les quitaron todas las silicuas fertilizadas así como las flores abiertas o semiabiertas. Paralelamente, se precipitaron las células a 6000rpm durante 15min y posteriormente, el sedimento se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2.2 g/l sales MS (Duchefa), 5% sacarosa, 100 mg/l MES, pH 5.9) al que previamente se le habían añadido 10µl de B.A.P (stock a 1mg/ml). La solución de infiltración se vertió en una fiambarrera del tamaño de la maceta y se le adicionaron 100µl del detergente Silwet L-77. Posteriormente, sobre la fiambarrera se volcó la maceta de manera que los ápices quedaran bien introducidos en el líquido. El montaje se colocaba en una campana de vacío conectada a una bomba de vacío (Bomba EDWARDS RV3, 110-120/220-240V, 50-60Hz, monofásica A652-01-903), donde transcurridos 8seg se sometía a vacío durante 1 min (presión total final: 3×10^{-2} mbar, 3 Pa). El tiempo se empezaba a contar

cuando la suspensión de *Agrobacterium* empezaba a burbujear. Por último, las macetas se cubrieron con bolsas de plástico y se devolvieron a la cabina donde crecieron. Al día siguiente (día +1) se le hicieron agujeros a la bolsa para que no acumularan agua y un día más tarde (día +2) se elimina por completo. Las plantas se cultivaron hasta obtener semillas maduras. Cuando las silicuas de las plantas transformadas empezaban a amarillear se recogieron las semillas, se guardaron en bolsas de celofán y se incubaron en una estufa a 37°C durante al menos una semana. Para posteriormente llevar a cabo su selección.

3.2.4. Selección de semillas transgénicas.

Para la selección de transformantes primarios, las semillas, una vez esterilizadas, se sembraron en placas de Petri de 15 cm de diámetro con medio de cultivo y el antibiótico correspondiente. Por placa se sembraron aproximadamente 30 mg de semillas, que equivalen a unas 1500 semillas. Transcurridos 12-15 días desde la siembra, los transformantes eran claramente identificables por el color verde de sus hojas y su raíz elongada. Éstos fueron transplantados a alveolos y colocados en fitotrones.

En el caso de transformantes secundarios y terciarios se contaron 60 semillas por línea y tras ser esterilizadas se colocaron, con la ayuda de unas pinzas, en placas de Petri de 8.5 cm de diámetro con el correspondiente medio de selección. En el caso de transformantes secundarios nos quedamos con aquellas líneas que cumplían las proporciones 3:1, relativa a las segregación mendeliana para un único gen, serían líneas que únicamente tenían una copia del transgen. Para los transformantes terciarios nos interesaban aquellas líneas en las que todas las plantas fueran resistentes, es decir, que crecieran en medio selectivo, ya que dichas plantas era homocigotas para el transgen.

3.2.5. Análisis molecular de plantas mutantes.

3.2.5.1. Comprobación de genotipados por PCR.

3.2.5.1.1. Mutantes *nga*.

La tabla 6 recoge las condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes *nga*, así como los tamaños de las bandas esperadas en gel.

Tabla 6. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar los mutantes *nga*. Se indican los tamaños de las bandas esperadas.

Mutante	Programa de PCR	Cebadores (Anexo I)	Bandas en el WT	Bandas en el mutante
nga1-4	94°C 10 min	otl2Rwt SS071 p745	otl2Rwt/SS071 1Kb otl2Rwt/p745 No banda	otl2Rwt/SS071 No banda otl2Rwt/p745 452pb
	94°C 30 seg			
	56°C 45 seg			
	72°C 1 min			
	72°C 5 min			
	20°C infinito			
nga2-2	94°C 10 min	oMNG14 oMNG15 En8130	oMNG14/oMNG15 700pb oMNG14/En8130 No banda	oMNG14/oMNG15 No banda oMNG14/En8130 600pb
	94°C 30 seg			
	55.6°C 45 seg			
	72°C 1 min			
	72°C 5 min			
	20°C infinito			

nga3-3	94°C 10 min	} 35x	SS044	SS044/SS043	SS044/SS043
	94°C 30 seg		SS043	1.5Kb	2Kb
	62.5°C 45 seg		En8130	SS044/En8130	SS044/En8130
	72°C 2 min			No banda	1.2Kb
	72°C 5 min				
	20°C infinito				
nga4-3	94°C 10 min	} 35x	SS065	SS065/SS066	SS065/SS066
	94°C 30 seg		SS066	1Kb	No banda
	60°C 45 seg		En8130	SS065/En8130	SS065/En8130
	72°C 1 min			No banda	0.4Kb
	72°C 5 min				
	20°C infinito				

La reacción de PCR utilizada en el genotipado de los mutantes nga contenía, en un volumen final de 25 μ l:

DNA	2 μ l
Cebador 1	1 μ l (1.25 μ M)
Cebador 2	1 μ l (1.25 μ M)
dNTPs	2 μ l (1.25 mM)
MgCl ₂	2 μ l (1.25 mM)
EcoTaq(Ecogen) (DNA polimerasa)	0.75 μ l
Tampón de PCR 10X (Ecogen)	2.5 μ l
H ₂ O (miliQ estéril)	13.75 μ l

3.2.5.1.2. Otros mutantes.

La tabla 7 recoge las condiciones ya publicadas de PCR para genotipar distintos mutantes utilizados, así como los tamaños de las bandas esperadas en el gel.

Tabla 7. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes. Se indican los tamaños de las bandas esperadas.

Mutante	Programa de PCR	Cebadores (Anexo I)	Bandas en el WT	Bandas en el mutante
sty1-1 (Kuusk et al., 2002)	94°C 10 min	} 40x	SRSM	SRSM/Dspm1
	94°C 30 seg		Dspm1	No banda
	60°C 45 seg		EST3	SRSM/EST3
	72°C 3 min			830pb
	72°C 5 min			
	20°C infinito			
sty2-2 (Kuusk et al., 2002)	94°C 10 min	} 40x	Bc DNA1	Bc DNA1/Bc DNA2
	94°C 30 seg		Bc DNA2	1700pb
	62.5°C 45 seg		SRS2:E	SRS2:E/Dspm1
	72°C 2.5 min		Dspm1	No banda
	72°C 5 min			
	20°C infinito			
shp1	94°C 10 min	} 35x	SHP1 A	SHP1 A/SHP1 B
	94°C 30 seg		SHP1 B	871pb
	62.5°C 45 seg		SHP1 T-DNA	SHP1 A/SHP1 T-DNA
	72°C 2 min			No banda
	72°C 5 min			
	20°C infinito			

shp2	94°C 10 min	} 35x	SHP2 A	SHP2 A/SHP2 B	SHP2 A/SHP2 B
	94°C 30 seg		SHP2 B	1.5Kb	2.8Kb
	60°C 45 seg				
	72°C 1 min				
	72°C 5 min				
	20°C infinito				

De entre los mutantes utilizados algunos era necesario genotiparlos por dCAPS (Neff et al., 1998). En la tabla 8 se explica el programa utilizado así como los cebadores y enzimas.

Tabla 8. Condiciones de PCR utilizadas para genotipar otros mutantes por dCAPS. Se indica la enzima utilizada así como los tamaños de las bandas esperadas.

Mutante	Programa de PCR	Cebadores (Anexo I)	Enzima usada	Bandas en el WT	Bandas en el mutante
crc-1	94°C 10 min	} 40x	CRC CAPS F1 CRC CAPS R1 Banda 714pb CRCGENF1 CRCGENR1 Banda 164pb	MwoI	Corta
	94°C 10 seg				2 bandas
	53°C 15 seg				150pb
	72°C 10 seg				14pb
	72°C 5 min				
	20°C infinito				
spt-2	94°C 10 min	} 30x	OMT15 OMT16 Banda de 207pb	BseLI	Corta
	94°C 10 seg				2 bandas
	50°C 15 seg				182pb
	72°C 1 min				25pb
	72°C 5 min				
	20°C infinito				
ett-3	94°C 10 min	} 30x	OMT13 OMT14 Banda de 181pb	BseLI	Corta
	94°C 10 seg				2 bandas
	56°C 15 seg				157pb
	72°C 1 min				24pb
	72°C 5 min				
	10°C infinito				
ful-2	94°C 10 min	} 30x	ful-2F ful-2 R Banda de 291pb	ApaI	No corta
	94°C 10 seg				291 pb
	56°C 15 seg				263pb
	72°C 1 min				28pb
	72°C 5 min				
	20°C infinito				
ind1-2 (Liljegren et al., 2004)	94°C 10 min	} 30x	GT140-P GT140-Q Banda de 30pb	AluI	Corta
	94°C 30 seg				2 bandas
	55°C 45 seg				100pb
	72°C 1 min				30pb
	72°C 5 min				
	20°C infinito				

3.2.6. Análisis fenotípico de plantas mutantes y líneas transgénicas.

3.2.6.1. Fotografía a bajo aumento.

Para obtener imágenes a bajo aumento, como es el caso de fotografías de roseta o de plantas enteras, se utilizó una cámara digital Lumix. Para la obtención de imágenes a mayor aumento, se utilizó una lupa binocular Nikon modelo SMZ800 provista de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Volpi Intralux 4000-1) y conectadas a una cámara digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y una lupa binocular Leica MZ16F conectada a un ordenador con el software de análisis de imagen Leica Application Suite V3.

3.2.6.2. Técnicas microscópicas.

3.2.6.2.1. Microscopia óptica.

Los cortes histológicos y las muestras montadas en portaobjetos fueron observados y fotografiados mediante un microscopio Nikon Eclipse E-600 acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y un ordenador con el software de análisis de imagen AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System) y NIS-Elements F3.0. En función del tipo de muestra y que se pretendía visualizar las muestras fueron observadas con iluminación de campo claro, utilizando la técnica Normasky que permite detectar cierto volumen en las muestras o con iluminación de campo oscuro.

3.2.6.2.2 Microscopia electrónica de barrido.

En un primer momento las fotos se realizaron utilizando un criomicroscopio. Con el cual se evitaba la necesidad de fijar las muestras para su estudio. Para ello se hizo uso del criomicroscopio del servicio de microscopia de la Universidad Politécnica de Valencia. El microscopio electrónico de barrido utilizado fue el Microscopio JEOL, modelo JSM 5410, Instrumental de CRIOSEM CT 15000-C (Oxford Instruments).

En el caso de necesitar manipular las muestras (eliminar sépalos, pétalos y estambres) o eliminar las ceras presentes en la superficie del fruto, 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. Posteriormente, fue sometido a un pulso de vacío de 20min o en su defecto, hasta que las muestras cayeron al fondo del vial. El material se mantuvo en FAE toda la noche a cuatro grados y al día siguiente se sustituyó por etanol al 70%. En este punto las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente a 4°C hasta el momento en que vayan a ser analizadas al microscopio. Al día siguiente, se incubaron las muestras durante 30min en etanol al 80%, 30min en etanol al 90% y finalmente una 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 llevo 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 oro-paladio de 200 nm, en atmósfera de argón ionizado en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC). Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma ISIS (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200 s por imagen, en un

microscopio electrónico JEOL, modelo JSM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de entre 10-15 kV y una distancia de trabajo de 25 mm.

3.2.6.2.3. 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 láser (458nm, 488nm, 514nm y 534nm). La GFP se excitó con un láser de 488nm, y su emisión se recogió entre 500nm y 520nm (máximo de emisión: 509nm). La clorofila se excitó con el mismo láser, y su emisión se recogió entre 660nm y 690nm. 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.

3.2.7. Técnicas de histología vegetal.

3.2.7.1. Obtención de cortes histológicos.

Para ello se utilizó un microtomo Microm HM330. Los cortes se realizaron a 8 μ m (12 μ m en el caso de las que se tiñeron con floroglucinol) con cuchillas Accu-Edge (Bakura), los cortes se seleccionaron mediante visualización al microscopio óptico. Los cortes de interés se extendieron en un baño con agua destilada a 42°C para posteriormente colocarlos en el portaobjetos. Las secciones se desparafinaron con HistoClear (National Diagnostics).

3.2.7.2. Tinciones.

3.2.7.2.1. Tinción con floroglucinol.

Se siguió el protocolo descrito por Sarah Liljegren en Weigel y Glazebrook, 2002 pág.96-97. El floroglucinol se utilizó para estudiar la lignificación de las células ya que tiñe las ligninas de color rojo. Tras realizar cortes en parafina de frutos en estadio 17 para adelante (ver apartado 2.7.2) de 12 μ m, los portas se sumergieron durante 30 minutos en floroglucinol (Sigma P 3502) al 2% en etanol 95%. A continuación se aclararon en HCl al 50% hasta que se observaba que los cortes empezaban a teñirse (aproximadamente 3min) y se examinaron al microscopio óptico (ver apartado 2.6.2.1).

3.2.7.2.2. Aclarado con hidrato de cloral para la observación de los haces vasculares.

Se utilizó el protocolo de Sioux Christensen propuesto en Weigel y Glazebrook, 2002 pág.104-105. Mediante este protocolo, se aclararon los tejidos vegetales, permitiendo que se pudieran observar los haces vasculares utilizando microscopía de campo oscuro.

Se fijaron las muestras, concretamente inflorescencias o gineceos, en una mezcla de etanol: ácido acético glacial (6:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Se reemplazó la mezcla de etanol: acético por etanol al 100% y se incubaron las muestras 30 minutos a temperatura ambiente. Este proceso se repitió dos veces. A continuación, se quitó el etanol y se reemplazó con una disolución de hidrato de cloral: hidrato de

cloral/ glicerol/ agua (8g/1ml/2ml), se mantuvo en esta disolución durante 48 horas. Posteriormente se montaron las muestras en glicerol al 10%. Previamente se colocó en los extremos del portaobjetos 3-4 pegatinas pequeñas de forma que quedara espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos evitando así que las muestras se aplastaran. Para visualizar las muestras clareadas con hidrato de cloral al microscopio se utilizó la iluminación de campo oscuro.

3.2.7.2.3. Detección de la actividad β -glucuronidasa mediante tinción histoquímica.

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado distintos protocolos para la detección in situ de la actividad β -glucuronidasa dependiendo del experimento que se estuviera realizando. La actividad GUS puede ser determinada con tinción histoquímica mediante el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc) indicando, las zonas teñidas de azul, los dominios físicos de expresión del gen de interés en los órganos analizados.

Para realizar detecciones poco precisas se siguió un protocolo rápido. En este caso únicamente se pretendía descartar plantas que no fueran portadoras del gen delator, bien porque eran necesarias para la realización de cruces o bien para descartar plantas de generaciones F1 y F2, procedentes de un cruce con una línea portadora del gen delator GUS. Se cogieron flores o frutos en placas de 96 pocillos (Iwaki microplate) con el tampón de tinción (NaH_2PO_4 13.42mM a pH 7.2, Na_2HPO_4 11.58mM a pH 7.2, ferrocianuro potásico 0.5mM, ferricianuro potásico 0.5mM, EDTA 10mM y Tritón X-100 al 0.2%) suplementado con X-gluc 2mM. Las muestras se incubaron durante una noche a 37°C y en oscuridad. Posteriormente las muestras se observaron en una lupa binocular (apartado 2.6.1), en algunos casos en los que la señal no se detectaba con claridad, previamente a la visualización las muestras se sometieron a varios lavados con etanol 70%.

Para realizar detecciones GUS más precisas se siguió el protocolo descrito por Kirsten Bomblies en el Manual de Arabidopsis (Weigel y Glazebrook, 2002) pág. 243-245 con algunas modificaciones.

Los frutos e inflorescencias de plantas portadoras de construcciones con el gen delator GUS se recogieron en acetona fría al 90%, en esta solución se mantuvieron durante 20min a temperatura ambiente. A continuación, se hizo un lavado de 5min con agua. Posteriormente, las muestras fueron infiltradas al vacío durante 20min, o en su defecto hasta que las muestras cayeron al fondo, con el tampón de tinción (tampón fosfato 50mM pH 7, ferricianuro potásico 2mM, ferrocianuro potásico 2mM, Tritón X-100 0.2%) suplementado con X-gluc 2mM y se incubaron a 37°C y oscuridad toda la noche. El ferrocianuro y el ferricianuro tamponan el estado redox del tampón de tinción y el producto derivado de X-gluc precipita en el lugar donde se localiza la proteína GUS, indicando por tanto la localización espacial y temporal del gen cuyo promotor controla la expresión del gen GUS en la planta. El tampón de tinción fue eliminado por series de etanol al 20%, 35% y 50% a temperatura ambiente durante 30min cada serie, y a continuación, se fijaron las muestras en FAE (50% etanol, 10% ácido acético glacial, 5% formaldehído) durante 30min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se pasaron a etanol al 70%. En esta solución se pueden mantener indefinidamente. Previamente a la visualización, y tras estar las muestras durante al menos un día en etanol al 70%, el tejido fue aclarado con una mezcla de hidrato de cloral/glicerol/agua (8:1:2) (p/v/v) durante al menos 2 días. Las muestras se observaron y fotografiaron

mediante una lupa binocular equipada con una cámara digital (apartado 2.6.1) o mediante un microscopio óptico utilizando la técnica Normasky (apartado 2.6.2.1)

Nota: Las concentraciones elevadas de ferrocianuro y ferricianuro (ej. 10mM) restringen el nivel de señal GUS, mientras que concentraciones más bajas permiten detectar señales GUS más débiles (Sessions et al., 1999). Por lo tanto, se optimizaron las concentraciones de ferrocianuro y ferricianuro en función de la línea GUS que se analizaba. Así pues, para la tinción GUS de las líneas SPT_{PRO}:GUS, FUL_{PRO}:GUS y SHP1_{PRO}:GUS, SHP2_{PRO}:GUS y YUC2_{PRO}:GUS la concentración final de ferrocianuro potásico y ferricianuro potásico fue de 10 mM, para el resto de líneas fue de 2mM.

4. Expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

La expresión transitoria se utilizó para llevar a cabo dos tipos de estudios diferentes, en primer lugar se utilizó para ensayos de BiFC y posteriormente también para realizar ensayos de Luciferasa.

4.1. Ensayo BiFC.

Con el ensayo de BiFC nuestro objetivo es comprobar si dos proteínas de interés interaccionaban. Para ello, se utilizaron dos plásmidos de Gateway los cuales poseían cada uno de ellos una mitad de la proteína YFP, de ahí sus nombres YFN (contiene la mitad C-terminal de la proteína) e YFC (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 movilidad de la proteína de fusión (fig. 107). Para más información sobre estos vectores se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>. Como controles positivos se utilizaron los plásmidos YFP^N-IN α e YFP^C-IN β , los cuales poseían una mitad de la proteína ubiquitina (estos plásmidos fueron facilitados por el Dr. Alejandro Ferrando).

Se clonó la región codificante de los genes de interés en la región C-terminal de la mitad de la proteína.

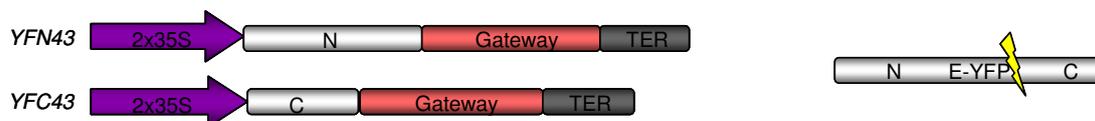


Figura 107. Esquema de las construcciones utilizadas para el ensayo de interacción proteína-proteína *in vivo*. Estos plásmidos constan de un promotor 35S por duplicado, la región C-terminal (C) o N-terminal (N) de la proteína YFP, el casete de Gateway donde se clonó el gen y un terminador.

Obtenidas estas construcciones e introducidas en la cepa de *Agrobacterium* C58, se inocularon cultivos, bien con el glicerinado de Agro directamente o bien con una colonia fresca procedente de placa, en 5mL de medio YEB suplementado con los antibióticos apropiados y se creció o/n a 28°C.

Al día siguiente, se transfirió el cultivo a 50ml de medio de inducción con los correspondientes antibióticos en un matraz de 250ml y se creció o/n a 28°C. Se centrifugaron los cultivos durante 30min a 3000rpm. El sedimento se resuspendió en medio de infiltración 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 (30rpm) o/n a temperatura ambiente.

A la mañana siguiente se realizaron las correspondientes mezclas de cultivos (en caso de co-transformación) y con la ayuda de jeringuillas de 5ml se infiltraron hojas de *Nicotiana Benthamiana* por el envés de la misma. Se eligieron hojas jóvenes (normalmente la 3ª y 4ª hoja). Las hojas se observaron al microscopio confocal transcurridos 2-3 días.

Medios de cultivo:

Medio YEB:

0.5% Extracto de hueso.

0.1% Extracto de levadura.

0.5% Peptona.

0.5% Sacarosa.

pH 7.4

Tras ser autoclavado se le añade MgSO_4 2mM filtrado.

Medio de inducción:

0.5% Extracto de hueso.

0.1% Extracto de levadura.

0.5% Peptona.

0.5% Sacarosa.

10mM MES pH 5.6

Y tras ser autoclavado se le añade:

2mM MgSO_4 *.

20 μ M acetosiringona *.

Medio de infiltración:

10mM MgCl_2 (filtrado).

10mM MES pH 5.6 (autoclavado).

200 μ M acetosiringona *.

* Esterilizados por filtración.

4.2. Detección de actividad Luciferasa.

En el ensayo de Luciferasa se estudia el posible papel regulador de distintos factores de transcripción en la expresión de un determinado promotor.

Para la infiltración de las hojas se sigue el mismo protocolo que en el ensayo de BiFC.

Transcurridos tres días, desde la infiltración, se recogieron 2cm de discos de hoja por combinación infiltrada, estos discos se introdujeron en una placa de 96 pocillos de 2cm de profundidad, que permanece en nitrógeno líquido para congelar la muestra de forma inmediata. A continuación, se machacaron las muestras y se añadieron 750 μ l del tampón de lisis al 1X (Promega). Se transfirieron 5 μ l del extracto a una placa blanca y opaca y, posteriormente, se le añadieron 30 μ l del reactivo Dual-GlowTM Luciferasa (Promega). Se agitó la placa durante 10seg y transcurridos 10min, se cuantificó en el luminómetro la luminiscencia emitida por el gen LUC durante 10seg. Para parar la primera reacción e iniciar la segunda, se añadieron 30 μ l del reactivo Dual-GlowTM STOP & GLOW (Promega) a una dilución 1/100 en el tampón correspondiente. Se agitó durante 10seg y a continuación, la placa se dejó 10min a temperatura ambiente. Finalmente, se volvió a cuantificar la luminiscencia, pero en este caso emitida por la Renilla, durante 10seg. Para cuantificar luminiscencia se utilizó un luminómetro (GlowMaxTM 96 Microplate Luminometer con dos inyectores).

5. Experimentos relacionados con auxinas.

5.1. Estudio de dominancia apical.

Se sembraron en tierra diferentes mutantes nga y el control Columbia. Tras estratificar las semillas las bandejas se sacaron al fitotrón y transcurridas cinco semanas (o cuando la inflorescencia principal mediera aproximadamente 10cm) se contabilizaron el número de inflorescencias laterales y coflorescencias o inflorescencias de la roseta en las diferentes líneas, se contaron aquellas inflorescencias cuya longitud fuera superior a 1cm.

5.2. Estudio del número de raíces laterales.

Las semillas, tanto de diferentes mutantes nga como de Columbia, se sembraron y crecieron en placas de MSS colocadas verticalmente. Transcurridos 10 días se fotografiaron las placas y se contó el número de raíces laterales de cada planta. Se contabilizaron todas aquellas raíces que se podían observar bajo la lupa.

5.3. Estudio de gravitropismo.

Se sembraron en placas cuadradas con medio MSS 10 semillas dispuestas a lo largo de una diagonal dibujada en la placa (fig. 108). Tras ser estratificadas durante 3 días a 4°C se sacaron a la cabina de cultivo “in vitro”, donde se colocaron verticalmente. Transcurridos 5 días se giraron las placas 90° y al día siguiente se midió el ángulo que formaban las raíces con respecto a la vertical.

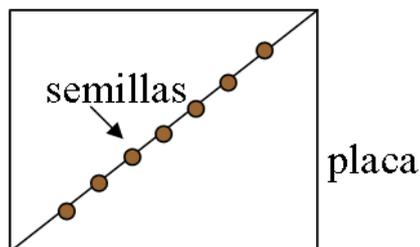


Figura 108. Diagrama de la distribución de las semillas en una placa de MSS. Se siembran 10 semillas por placa dispuestas a lo largo de una diagonal pintada en la misma, para que al girarla las raíces no se entrecrucen.

Bibliografía

- Adkins, N.L., Hall, J.A. and Georgel, P.T.** (2006). GAGA protein: a multifaceted transcription factor. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 559-567.
- Alabadí, D., Blazquez M.A., Carbonell, J., Ferrándiz, C. and Pérez-Amador, M.A.** (2009). Instructive Roles of Hormones in Plant Development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1597-1608.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. and Ullrich, C. I.** (2006). Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**, 315-28.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M. and Ullrich, C. I.** (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta* **216**, 841-53.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P. and Cheuk, R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* **301**, 653-7.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J. J., Ochando, I., Vera, A., Ferrandiz, C. and Martínez-Laborda, A.** (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Development* **134**, 2663-71.
- Alvarez, J. and Smyth, D.** (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* **126**, 2377-2386.
- Alvarez, J. and Smyth, D. R.** (2002). CRABS CLAW and SPATULA genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in Arabidopsis thaliana. *International Journal of Plant Sciences* **163**, 15.
- Alvarez, J. P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z. and Eshed, Y.** (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**, 1134-51.
- Alvarez J. P., Goldshmidt A., Efroni I., Bowman J. L. and Eshed Y.** (2009). The NGATHA Distal Organ Development Genes Are Essential for Style Specification in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **21**, 1373-1393.
- Azhakanandam, S., Nole-Wilson, S., Bao, F. and Franks, R. G.** (2008) SEUSS and AINTEGUMENTA mediate patterning and ovule initiation during gynoecium medial domain development. *Plant Physiology* **146**, 1165-1181.
- Balanzá, V., Navarrete, M., Trigueros, M. and Ferrandiz, C.** (2006). Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* **57**, 3457-3469.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S. and Sonnhammer, E. L.** (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D138-41.
- Baum, S.F., Eshed, Y. and Bowman, J.L.** (2001). The Arabidopsis nectary is an ABC-independent floral structure. *Development* **128**, 4657-4667.
- Bechtold, N., Ellis, J., 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.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G. and Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Bennett, S. R. M., Alvarez, J., Bossinger, G. and Smyth, D. R.** (1995). Morphogenesis in pinoid mutants of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **8**, 505-520.

- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I. E. and Ulker, B.** (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* **1**, 4.
- Beuchat, J., Scacchi, E., Tarkewska, D., Ragni, L., Strnad, M. and Hardtke, C.S.** (2010). BRX promoter *Arabidopsis* shoot growth. *New Phytologist*.
- Beuchat, J., Li, S., Ragni, L., Shindo, C., Kohn, M.H. and Hardtke, C.S.** (2010). A hyperactive quantitative trait locus allele of *Arabidopsis* BRX contributes to natural variation in root growth vigor. *PNAS* **107**, 8475-8480.
- Bowman, J., Baum, S., Eshed, Y., Putterill, J. and Alvarez, J.** (1999). Molecular Genetics of Gynoecium Development in *Arabidopsis*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **45**, 155-205.
- Bowman, J. and Smyth, D.** (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* **126**, 2387-2396.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. and Meyerowitz, E. M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.
- Briggs, G. C., Mouchel, C. F. and Hardtke, C. S.** (2006). Characterization of the plant-specific BREVIS RADIX gene family reveals limited genetic redundancy despite high sequence conservation. *Plant Physiol* **140**, 1306-16.
- Castillejo, C. and Pelaz, S.** (2008). A balance between CONSTANS and TEMPRANILLO directly control FT expresión to trigger flowering. *Curr. Biol.* **18**, 1338-1343.
- Chen, C., Wang, S. and Huang, H.** (2000). LEUNIG has multiple functions in gynoecium development in *Arabidopsis*. *Genesis* **26**, 42-54.
- Chen, Q., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L. and Drews, G. N.** (1999). The *Arabidopsis* FILAMENTOUS FLOWER gene is required for flower formation. *Development* **126**, 2715-26.
- Cheng Y., Dai X. and Zhao Y.** (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and development* **20**, 1790-1799.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y.** (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2430-2439.
- Clough, S.J. and Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **142** (1), 318-32.
- Clouse SD, Hall AF, Langford M. and McMorris TC** (1993). Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* **12**, 61-66.
- Coen, E.S. and 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. M. and Colombo L.** (2010). A new role for the SHATTERPROOF genes during *Arabidopsis* gynoecium development. *Developmental Biology* **337**, 294-302.
- Crawford, B. C., Ditta, G. and Yanofsky, M. F.** (2007). The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* **17**, 1101-8.
- Dinneny, J. R., Weigel, D. and Yanofsky, M. F.** (2005). A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4687-96.

- Dinneny, J. R., Weigel, D. and Yanofsky, M. F.** (2006). NUBBIN and JAGGED define stamen and carpel shape in Arabidopsis. *Development* **133**, 1645-55.
- Dinneny, J. R., Yadegari, R., Fischer, R. L., Yanofsky, M. F. and Weigel, D.** (2004). The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* **131**, 1101-1110.
- Dinneny, J. R. and Yanofsky, M. F.** (2005). Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of Arabidopsis is patterned. *Bioessays* **27**, 42-9.
- Dorcey, E., Urbez, C., Blazquez, M. A., Carbonell, J. and Perez-Amador, M. A.** (2009). Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in Arabidopsis. *Plant Journal* **58**, 318-332.
- Eklund, D.M., Ståldal, V., Valsecchi, I., Cierlik, I., Eriksson, C., Hiratsu, Ohme-Takagi, K.M., Sundström, J.F., Thelander, M., Ezcurra, I. and Sundberg, E.** (2010). The Arabidopsis thaliana STYLISH1 Protein Acts as a Transcriptional Activator Regulating Auxin Biosynthesis. *The Plant Cell* **22**, 349-363.
- Elliott, R. C., Betzner, A. S., Huttner, E., Oakes, M. P., Tucker, W. Q. J., Gerentes, D., Perez, P. and Smyth, D. R.** (1996) AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**, 155-168.
- Eshed, Y., Baum, S. and Bowman, J.** (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of Arabidopsis. *Cell* **99**, 199-209.
- Ferrándiz, C.** (2002). Regulation of fruit dehiscence in Arabidopsis. *J Exp Bot* in press.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. and Yanofsky, M.** (2000a). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**, 725-734.
- Ferrándiz, C., Liljegen, S. and Yanofsky, M.** (2000b). FRUITFULL negatively regulates the SHATTERPROOF genes during Arabidopsis fruit development. *Science* **289**, 436-438.
- Ferrándiz, C., Pelaz, S. and Yanofsky, M. F.** (1999). Control of Carpel and Fruit Development in Arabidopsis. *Ann. Rev. Biochem.* **68**, 321-354.
- Franks, R. G., Wang, C., Levin, J. Z. and Liu, Z.** (2002). SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* **129**, 253-263.
- Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Percy, F. and Goodman, H. M.** (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**, 1251-1261.
- Girin, T., Sorefan, K. and Ostergaard, L.** (2009). Meristematic sculpting in fruit development. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1493-1502.
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S. and Yoshida S** (2002). Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**, 1319-1334
- Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S. and Shimada Y.** (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **134**, 1-19.
- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S. D. and Koltunow, A. M.** (2006). AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 1873-86.
- Gomez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M. M., Angenent, G. C. and Sablowski, R.** (2005). Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* **132**, 429-38.

- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-6.
- Gregis V., Sessa A., Colombo L. and M. Kater** (2006). AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 Redundantly Control AGAMOUS during Early Stages of Flower Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**, 1373–1382.
- Gremski, K., Ditta, G. and Yanofsky, M. F.** (2007). The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. *Development* **134**, 3593-601.
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippenanderson JL and Cook JC** (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. *Nature* **281**, 216–21
- Groszmann M., Paicu T. and Smyth D. R.** (2008). Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in Arabidopsis. *The Plant Journal* **55**, 40-52.
- Groszmann M., Bylstra, Y., Lampugnani, E. R. and 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. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1495-1508.
- Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, M. F. and Martienssen, R.** (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development* **125**, 1509-17.
- Guilfoyle, T. J. and Hagen, G.** (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 453-460.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hartmann, U., Hohmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., and Huijser, P.** (2000). Molecular cloning of SVP: A negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J.* **21**, 351–360.
- Heisler, M., Atkinson, A., Bylstra, Y., Walsh, R. and 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., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-32.
- Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M.D., Karunairetnam, S. and Laing, W.A.** (2005). Transient plant expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing. *Plant Methods* **1**, 13.
- Hewitt, E. J.** (1966). Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation crops, Technical Communication N° **22**.
- Hobbie L., McGovern M., Hurwitz L.R., Pierro A., Liu N.Y., Bandyopadhyay A. and Estelle M.** (2000). The axr6 mutants of Arabidopsis thaliana define a gene involved in auxin response and early development. *Development* **127**, 23-32.
- Honma, T. and Goto, K.** (2000). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**, 525-9.
- Hu, Y. X., Wang, Y. X., Liu, X. F. and Li, J. Y.** (2004). Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Res* **14**, 8-15.

- Hunter, C., Willmann, M. R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M. and Poethig, S. R. (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 2973-81.
- Ikeda M. and Ohme-Takagi M. (2009). A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **50**(5), 970-975.
- Ichihashi, Y., Horiguchi, G., Gleissberg, S. and Tsukaya, H. (2010). The bHLH transcription factor SPATULA controls final leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51** (2), 252-261.
- Ishida, T., Aida, M., Takada, S. and Tasaka, M. (2000). Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**, 60-7.
- Jensen, P.J., Hangarter, R.P., and Estelle, M. (1998). Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **116**, 455-462.
- Kagaya, Y., Ohmiya, K. and Hattori, T. (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, bind to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research* **27**, 470-478.
- Kempin, S.A., Liljegren, S.J., Block L.M., Rounsley, S.D., Yanofsky, M.F. and Lam, E. (1997). Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* **389**, 802-803.
- Kerstetter, R., Bollman, K., Taylor, A., Bomblies, K. and Poethig, S. (2001). KANADI regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* **411**, 706-709.
- Kim, S., Soltis, P.S., Wall, K. and Soltis, D.E. (2006). Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 107-120.
- Kim, J. I., Sharkhuu, A., Jin, J. B., Li, P., Jeong, J. C., Baek, D., Lee, S. Y., Blakeslee, J. J., Murphy, A. S. and Bohnert, H. J. (2007). *yucca6*, a Dominant Mutation in *Arabidopsis*, Affects Auxin Accumulation and Auxin-Related Phenotypes. *Plant Physiol* **145**, 722-35.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986). The promoter of the T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Krizek, B.A. and Fletcher, J.C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nature Reviews Genetics* **6**, 688-698.
- Krizek, B. A., Prost, V. and Macias, A. (2000). AINTEGUMENTA promotes petal identity and acts as a negative regulator of AGAMOUS. *Plant Cell* **12**, 1357-66.
- Kuijt, S.J.H., Lamers, G.E.M., Rueb, S., Scarpella, E., Ouwerkerk, P.B.F., Spaink, H.P. and Meijer, A.H. (2004). Different subcellular localization and trafficking properties of KNOX class 1 homeodomain proteins from rice. *Plan Molecular Biology* **55**, 781-796.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Long, J. A., Fridborg, I. and Sundberg, E. (2002). STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development* **129**, 4707-17.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Eklund, D.M., and Sundberg, E. (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J.*
- Levy, Y. Y., Mesnage, S., Mylne, J. S., Gendall, A. R. and Dean, C. (2002). Multiple roles of *Arabidopsis* VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* **297**, 243-6.
- Liljegren, S. J., Ditta, G., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. and Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 766-769.

- Liljegren, S. J., Roeder, A. H., Kempin, S. A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D. K. and Yanofsky, M. F.** (2004). Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* **116**, 843-53.
- Liscum, E. and Reed, J. W.** (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**, 387-400.
- Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C. and Yu, H.** (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental Cell* **16**, 711-722.
- Liu, Z., Franks, R. G. and Klink, V. P.** (2000). Regulation of gynoecium marginal tissue formation by LEUNIG and AINTEGUMENTA. *Plant Cell* **12**, 1879-92.
- Liu, Z. and Meyerowitz, E. M.** (1995). LEUNIG regulates AGAMOUS expression in Arabidopsis flowers. *Development* **121**, 975-991.
- Magnani, E. Sjölander, K. and Hake, S.** (2004). From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* **16**, 2265-2277.
- Mandava NB** (1988) Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**, 23-52.
- McCarty, D. R., Carson, C. B., Stinard, P. S. and Robertson, D. S.** (1989). Molecular Analysis of viviparous-1: An Abscisic Acid-Insensitive Mutant of Maize. *Plant Cell* **1**, 523-532.
- McConnell, J. R. and Barton, M. K.** (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**, 2935-42.
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P. and Zentgraf, U.** (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **55**, 853-857.
- Michaels, S.D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Pelaz, S., Yanofsky, M., and Amasino, R.M.** (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *Plant J.* **33**, 867-874.
- Michniewicz, M. B. and Friml, J.** (2007). Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution. *The Arabidopsis Book*.
- Mouchel, C. F., Briggs, G. C. and Hardtke, C. S.** (2004). Natural genetic variation in Arabidopsis identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev* **18**, 700-14.
- Mouchel, C. F., Osmont, K. S. and Hardtke, C. S.** (2006). BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* **443**, 458-61.
- Mussig C, Fischer S. and Altmann T.** (2002). Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol* **129**, 1241-1251.
- Nemhauser, J., Feldman, L. and Zambryski, P.** (2000). Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development* **127**, 3877-3888.
- Nemhauser JL, Mockler TC. and Chory J.** (2004) Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol* **2**, E258.
- Neff, M., Neff, J., Chory, J. and Pepper, A.** (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. *Plant J* **14**, 387-392.
- Nole-Wilson, S. and Krizek, B. A.** (2006). AINTEGUMENTA contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with YABBY genes. *Plant Physiology* **141**, 977-987.

- Ohta , M. , Matsui , K. , Hiratsu , K. , Shinshi , H. and Ohme-Takagi , M. (2001).** Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959-1968.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. and Shimura, Y. (1991).** Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral budformation. *Plant Cell* **3**, 677-684.
- Okamoto, J. K., Caster, B., Villarreal, R., Van Montagu, M. and Jofuku, K. D. (1997).** The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7076-7081.
- Ostergaard, L. (2009).** Don't 'leaf' now. The making of a fruit. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 36-41.
- Overvoorde, P.J. and Okushima, Y. (2005).** Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **17**, 3282-3300.
- Payne, T., Johnson, S. D. and Koltunow, A. M. (2004)** KNUCKLES (KNU) encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the Arabidopsis gynoecium. *Development* **131**, 3737-3749.
- Pekker, I., Alvarez, J. P. and Eshed, Y. (2005).** Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**, 2899-910.
- Pinyopich, A., Ditta, G. S., Savidge, B., Liljegren, S. J., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M. F. (2003).** Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**, 85-8.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (1997)** Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endocrine Reviews* **18 (3)**, 306-360.
- Przemeck, G. K. H., Mattsson, J., Hardtke, C. S., Sung, Z. R. and Berleth, T. (1996).** Studies on the role of the Arabidopsis gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta* **200**, 229-237.
- Ragni, L., Belles-Boix, E., Gunl, M. and Pautot, V. (2008).** Interaction of KNAT6 and KNAT2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE in Arabidopsis Inflorescences. *Plant Cell* **20**, 888-900.
- Rajani, S. and Sundaresan, V. (2001).** The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* **11**, 1914-1922.
- Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. and Kuhlemeier, C. (2003).** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-60.
- Rédei G.P. (1962).** Supervital mutants of Arabidopsis. *Genetics* **47**, 443-460.
- Remington, D. V., Guilfoyle, T.J. and Reed, J.W. (2005).** Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. *Plant Physiol* **135**, 1738-1752.
- Robles, P. and Pelaz S. (2005).** Flower and fruit development in Arabidopsis thaliana. *Int J Dev Biol.* **49(5-6)**, 633-43.
- Roeder, A., Liljegren, S., Ferrandiz, C. and Yanofsky, M. (2005).** Drawing a line in the Arabidopsis fruit. *Dev Biol* **283**, 658-658.
- Roeder, A. H. K. and Yanofsky, M. F. (2005)** Fruit development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book.* **52**, 1-50.

- Roeder, A. H., Ferrandiz, C. and Yanofsky, M. F.** (2003). The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the Arabidopsis fruit. *Curr Biol* **13**, 1630-5.
- Romano, C.P., Robson, P.R., Smith, H., Estelle, M. and Klee, H.** (1995). Transgene-mediated auxin overproduction in Arabidopsis; Hypocotyl elongation phenotype and interactions with the hy6-1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. *Plant Mol. Biol.* **27**, 1071-1083.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B. and Erlich, H. A.** (1998). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable Dna polymerase. *Science* **239** (4839), 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Savidge, B., Rounsley, S.D. and Yanofsky, M.F.** (1995). Temporal relationship between the transcription of two Arabidopsis MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* **7**, 721-733.
- Sessions, R. A.** (1997). Arabidopsis flower development and gynoecium patterning in wild-type and ettin mutants. *Am. J. Bot.* **84**, 1179-1191.
- Sessions, R. A., Nemhauser, J., McColl, A., Roe, J., Feldmann, K. and Zambryski, P.** (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**, 4481-4491.
- Sessions, R. A. and Zambryski, P. C.** (1995). Arabidopsis gynoecium structure in the wild type and in ettin mutants. *Development* **121**, 1519-32.
- Scacchi, E., Osmont, K.S., Beuchat, J., Salinas, P., Navarrete-Gómez, M., Trigueros, M., Ferrándiz, C. and Hardtke, C.S.** (2009). Dinamic, auxin-responsive plasma membrana to nucleus movement of Arabidopsis BRX. *Development* **136**, 2059-2067.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D.** (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 1121-1133.
- Scofield, S., Dewitte, W., and Murray, J.A.M.** (2007). The KNOX gene SHOOT MERISTEMLESS is required for the development of reproductive meristematic tissues in Arabidopsis. *The Plant Journal* **50**, 767-781.
- Shani, E., Yanai, O. and Ori, N.** (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 484-489.
- Siegfried, K. R., Eshed, Y., Baum, S. F., Otsuga, D., Drews, G. N. and Bowman, J. L.** (1999). Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development* **126**, 4117-28.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Sohlberg, J. J., Myrenas, M., Kuusk, S., Lagercrantz, U., Kowalczyk, M., Sandberg, G. and Sundberg, E.** (2006). STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. *The Plant Journal* **47**, 112-123.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S. J., Ljung, K., Robles, P., Galvan-Ampudia, C. S., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, M. F. and Ostergaard, L.** (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **459**, 583-U114.
- Sridhar, V. V., Surendrarao, A., Gonzalez, D., Conlan, R. S. and Liu, Z.** (2004). Transcriptional repression of target genes by LEUNIG and SEUSS, two interacting regulatory proteins for Arabidopsis

flower development. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11494-9.

Staldal V., Sohlberg J. J., Eklund D. M., Ljung K. and 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 Phytologist* **180**, 798-808.

Suzuki, M., Kao, C. Y. and McCarty, D. R. (1997). The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* **9**, 799-807.

Suzuki, M., Wang, H. H. and McCarty, D. R. (2007). Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiology* **143**, 902-11.

Swaminathan K., Peterson K. and Jack T. (2008). The plant B3 superfamily. *Trends in Plant Sciences* **13**, 647-655.

Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. and Bennett, M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev* **15**, 2648-53.

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

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

Timpote C., Lincoln C., Pickett F.B., Turner J. and Estelle M. (1995). The AXR1 and AUX1 genes of Arabidopsis function in separate auxin-response pathways. *The Plant Journal* **8(4)**, 561-569.

Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.G., Murphy, G. and Jones, J.D.G. (1999). Multiple Independent Defective Suppressor-mutator Transposon Insertions in Arabidopsis: A Tool for Functional Genomics. *The Plant Cell* **11**, 1841-1852.

Tiwari, S. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**, 533-543.

Trigueros, (2008). Análisis funcional de los factores de transcripción TOWER OF PISA 1 y TOWER OF PISA 2 y su implicación en el desarrollo del gineceo de Arabidopsis. Tesis doctoral. UPV-CSIC.

Trigueros M, Navarrete-Gomez M, Sato S, Christensen SK, Pelaz S, Weigel D, Yanofsky MF, and Ferrandiz C. (2009). The NGATHA genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium. *Plant Cell* **21**, 1394-1409.

Tsukagoshi, H., Morikami, A. and Nakamura, K. (2007). Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2543-7.

Tsukagoshi, H., Saijo, T., Shibata, D., Morikami, A. and Nakamura, K. (2005). Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiology* **138**, 675-85.

Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-8.

Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**, 309-19.

Vert, G., Nemhauser, J. L., Geldner, N., Hong, F. and Chory, J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 177-201.

- Vivian-Smith, A. and Koltunow, A. M.** (1999). Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in Arabidopsis. *Plant Physiol* **121**, 437-51.
- Vivian-Smith, A., Luo, M., Chaudhury, A. and Koltunow, A.** (2001). Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in Arabidopsis. *Development* **128**, 2321-2331.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of Tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
- Wang, D., Pei, K., Fu, Y., Sun, Z., Li, S., Liu, H., Tang, K., Han, B. and Tao, Y.** (2007). Genome-wide analysis of the AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene* **394**, 13-24.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. 354.
- Weigel, D. and Meyerowitz, E.M.** (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* **78**, 203-209.
- Woody ST, Austin-Phillips S, Amasino RM. and Krysan PJ** (2007) The WiscDsLox T-DNA collection: an Arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *J Plant Res* **120**, 157-165.
- Woodward, C., Bemis, S. M., Hill, E. J., Sawa, S., Koshiba, T. and Torii, K. U.** (2005). Interaction of auxin and ERECTA in elaborating Arabidopsis inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol* **139**, 192-203.
- Wu, H., Mori, A., Jiang, X., Wang, Y. and Yang, M.** (2006). The INDEHISCENT protein regulates unequal cell divisions in Arabidopsis fruit. *Planta* **224**, 971-9.
- Yu, H., Ito, T., Wellmer, F., and Meyerowitz, E.M.** (2004). Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nat. Genet.* **36**, 157-161.
- Zhao, L., Qiulan Luo, Q., Yang, C., Han, Y. and Li, W.** (2008). A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean. *Planta* **227**, 1389-1399.
- Zurek, D.M., Rrayle, D.L., McMorris, T.C. and Clouse, S.D.** (1994). Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiology* **104**, 505-513.

Anexos

NOMBRE	SECUENCIA	Tm	Long.	Secuencia que aparee	Orientación
A	5' CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C 3'	74	25	microRNA NGA	Directo
B	5' GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G 3'	80	28	microRNA NGA	Reverso
BcDNA1	5'ATG ATC AAT TCG GAG AGC AGC AAC AAC ACC 3'	84	30	STY2	Directo
BcDNA2	5'ATG ATC ACC AGA GCA ACA AAA CAA AAG ACA 3'	82	30	STY2	Reverso
CRC CAPS F1	5' GCT CCC ATC TGC ATA CAA CC 3'	62	20	CRC	Directo
CRC CAPS R1	5' GAT GCG TTG GCT CTC ATC G 3'	60	19	CRC	Reverso
CRCGENF1	5' AGC AGA TGC AGA GCT TTG GT 3'	60	20	CRC	Directo
CRCGENR1	5' TCT TCT CAC CGA ATC CCA AG 3'	60	20	CRC	Reverso
dspm1	5'CTT ATT TCA GTA AGA GTG TGG GGT TTT GG 3'	82	29	STY1	Reverso
eLF1 alpha-1	5' GCA CAG TCA TTG ATG CCC CA 3'	62	20	eLF1 alpha	Directo
eLF1 alpha-2	5' CT CAA GAA GAG TTG GTC CCT 3'	66	21	eLF1 alpha	Reverso
EN205	5'AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA 3'	78	26	Spm	Directo
EN8130	5'GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC 3'	82	26	Spm	Reverso
EST3	5'TTC ACG GTG GCG TTT AGG AAC G 3'	68	22	STY1	Reverso
ind ATG F	5' ATG GAA AAT GGT ATG TAT AAA 3'	62	21	IND	Directo
ind STOP R	5' TCA GGG TTG GGA GTT GTG GTA 3'	64	21	IND	Reverso
INDa	5'GAG CAA CCA CCG TCT GAG GAT CG 3'	74	23	IND	Directo
INDb	5'CGT CGA CGA TGA AAA TGG AAA ATG GTA TGT ATA 3'	90	33	IND	Reverso
LB3	5'TAG CAT CTG AAT TTC ATA ACC AAT CTC GAT ACA C 3'	88	34	T-DNA Garlic	Reverso
LBb1.3	5' ATT TTG CCG ATT TCG GAA C 3'	54	19	T-DNA Garlic	Reverso
miR*a	5' GAA ACT TTG ACG AAC ATG TGT CCT CTA CAT ATA TAT TCC T 3'	100	40	microRNA NGA	Reverso
miR*s	5' GAG GAC ACA TGT TCG TCA AAG TTT CAC AGG TCG TGA TAT G 3'	116	40	microRNA NGA	Directo
miR-a	5'GAG GGC ACA TGT TCG ACA AAG TAT CAA AGA GAA TCA ATG A 3'	112	40	microRNA NGA	Reverso
miR-s	5' GAT ACT TTG TCG AAC ATG TGC CCT CTC TCT TTT GTA TTC C 3'	114	40	microRNA NGA	Directo
oDONR201F	5' TCG CGT TAA CGC TAG CAT GGA TCT C 3'	76	25	pDONR 201	Directo
oDONR201R	5' GTA ACA TCA GAG ATT TTG AGA CAC 3'	66	24	pDONR 201	reverso
oEGAD1	5' AAG ATA CAG TCT CAG AAG AC 3'	56	20	Plásmido pEGAD	Directo
oEGAD2	5' GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG 3'	58	21	Pásmido pEGAD	Directo
oETT-13 Dir	5' ATG GGT GGT TTA ATC GAT CTG 3'	60	21	ETT-13	Directo
oETT-13 Rev	5' GAC TCA GGA AGA AGA GAG AC 3'	60	20	ETT-13	Reverso
oETT-4 Dir	5' GACGTCATATCCCGTAAGGT 3'	62	21	ETT	Directo
oETT-4 Rev	5' GTT ATA TGA GTG GTA CAA TGT CT 3'	62	23	ETT	Reverso
oMN1	5' GAA TTC ATG AAT CAA GAA GAT AAA GA 3'	66	26	NGA2	Directo
oMN2	5' GTC GAC TCA CCT ATC CAA ATC AAA AGA 3'	76	27	NGA2	Revers
oMNG3	5' GAG CTC ATG ATG ACA GAT TTA TCT CTC 3'	76	27	NGA1	Directo
oMNG4	5' GAA TTC ATG ATG ACA GAT TTA 3'	54	21	NGA1	Directo
oMNG5	5'CAC TTT GTC GAA CAT GTG C 3'	56	19	NGA1	Reverso
oMNG6	5' TTT AAC GAA TCT GCT CCA AC 3'	56	20	NGA1	Reverso
oMNG7	5'CTC GAG GAC CGG TTG ATC CAA ATC AAA AGA C 3'	92	31	NGA1	Reverso
oMNG8	5' GCG GCC TGC TTA GTC TCT TTC AGG AC 3'	82	26	NGA1	Directo
oMNG9	5' GGT ACC CTT ACG GTT AAA ATA ATC CAC C 3'	80	28	NGA1	reverso
oMNG10	5' CCC GGG TGA TGA TGA TGA AAT TAG TTG G 3'	82	28	NGA1 (8634pb)	Directo
oMNG11	5' AAT CAG GAA CTT GTT GGA ACG G 3'	64	22	NGA1 (8382pb)	Directo
oMNG12	5' GAA GAC TGG AAT CGC AGA GGT C 3'	68	22	NGA1 (10976pb)	Reverso
oMNG13	5' GAA TTC ATG AAT CTT GAC CAA 3'	52	21	NGA4	Directo
oMNG14	5' CGA CAA AGT AGT AAC ACC AAG 3'	60	21	NGA2	Directo
oMNG15	5' CCA ACC ATA GAA ACT CTG CC 3'	60	20	NGA2	Reverso
oMNG16	5'CCT GAC CAT CCT CAT TTC GC 3'	62	20	NGA1	Directo
oMNG17	5' TCT TCA CTG CTG CTT CCA AG 3'	60	20	NGA1	Reverso

oMNG18	5' GAT CGT TCA AAC ATT TGG CAA T 3'	60	22	nos-ter (1pb)	Directo
oMNG19	5' CCG ATC TAG TAA CAT AGA TGA C 3'	62	22	nos-ter (234pb)	Reverso
oMNG20	5' ACGCAAACGCAAACACCGTC 3'	62	20	ETT CDS	Directo
oMNG21	5' ACAATGTCGTCCCACCTTACC 3'	64	21	ETT CDS	reverso
oMNG22	5' GCG GCC GCA AGA AAG TGG GTG AGA AC 3'	84	26	NGA2	Directo
oMNG23	5' CTC GAG GAC CGG TCT ATC CAA ATC AAA AGA C 3'	92	31	NGA2	reverso
oMNG24	5' CCC GGG TGA TTA TCA TGA GAT TAA TCA C 3'	80	28	NGA2	Directo
oMNG25	5' GGT ACC TAA GTG TTC CCT CTG TTC C 3'	76	25	NGA2	reverso
oMNG26	5' GTG AGC AGT GAT GAT GAG TC 3'	60	20	NGA2	Directo
oMNG27	5' GCT AAA GGA CGA CGA TGA CC 3'	62	20	NGA2	reverso
oMNG28	5' ATA ATC ATC AGC AGC AAC GTC 3'	60	21	NGA1	Directo
oMNG29	5' TAA CTC CAC AAC AAA CGA CAG 3'	60	21	NGA2	Directo
oMNG30	5' CCA AAT CAA AAG ACA AAG AAG G 3'	60	22	NGA2	Reverso
oMNG31	5' AGG TTG TGA GTT TCG TAA TTT G 3'	60	22	NGA2	Reverso
oMNG32	5' CTC ACG AGA GAT GAA GAT G 3'	56	19	NGA1	Directo
oMNG33	5' ATC ATC TTC ACT GCT GCT TC 3'	58	20	NGA1	Reverso
oMNG34	5' TAT AAA GAC TGT AAT TGG TCG 3'	56	21	NGA1	Reverso
oMNG35	5' GAA TTC TCA TTA TTA TTG ATC CAA ATC 3'	68	27	NGA1	Reverso
oMNG-35S D	5' ACC TCC TCG GAT TCC ATT GC 3'	62	20	35S	Directo
oMNG-35SD-2	5' ATC GTT GAA GAT GCC TCT GC 3'	60	20	35S	Directo
oMNG-35SD-3	5' ACA ATC CCA CTA TCC TTC GC 3'	60	20	35S	Directo
oMNG36	5' GCATGTATCTCTAGCTAGTTC 3'	60	21	YUCCA 4	Directo
oMNG37	5' TTACACCACCTCATCTTACG 3'	58	20	YUCCA 4	Reverso
oMNG38	5' ATG ATG ACA GAT TTA TCT CTC 3'	56	21	NGA1	Directo
oMNG39	5' ATC GGT CGG GGG GGC ATG TTG ATC CAA ATC AAA AGA C 3'	112	37	NGA1	Reverso
oMNG40	5' TTC CCA TAA CCA TAC CCT AC 3'	58	20	NGA3	Reverso
oMNG41	5' TTC ACC CCA AAG AGC CTT AG 3'	60	20	NGA3	Reverso
oMNG42	5' TGG AAT GTG GCA ATG ACT ATA ATC A 3'	68	25	NGA3 (CDS)	Directo
oMNG43	5' GTG GCA CCA ACC ATG ACT CTT 3'	64	21	NGA3 (CDS)	Reverso
oMNG44	5' TCG TCT CCG GTT GTG ATC AG 3'	62	20	NGA4 (CDS)	Directo
oMNG45	5' TGG CGA CCT CCA AAA TGA TT 3'	58	20	NGA4 (CDS)	Reverso
oMNG46	5' GGA GAG CAC AAG TCG CTT CAA 3'	64	21	NGA2 (CDS)	Directo
oMNG47	5' GCC TTA ACC GCT TCT CTC CTC 3'	66	21	NGA2 (CDS)	Reverso
oMNG48	5' CAG CTT TCC TTC GAC CAA TTA CA 3'	66	23	NGA1 (CDS)	Directo
oMNG49	5' TGA CGT TGC TGC TGA TGA TTA TAA A 3'	68	25	NGA1 (CDS)	Reverso
oMNG-ANT Dir	5' ATT ACG GGA ATG ACC CTA GTT TGA 3'	68	24	ANT	Directo
oMNG-ANT Rev	5' CCC CTA CAT TAA AAG ACC CTC CAT 3'	70	24	ANT	Reverso
oMNG-CRC1	5' ATG AAC CTA GAA GAG AAA CC 3'	56	20	CRC (CDS)	Directo
oMNG-CRC2	5' TCA CTT CTT CTC ACC GAA TC 3'	58	20	CRC (CDS)	Reverso
oMNG-GUS3	5' GAC ATC GGC TTC AAA TGG CG 3'	62	20	GUS	Reverso
oMNG-SHP1 A	5' GTG ACG GAA GGA GGG TTG ACG 3'	68	21	SHP1	Directo
oMNG-SHP1 B	5' GTC TAC TGA TGA GTT GTC ACT AGG 3'	70	24	SHP1	Reverso
oMNG-SHP1 T-DNA	5' GAT GCA CTC GAA ATC AGC CAA TTT TAG AC 3'	82	29	T-DNA	Reverso
oMNG-SHP2 A	5' GAG GAT AGA GAA CAC TAC GAA TCG TC 3'	76	26	SHP2	Directo
oMNG-SHP2 B	5' CAG GTC AAG TCA ATA GAT TCC CTA C 3'	72	25	SHP2	Reverso
oMNG-SPT1	5' AAG TCA GGT CCT TCT TCT CG 3'	60	20	SPT	Directo
oMNG-SPT2	5' CCT TCC TCG CTT TCA CAG TC 3'	62	20	SPT	Reverso
oMNG-SPT3	5' GAA GAA GCA GAG AGT GAT GG 3'	60	20	SPT	Directo
oMNG-SPT4	5' AGA AGG TTC CAA ACG CTA TG 3'	58	20	SPT	Reverso
oMNG-STY1-1	5' ATT CGT AGT GGT GGT AGC GG 3'	62	20	STY1	Directo
oMNG-STY1-2	5' TCT TCG CTT GAT TCC CAC AG 3'	60	20	STY1	Reverso
oMNG-STY1-3	5' ATG GCG GGG TTT TTC TCG 3'	56	18	STY1	Directo

oMNG-STY1-4	5' ATC GGT CGG GGG GGC ATG CAC GCA CGC ACC TAA CAC 3'	120	36	STY1	Reverso
oMNG-VP16 Dir	5' CAT GCC CCC CCG ACC GAT G 3'	66	19	VP16	Directo
oMNG-VP16 Rev	5' TTA CTG CAG CCC ACC GTA C 3'	60	19	VP16	Reverso
oMNG-YUC4 RIII	5' CCA TGG CGA CTA ATA AAA GC 3'	58	20	Promotor Yucca4	Reverso
oMNG-YUC4-1	5' AAT TGT GTC TCT GTG AAA TGG 3'	58	21	Yucca4	Directo
oMNG-YUC4-2	5' TAA CGA AGG AGT GGC AAG TC 3'	60	20	Yucca4	Directo
oMNG-YUC4-3	5' TAT GTT GCT CAC GAA AGT ATC 3'	58	21	Yucca4	Directo
oSPT-2 Dir	5' GTT TAT CTT TCT TGT CCC AGA GGA 3'	68	24	SPT	Directo
oSPT-2 Rev	5' ATC AAG CAT TGA AGC CTT ATC CGT 3'	68	24	SPT	Reverso
otl2THF	5'GAA TCC ATG ATG ACA GAT TTA 3'	56	21	NGA1	Directo
otl2THR	5'GTC GAC TTG ATC CAA ATC AAA 3'	58	21	NGA1	Reverso
oTOL2RWT	5'AGC AGC AGC AGC AGC CAT ATT TAG 3'	72	24	NGA1	Reverso
p745	5' AAC GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C 3'	78	28	T-DNA	Reverso
SP6	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3'	38	20	pGEM-T easy	Reverse
SRS2:E	5'TGG GAG AAG CAA CCG GCA ACA TCG 3'	76	24	STY2	Reverso
SRSM	5'CAA CTT CAA TAC ACT ACA AAC CCA G 3'	70	25	STY1	Directo
SS043	5'CCA ACG GCT CTG ATC CAA CAA TG 3'	70	23	NGA3	Reverso
SS044	5'ACC GTC GAC AAC TAA ACA TAT ACA TAC 3'	74	27	NGA3	Directo
SS065	5' CCT CTC GAG TGA TAC TTT TGA TGA ATA TCT CAA C 3'	94	34	NGA4	Directo
SS066	5' GGA GGA TCC TCT TCA AAG CTC TAA AGA TTT CCC 3'	96	33	NGA4	Reverso
SS071	5' AAC GTC ATC ATC ACA GTG GTG GTG G 3'	76	25	NGA1	Directo
T7	5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	43	20	pGEM-T easy	Directo
Tol 2F	5' ATG GAA TGC GGC GAG AGC GGA ATG 3'	76	24	NGA1	Directo
Tol 2R	5' CCA TAA AAT CTC TCT ATT GAC AAT GCA 3'	72	27	NGA1	Reverso
UBC21-qPCR-3p	5' CAT CAT CCT TTC TTA GGC ATA GC 3'	66	23	UBC21	Directo
UBC21-qPCR-5p	5' TGC GAC TCA GGG AAT CTT CTA 3'	62	21	UBC21	Reverso
YUC4 DII	5' TGA ATA AGT ATC TTT CGT TTA CC 3'	60	23	Promotor Yucca4	Sentido
YUC4 Dir	5' GAA CTA GCT AGA GAT ACA TGC 3'	60	21	Promotor Yucca4	Sentido
YUC4 Rev	5'CCA TGG ACC TAA GAA GTG TCC TG 3'	64	23	Promotor Yucca4	Reverso
YUC4 RII	5' TTT GAG ACG GTC GTA GGT TC 3'	60	20	Promotor Yucca4	Reverso

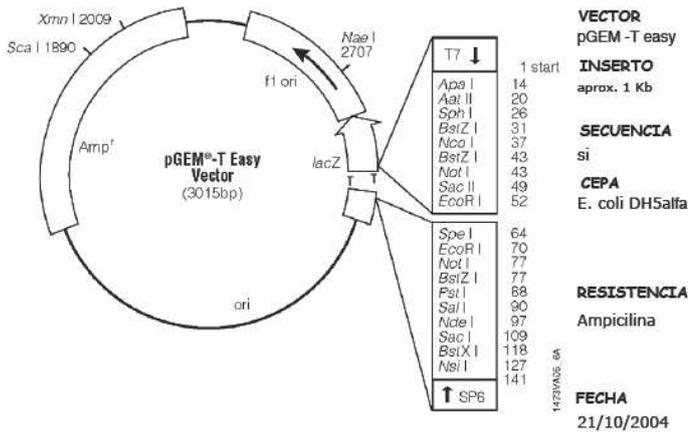
NOMBRE pMNG01

ORIGEN NGA3 CDS con sitios 5' Eco RI y 3' Sal I.
PCR sobre pSS065 con oligos otp1 THR y otp1 THF

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en el vector de levadura de dos híbridos.

INSERTO NGA3 CDS

T7 - SalI otp1 THR -3' NGA3 5'- otp1 THF EcoRI - SP6



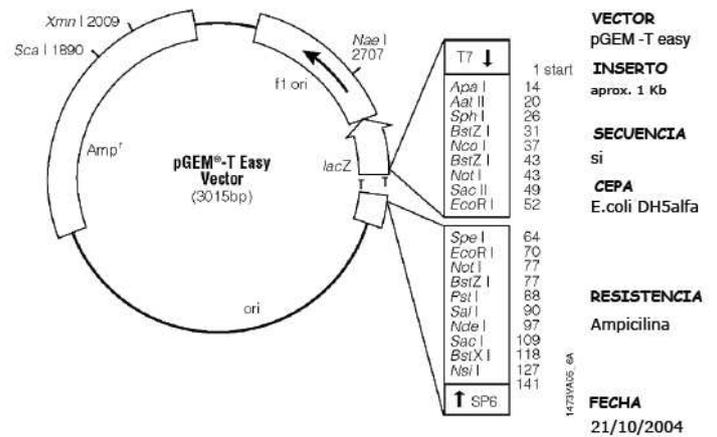
NOMBRE pMNG02

ORIGEN NGA4 CDS con sitios 5' Eco RI y 3' Sal I.
PCR sobre pSS066 con oligos otp2 THR y otp2 THF

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en el vector de levadura de dos híbridos.

INSERTO NGA4 CDS

T7- Eco RI otp2 THF -5' NGA4 3'- otp2 THR Sal I -SP6



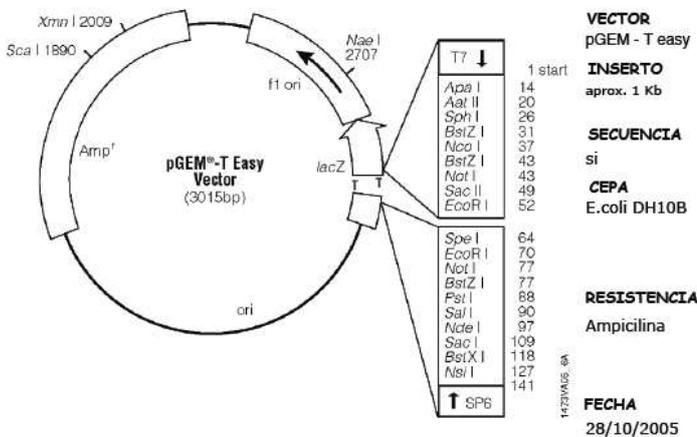
NOMBRE pMNG03

ORIGEN NGA1 CDS con sitios 5' Eco RI y 3' Sal I.
PCR sobre pSS067 con oligos otl2 THR y oMNG4

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en el vector pEGAD (contiene región 35S y GFP)

INSERTO NGA1 CDS

T7 - EcoRI oMNG4 -5' NGA1 3'- otl2 THR SalI- SP6



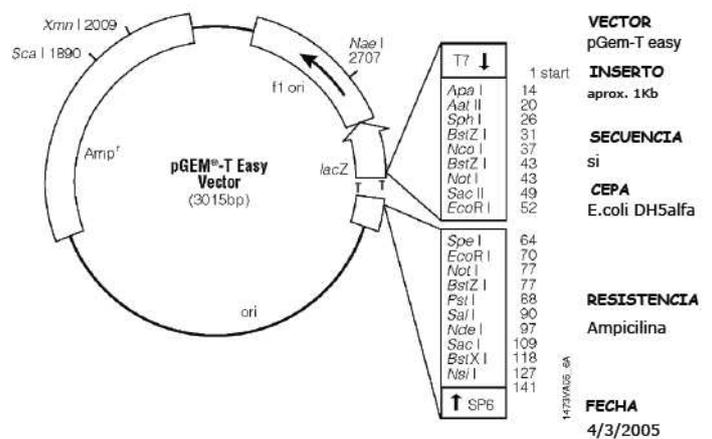
NOMBRE pMNG10

ORIGEN NGA2 CDS con sitios 5' Eco RI y 3' Sal I.
PCR sobre el Bac F14M4 con oligos oMN1 y oMN2

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en el vector de levadura de dos híbridos.

INSERTO NGA2 CDS

T7 - EcoRI oMN1 -5' NGA2 3'- oMN2 SalI - SP6
(Posee un error en la secuencia, concretamente en el ATG, en su lugar el codón es CTG).

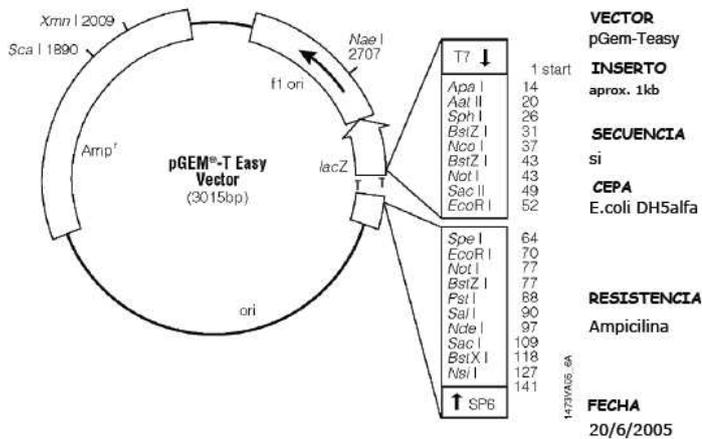


NOMBRE pMNG14

ORIGEN NGA2 CDS con sitios 5' Eco RI y 3' Sal I.
PCR sobre el Bac F14M4 con oligos oMN1 y oMN2 (incluye el ATG)

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en pEGAD (contiene región 35S y GFP)

INSERTO NGA2 CDS
T7 - SalI oMN2 -3' NGA2 5'- oMN1 EcoRI - SP6



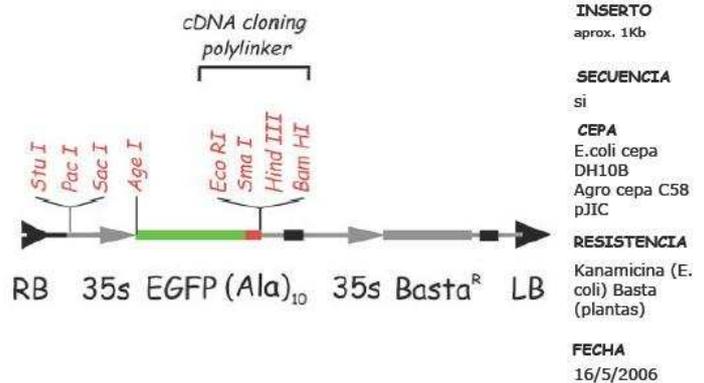
VECTOR pGem-Teasy
INSERTO aprox. 1kb
SECUENCIA si
CEPA E.coli DH5alfa
RESISTENCIA Ampicilina
FECHA 20/6/2005

NOMBRE pMNG15

ORIGEN NGA1 CDS con sitios Eco RI en 5' y Sal I en 3'
Obtenido a partir del plásmido pMNG3 mediante digestión con Eco RI

PROPOSITO Infiltrar *Arabidopsis*. Analizar sobreexpresión(35S) de NGA1 así como la localización celular de la proteína mediante expresión transitoria en *Nicotina benthamiana*.

INSERTO TOP4 CDS
Eco RI oMNG4 -5' NGA1 3'- otl2 THR Sal I SpeI

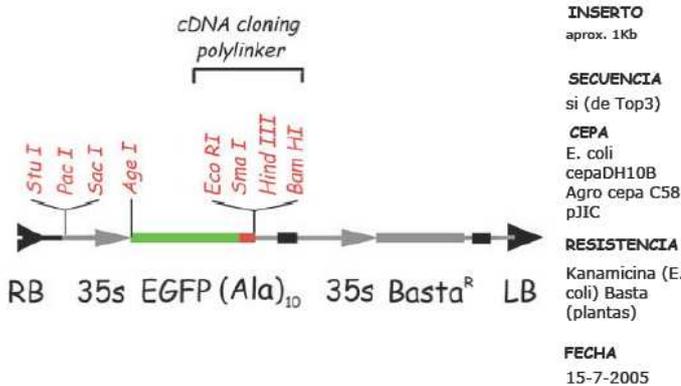


NOMBRE pMNG16

ORIGEN NGA2 CDS con sitios Eco RI en 5' y Sal I en 3'
Obtenido a partir del plásmido pMNG14 mediante digestión con Eco RI

PROPOSITO Infiltrar *Arabidopsis*. Analizar sobreexpresión(35S) de NGA2 así como la localización celular de la proteína mediante expresión transitoria en *Nicotina benthamiana*.

INSERTO TOL1 CDS
Eco RI oMN1 -5' NGA2 3'- oMN2 Sal I

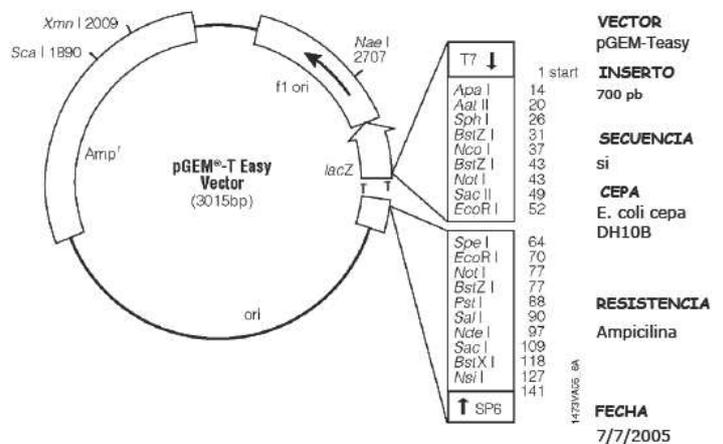


NOMBRE pMNG17

ORIGEN microRNAi para NGA obtenido del plásmido RS300 por PCR con los oligos A y B sobre los productos a, b y c previamente obtenidos a partir de dicho plásmido.

PROPOSITO Paso previo para clonar en pGREENII0029 y pCHF3

INSERTO microRNAi NGA
T7- oligoA KpnI XhoI SalI ClaI HindIII EcoRV EcoRI PstI microRNA BamHI SpeI XbaI NotI SacII SacI oligoB-SP6



VECTOR pGEM-Teasy
INSERTO 700 pb
SECUENCIA si
CEPA E. coli cepa DH10B
RESISTENCIA Ampicilina
FECHA 7/7/2005

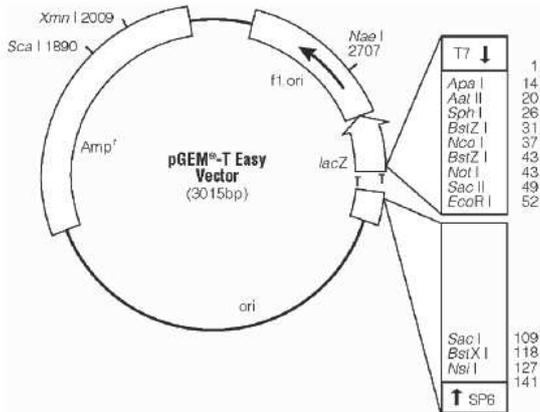
NOMBRE pMNG18

ORIGEN pMNG17 (pGem-T Easy con el microRNAi para NGA) digerido con SacI.

PROPOSITO Eliminar todos los sitios de restricción que van desde el sitio SacI del microRNA hasta el SacI del pGem-T Easy y facilitar la clonación del microRNAi en el plásmido pGreenII0029. Nuestro objetivo último es crear una construcción del microRNAi NGA inducible por alcohol.

INSERTO microRNA NGA

T7- oligoA KpnI XhoI SalI ClaI HindIII EcoRV EcoRI PstI **microRNA** BamHI SpeI XbaI NotI SacII - **SP6**



VECTOR
pGem-T easy
INSERTO
614pb
SECUENCIA
no
CEPA
E. coli cepa DH10B
RESISTENCIA
Ampicilina
FECHA
26/7/2005

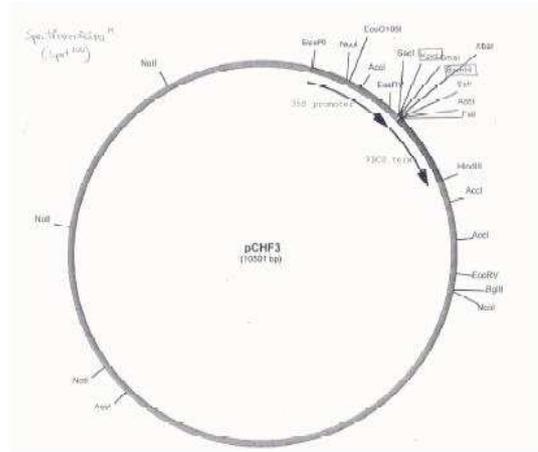
NOMBRE pMNG19

ORIGEN microRNAi NGA, obtenido del plásmido pMNG17 digerido con Kpn I y Bam HI.

PROPOSITO Transformar Arabidopsis, mediante infiltración, con esta construcción de expresión constitutiva, obtendremos así el cuádruple mutante nga1/nga2/nga3/nga4.

INSERTO microRNAi NGA

35S promoter- KpnI XhoI SalI ClaI HindIII EcoRV EcoRI PstI **microRNAi** BamHI - RBCS term



VECTOR
pCHF3
INSERTO
500pb
SECUENCIA
no
CEPA
E.coli DH10B y Agro C58
RESISTENCIA
Espectinomicina (E.coli) Kan (plantas)
FECHA
22/7/2005

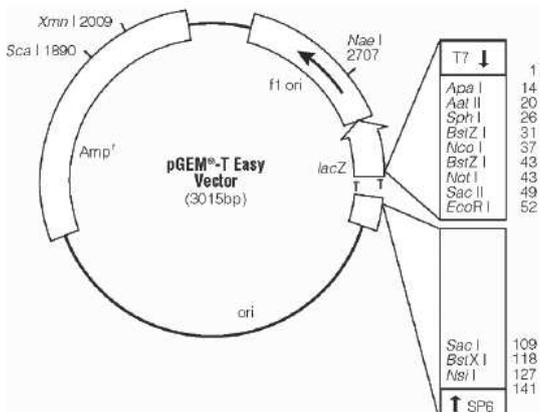
NOMBRE pMNG20

ORIGEN Promotor Alca. Obtenido a partir del plásmido pACN mediante digestión con Hind III y Pst I y clonado en el plásmido pMNG18 (pMNG17 digerido con SacI y religado)

PROPOSITO Sacar a continuación el cassette Alca promoter: microRNAi NGA para clonarlo en el pMNG21 (pGreenII0029+AlcR). Crear una construcción del microRNAi inducible por alcohol.

INSERTO AlcA promoter: microRNAi

T7- oligoA KpnI XhoI SalI ClaI Hind III **AlcA promoter** Pst I **microRNA** NGA BamHI SpeI XbaI NotI SacII SacI - **SP6**



VECTOR
pGem-T easy
INSERTO
914pb
SECUENCIA
si
CEPA
E.coli DH10B
RESISTENCIA
Ampicilina
FECHA
7/9/2005

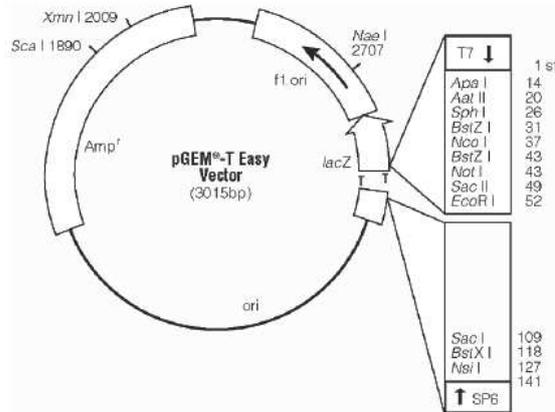
NOMBRE pMNG21

ORIGEN 35S:AlcR:noster Obtenido a partir del plásmido pSRNACNbin mediante digestión con ClaI y Hind III.

PROPOSITO Clonar a continuación el cassette 35S:AlcR:noster:AlcA promoter: microRNAi NGA en el plásmido pGreenII 0029. Crear una construcción del microRNAi NGA inducible por alcohol.

INSERTO 35S:AlcR:noster:AlcA promoter: microRNAi NGA

T7- oligoA KpnI XhoI SalI ClaI **35S:AlcR:noster** Hind III **AlcA promoter** Pst I **microRNA** BamHI SpeI XbaI NotI SacII SacI - **SP6**



VECTOR
pGem-T easy
INSERTO
5,914 Kb
SECUENCIA
no
CEPA
E. coli cepaDH10B
RESISTENCIA
Ampicilina
FECHA
28/10/2005

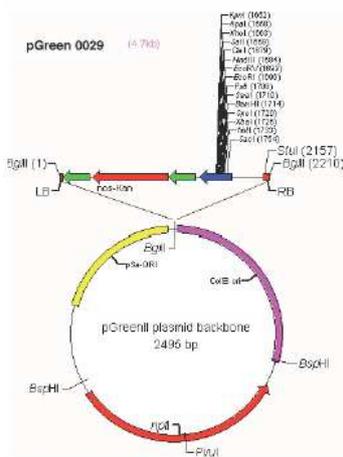
NOMBRE pMNG22

ORIGEN 35S:ALcR:noster:AlcA promoter:microRNAi NGA
Obtenido a partir del plásmido pMNG21 mediante digestión con SpeI, comprobación de linearización total del plásmido, y digestión con NotI.

PROPOSITO Transformar Arabidopsis, mediante infiltración, con esta construcción inducible con alcohol, obtendremos así el cuádruple mutante nga1/nga2/nga3/nga4 únicamente al tratar las plantas, de modo que podremos mantener las líneas obtenidas facilitándonos el estudio de interacciones genéticas.

INSERTO 35S:ALcR:noster:AlcA promoter:microRNAi

SacI NotI SacII EcoRI T7 OligoA KpnI XhoI SalI ClaI 35S:ALcR:noster HindIII AlcA promoter PstI microRNAi NGA BamHI SpeI BamHI SmaI PstI EcoRI EcoRV HindIII ClaI SalI XhoI ApaI KpnI



VECTOR
pGreenII 0029

INSERTO
5,914 Kb

SECUENCIA
no
CEPA
E. coli DH10B y Agro Cepa C58 pJit.

RESISTENCIA
Kanamicina (E. coli y planta)

FECHA
20/12/2005

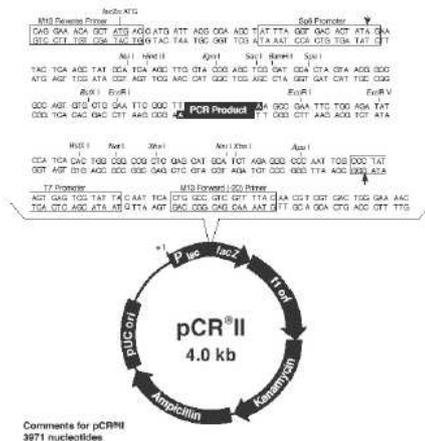
NOMBRE pMNG23

ORIGEN 3' NGA1 Obtenido por PCR sobre el bac F14M4 con los oligos oMNG11 y oMNG12.

PROPOSITO Reamplificar la región 3' con los oligos oMNG9 y 10 para luego clonar en el plásmido SS018 (contiene el GUS).

INSERTO 3'NGA1 (2,5Kb)

T7 : oMNG11 5' (3'NGA1) 3' oMNG12: SP6



VECTOR
pCR II

INSERTO
2,5 kb

SECUENCIA
si
CEPA
E. coli (cepa DH10B)

RESISTENCIA
kanamicina y ampicilina

FECHA
27/3/2006

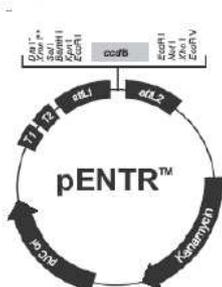
NOMBRE pMNG24

ORIGEN NGA4 CDS (ATG en fase)

PROPOSITO Clonar en plásmidos pBiFC mediante Gateway.

INSERTO NGA4 CDS

att L1 :EcoRI 5' ATG NGA4 STOP 3' XhoI: att L2



Comments for pENTRTM1A
2717 nucleotides

mB T1 transcription termination sequence: bases 106-149

mB T2 transcription termination sequence: bases 281-308

aIL1: bases 659-457 (complementary strand)

ccdB gene: bases 612-917

aIL2: bases 946-1045

Kanamycin resistance gene: bases 1188-1977

pUC origin: bases 2041-2714

* There is a unique *cis* I site but no *Dna* I sites in pENTRTM26. There is a unique *Aba* I site but no *Dna* I sites in pENTRTM4. There is a unique *Nsp* V site but no *Dna* I sites in pENTRTM11.

** There is a unique *Aba* I site between the *Xba* I site and the *Sul* I sites in pENTRTM11 only.

VECTOR
pENTR 3C

INSERTO
1 Kb

SECUENCIA
si
CEPA
E. coli (cepa DH10B)

RESISTENCIA
Kanamicina

FECHA
1/12/2005

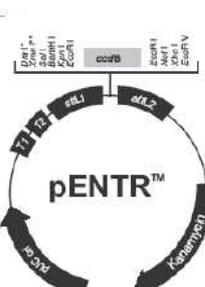
NOMBRE pMNG25

ORIGEN NGA1 CDS (ATG en fase)

PROPOSITO Clonar en plásmidos pBiFC.

INSERTO NGA1 CDS

att L1 : EcoRI 5' ATG NGA1 STOP 3' : att L2



Comments for pENTRTM1A
2717 nucleotides

mB T1 transcription termination sequence: bases 106-149

mB T2 transcription termination sequence: bases 281-308

aIL1: bases 659-457 (complementary strand)

ccdB gene: bases 612-917

aIL2: bases 946-1045

Kanamycin resistance gene: bases 1188-1977

pUC origin: bases 2041-2714

* There is a unique *cis* I site but no *Dna* I sites in pENTRTM26. There is a unique *Aba* I site but no *Dna* I sites in pENTRTM4. There is a unique *Nsp* V site but no *Dna* I sites in pENTRTM11.

** There is a unique *Aba* I site between the *Xba* I site and the *Sul* I sites in pENTRTM11 only.

VECTOR
pENTR 3C

INSERTO
1 kb

SECUENCIA
si
CEPA
E. coli (cepa DH10B)

RESISTENCIA
Kanamicina

FECHA
1/12/2005

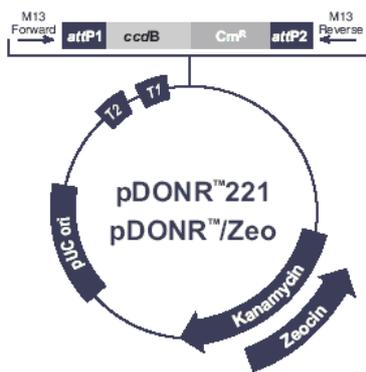
NOMBRE pMNG26

ORIGEN ETTIN CDS
(El ATG está en fase)

PROPOSITO Clonar en plásmidos pBiFC.

INSERTO ETT CDS

att L1 : 5' ATG ETTIN STOP 3' : att L2



VECTOR
pDONR 221

INSERTO
1827 pb

SECUENCIA
si

CEPA
E. coli (cepa
DH10B)

RESISTENCIA
Kanamicina

FECHA
12/12/2005

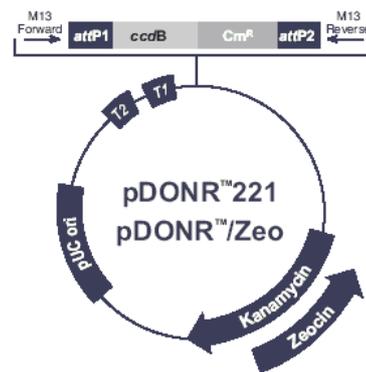
NOMBRE pMNG27

ORIGEN SPT CDS
(ATG en fase)

PROPOSITO Clonar en plásmidos pBiFC.

INSERTO SPT CDS

att L1 : 5' ATG SPT STOP 3' : att L2



VECTOR
pDONR 221

INSERTO
1122 pb

SECUENCIA
si

CEPA
E. coli (cepa
DH10B)

RESISTENCIA
Kanamicina

FECHA
12/12/2005

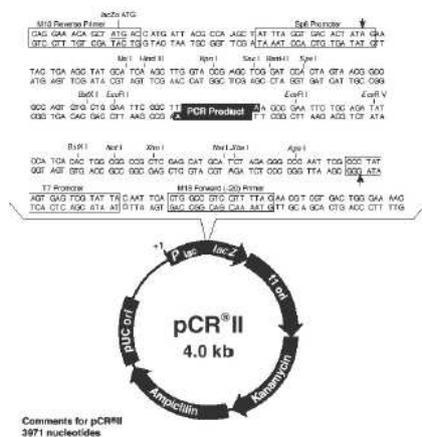
NOMBRE pMNG28

ORIGEN 5' NGA1 : NGA1 con sitios NotI (5') (este sitio tiene un error en la secuencia) y AgeI y XhoI (3')
Obtenido por PCR sobre el bac F14M4 con los oligos oMNG7 y oMNG8 (sin codón de STOP). Para sacarlo aprovecharé el sitio NotI de PCRII.

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en el plásmido SS018 (contiene el GUS).

INSERTO 5'NGA1:NGA1

T7: oMNG8 5' (5'NGA1:NGA1) 3' oMNG7 AgeI XhoI : SP6



Comments for PCRII
3971 nucleotides

NOMBRE pMNG29

ORIGEN 3' NGA1 con sitios SmaI (5') y KpnI (3')
Obtenido por PCR sobre el plásmido pMNG23 con los oligos oMNG9 y oMNG10, incluye el codón de stop.

PROPOSITO Clonar en el plásmido SS018 (contiene el GUS).

INSERTO 3' NGA1 (2Kb)

T7- KpnI oMNG9 3' (3'NGA1) STOP 5' oMNG10 SmaI-SP6

VECTOR
pCRII

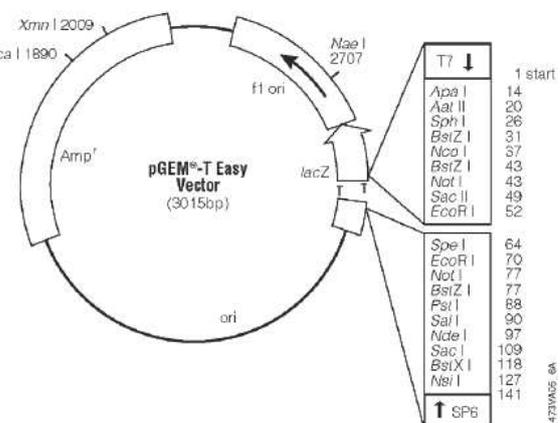
INSERTO
3501 pb

SECUENCIA
si

CEPA
E. coli (cepa
DH10B)

RESISTENCIA
Kanamicina y
ampicilina

FECHA
27/3/2006



14731005 GA

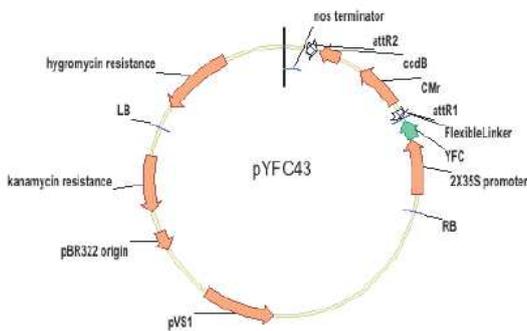
FECHA
9/6/2006

NOMBRE pMNG30

ORIGEN ETT CDS
Procede del plásmido pMNG26 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si interaccionan las proteínas ETT y NGA4.

INSERTO ETT CDS
att B1 : 5' ATG ETT STOP 3' : att B2



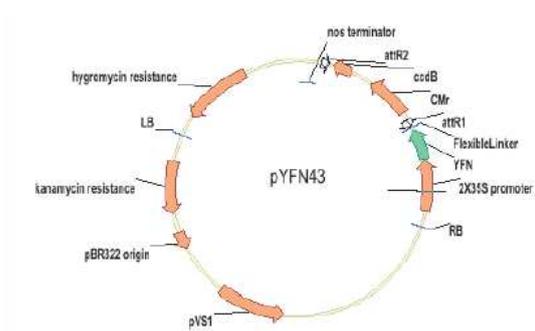
VECTOR
pYFC43
INSERTO
1827pb
SECUENCIA
no
CEPA
e.coli (cepa DH10B) y agrt (cepa C58)
RESISTENCIA
kanamicina = ampicacina
FECHA
4/7/2006

NOMBRE pMNG31

ORIGEN NGA4 CDS
Procede del plásmido pMNG65 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si las proteínas ETT y NGA4 interaccionan, o cualquier otro gen donado en el plásmido YFC43

INSERTO NGA4 CDS
att B1 : 5' ATG NGA4 STOP 3' : att B2



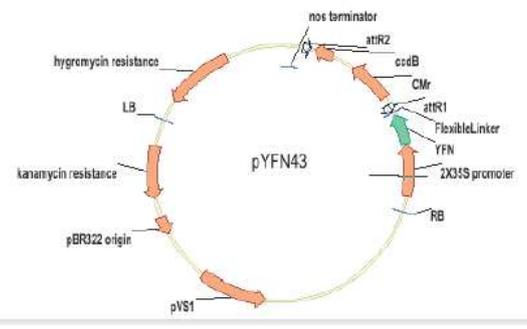
VECTOR
pYFN43
INSERTO
987pb
SECUENCIA
no
CEPA
e.coli (cepa DH10B) y agrt (cepa C58)
RESISTENCIA
kanamicina = ampicacina
FECHA
4/7/2006

NOMBRE pMNG32

ORIGEN NGA1 CDS
Procede del plásmido pMNG25 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si las proteínas ETT y NGA1 interaccionan, o cualquier otro gen clonado en el YFC43.

INSERTO NGA1 CDS
att B1 : 5' ATG NGA1 STOP 3' : att B2



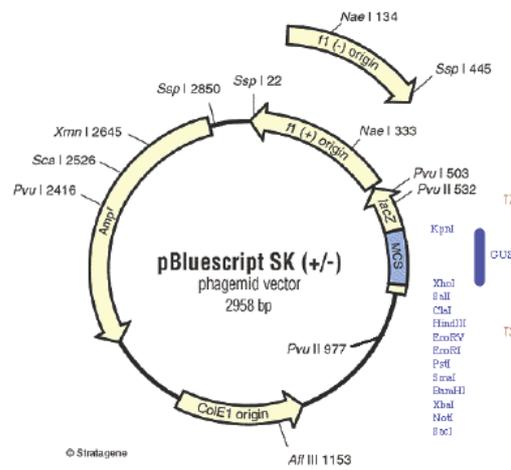
VECTOR
YFN43
INSERTO
1 kb
SECUENCIA
no
CEPA
e. coli (cepa DH10B) y Agrobacterium (cepa C58)
RESISTENCIA
Kanamicina= ampicacina
FECHA
8/11/2006

NOMBRE pMNG33

ORIGEN 5' NGA1 : NGA1 con sitios NotI BstXI EcoRV EcoRI (5') y AgeI y XhoI (3')
Obtenido a partir del plásmido pMNG28 mediante digestión con NotI, comprobación de linealización total del plásmido, y digestión con XhoI.

PROPOSITO Estudiar el patrón de expresión de NGA1, gracias al gen marcador GUS. Además luego queremos sustituir el GUS por la GFP.

INSERTO 5'TOP4:TOP4 (sin STOP)
5' SacI NotI BstXI EcoRV EcoRI (5'NGA1:NGA1) AgeI XhoI 3':GUS SmaI KpnI 3'



VECTOR
SS018
INSERTO
3,5Kb
SECUENCIA
si
CEPA
E.coli (cepa DH10B)
RESISTENCIA
Ampicilina
FECHA
18/5/2006

NOMBRE pMNG34

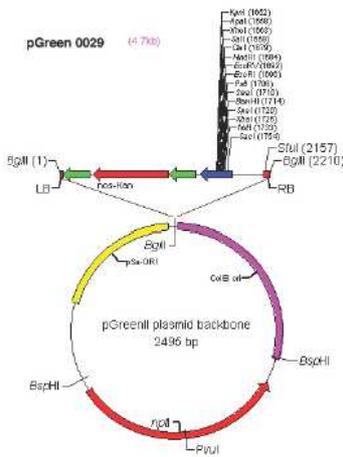
ORIGEN 5' NGA1 : NGA1 con sitios NotI BstXI EcoRV EcoRI (5') y AgeI y XhoI (3') y GUS con sitios SmaI y KpnI (3').

Obtenido a partir del plásmido pMNG33 mediante digestión con SmaI, comprobación de linealización total del plásmido, y digestión con NotI.

PROPOSITO Estudiar el patrón de expresión de NGA1, gracias al gen marcador GUS. Además luego queremos sustituir el GUS por la GFP.

INSERTO 5'TOP4:TOP4::GUS

5' NotI BstXI EcoRV EcoRI (5'NGA1:NGA1) AgeI XhoI::GUS SmaI 3'



VECTOR
pGreenII 0029

INSERTO
5,3 Kb

SECUENCIA
Si

CEPA
E.Coli (cepa EZ10)

RESISTENCIA
Kanamicina (bacterias y plantas)

FECHA
18/10/2007

NOMBRE pMNG35

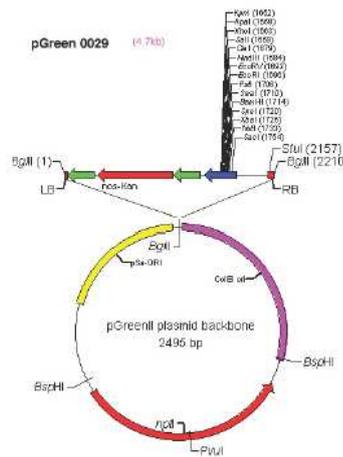
ORIGEN 3'NGA1 con sitios SalI PstI BstZI NotI EcoRI SpeI SmaI(5') y KpnI (3').

Obtenido a partir del plásmido pMNG29 mediante digestión con KpnI, comprobación de linealización total del plásmido, y digestión con SalI.

PROPOSITO Infiltrar Arabidopsis y así poder estudiar el patrón de expresión de NGA1, gracias al gen marcador GUS. Además luego queremos sustituir el GUS por la GFP.

INSERTO 5'NGA1:NGA1::GUS:3'NGA1

5' NotI BstXI EcoRV EcoRI (5'NGA1:NGA1) AgeI XhoI ::(GUS) SmaI:SalI PstI BstZI NotI EcoRI SpeI SmaI (3'NGA1) KpnI 3'



VECTOR
pGreenII 0029

INSERTO
7,3 Kb

SECUENCIA
Si

CEPA
E.Coli (cepa TOP10)
Agro C58 pJIC

RESISTENCIA
Kanamicina (bacterias y plantas)

FECHA
16/6/2008

NOMBRE pMNG36

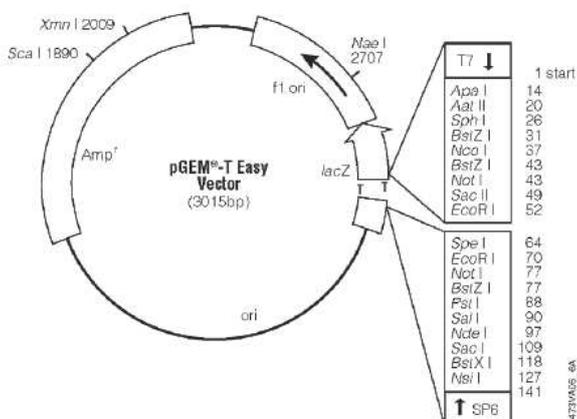
ORIGEN 5' NGA2:NGA2 con sitios NotI (5') y AgeI XhoI (3')

Obtenido por PCR sobre el back F21F14 con los oligos oMNG22 y oMNG23, sin codón de stop.

PROPOSITO Clonar en el plásmido SS018 (contiene el GUS).

INSERTO 5'NGA2:NGA2

T7- XhoI AgeI oMNG23 3' (5'NGA2:NGA2) 5' oMNG22 NotI-SP6



VECTOR
pGem-T easy

INSERTO
3,5 Kb

SECUENCIA
Si

CEPA
E. coli (cepa DH10B)

RESISTENCIA
Ampicilina

FECHA
17/7/2006

NOMBRE pMNG37

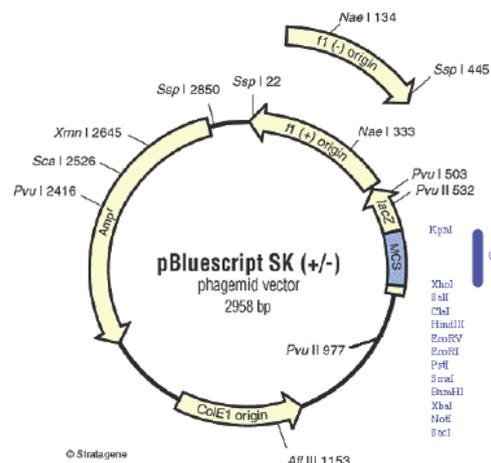
ORIGEN 5' NGA2:NGA2 con sitios NotI (5') y AgeI XhoI (3')

Obtenido a partir del plásmido pMNG36 mediante digestión con XhoI, comprobación de linealización total del plásmido, y digestión con NotI.

PROPOSITO Estudiar el patrón de expresión de NGA2, gracias al gen marcador GUS. Además luego queremos sustituir el GUS por la GFP.

INSERTO 5'NGA2:NGA2

5' NotI (5'NGA2:NGA2) AgeI XhoI 3'



VECTOR
SS018

INSERTO
3,5kb

SECUENCIA
si

CEPA
E.coli(cepa DH10B)

RESISTENCIA
Ampicilina/Carb enicilina

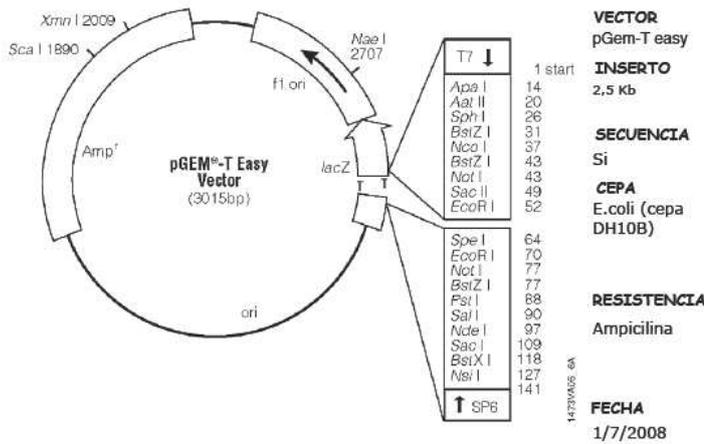
FECHA
6/9/2006

NOMBRE pMNG38

ORIGEN 3' NGA2 con sitios SmaI (5') y KpnI (5')
Obtenido por PCR sobre el back F21F14 con los oligos oMNG26 y oMNG27.

PROPOSITO Clonar en pGem-Teasy para luego reamplificar con los oligos oMNG24 y oMNG25.

INSERTO 3'NGA2
T7- 5' (3'NGA2) 3'-SP6

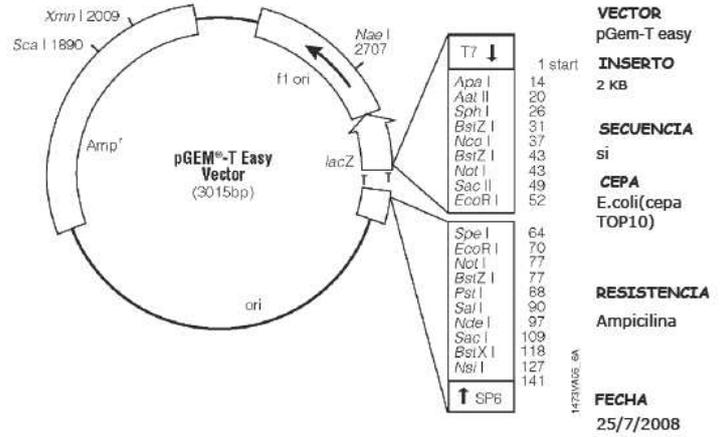


NOMBRE pMNG39

ORIGEN 3' NGA2 con sitios SmaI (5') y KpnI (5')
Obtenido por PCR sobre el plásmido pMNG38 con los oligos oMNG24 y oMNG25 (Con codón de STOP).

PROPOSITO Clonar en el plásmido SS018 (contiene el GUS).

INSERTO 3'NGA2
T7- 3' KpnI (3'NGA2) STOP SmaI 5'-SP6

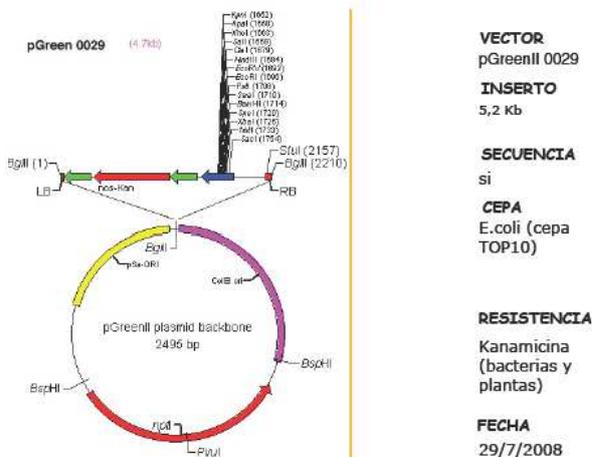


NOMBRE pMNG40

ORIGEN 5' NGA2 : NGA2 con sitios NotI (5') y AgeI y XhoI (3') y GUS con sitios SmaI y KpnI (3').
Obtenido a partir del plásmido pMNG37 mediante digestión con SmaI, comprobación de linealización total del plásmido, y digestión con NotI.

PROPOSITO Estudiar el patrón de expresión de NGA2, gracias al gen marcador GUS. Además luego queremos sustituir el GUS por la GFP.

INSERTO 5' NGA2:NGA2::GUS
5' NotI (5'NGA2:NGA2) AgeI XhoI::GUS SmaI 3'

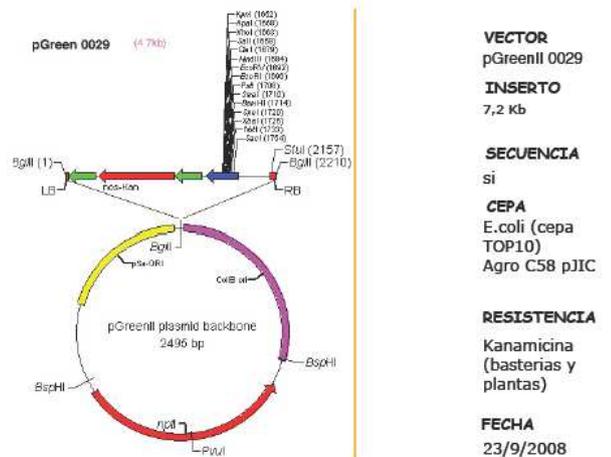


NOMBRE pMNG41

ORIGEN 3' NGA2 con sitios SalI PstI BstZI NotI EcoRI SpeI SmaI (5') y KpnI (3').
Obtenido a partir del plásmido pMNG39 mediante digestión con KpnI, comprobación de linealización total del plásmido, y digestión con SalI.

PROPOSITO Infiltrar Arabidopsis y así poder estudiar el patrón de expresión de NGA2, gracias al gen marcador GUS. Además luego queremos sustituir el GUS por la GFP.

INSERTO 5' NGA2:NGA2::GUS:3'NGA2
5' NotI (5'NGA2:NGA2) AgeI XhoI ::(GUS) SmaI:SalI PstI BstZI NotI EcoRI SpeI SmaI (3'NGA2) KpnI 3'



NOMBRE pMNG42

ORIGEN NGA1 con sitios Sali (5') y BamHI (3').
Obtenido a partir del plásmido pSS067 por digestión con BamHI, comprobación de la linearización total del plásmido, y digestión con Sali.

PROPOSITO Obtener plantas que sobreexpresen NGA1 únicamente cuando sean tratadas con Dexametasona (transformar *Arabidopsis*).

INSERTO NGA1 CDS
5' Sali (NGA1) STOP BamHI 3'

VECTOR
p V-TOP

INSERTO
1 Kb

SECUENCIA
no

CEPA
E.coli(cepa DH10B)
Agro C58

RESISTENCIA
Kanamicina
(bacterias)Hyg
(plantas)

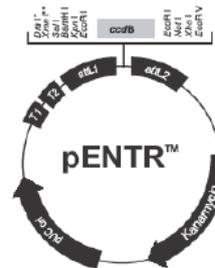
FECHA
18/7/2006

NOMBRE pMNG43

ORIGEN microRNAi-NGA con sitios KpnI (5') y NotI (3').
Obtenido a partir del plásmido pMNG17 por digestión con KpnI, comprobación de la linearización total del plásmido, y digestión con NotI.

PROPOSITO Paso intermedio para clonar el microRNAi-NGA en el plásmido pOpON2 mediante reacción Gateway.

INSERTO microRNAi-NGA
5' KpnI XhoI Sali ClaI HindIII EcoRV EcoRI PstI microRNAi-NGA BamHI SpeI XbaI NotI SacII SacI 3'



Comments for pENTRTM1A
2717 nucleotides

rmbT1 transcription termination sequence: bases 100-149
rmbT2 transcription termination sequence: bases 281-308
attL1: bases 358-457 (complementary strand)
ccdB gene: bases 612-917
attL2: bases 946-1045
Kanamycin resistance gene: bases 1188-1977
pUC origin: bases 2041-2714

* There is a unique *SacI* site, but no *DnaI* sites in pENTRTM08.
There is a unique *AbaI* site, but no *DnaI* sites in pENTRTM14.
There is a unique *NspV* site, but no *DnaI* sites in pENTRTM11.
** There is a unique *AbaI* site, but no *DnaI* sites and no *SacI* sites in pENTRTM11 only.

VECTOR
pENTR1A

INSERTO
600pb

SECUENCIA
si

CEPA
E.coli(cepa DH10B)

RESISTENCIA
Kanamicina

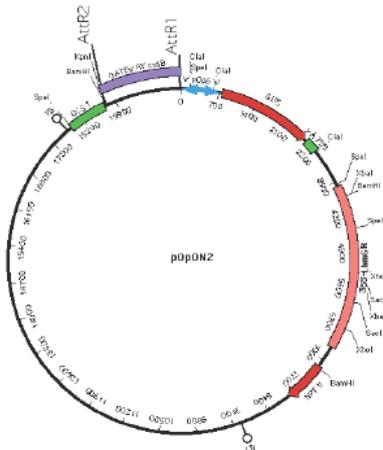
FECHA
21/5/2007

NOMBRE pMNG44

ORIGEN microRNAi-NGA.
Obtenido a partir del plásmido pMNG43, previamente linearizado con PvuII, por reacción Gateway.

PROPOSITO Obtener plantas que sobreexpresen microRNAi-NGA únicamente cuando sean tratadas con Dexametasona.

INSERTO microRNAi-TOP
5' KpnI XhoI Sali ClaI HindIII EcoRV EcoRI PstI microRNAi-NGA BamHI SpeI XbaI NotI SacII SacI 3'



VECTOR
pOpON2

INSERTO
600pb

SECUENCIA
no

CEPA
E.coli(cepa TOP10)
Agro C58

RESISTENCIA
Espectinomicina
(bacterias) Kan
(plantas)

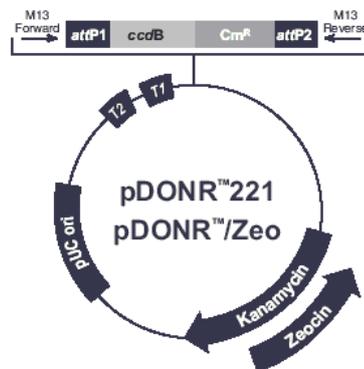
FECHA
3/7/2007

NOMBRE pMNG45

ORIGEN STY1CDS
(ATG en fase)

PROPOSITO Clonar en plásmidos pBIFC, obtener línea de sobreexpresión de STY1 así como otra línea inducible por dexametasona.

INSERTO STY1 CDS
att L1 : 5' ATG STY1 STOP 3' : att L2



VECTOR
pDONR Zeo

INSERTO
759pb

SECUENCIA
si

CEPA
E.coli(cepa TOP10)

RESISTENCIA
Zeocina

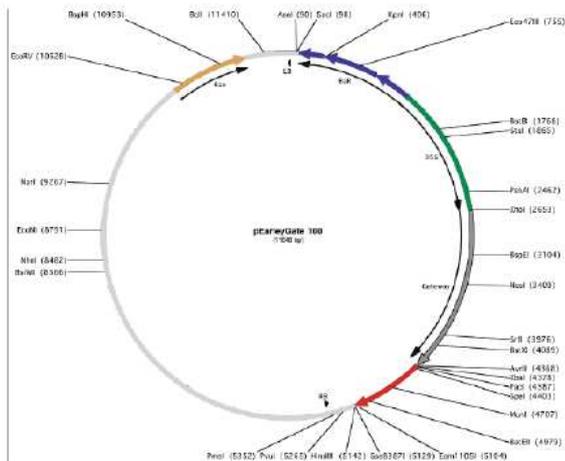
FECHA
29/6/2007

NOMBRE pMNG50

ORIGEN ETT CDS
Procede del plásmido pMNG26 por reacción Gateway.

PROPOSITO Infiltrar *Arabidopsis*. Generar plantas transgénicas que sobreexpresen ETT. Así como para estudios de interacción de proteínas, concretamente ensayo Luciferasa, para estudiar posibles interacciones entre NGA1, STY1 y ETT en la regulación de la expresión de YUCCA4

INSERTO ETT CDS
att B1 : 5' ATG ETT STOP 3' : att B2



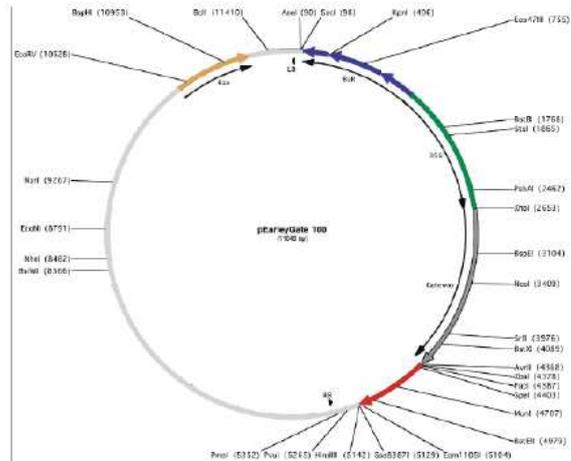
VECTOR pEarleyGate100
INSERTO 1827 pb
SECUENCIA
CEPA E.coli(cepa TOP10) Agro C58
RESISTENCIA Kanamicina
FECHA 1/6/2007

NOMBRE pMNG51

ORIGEN SPT CDS
Procede del plásmido pMNG27 por reacción Gateway.

PROPOSITO Estudios de interacción de proteínas, concretamente ensayo Luciferasa, para estudiar posibles interacciones entre NGA1, STY1 y SPT en la regulación de la expresión de YUCCA4

INSERTO SPT CDS
att B1 : 5' ATG SPT STOP 3' : att B2



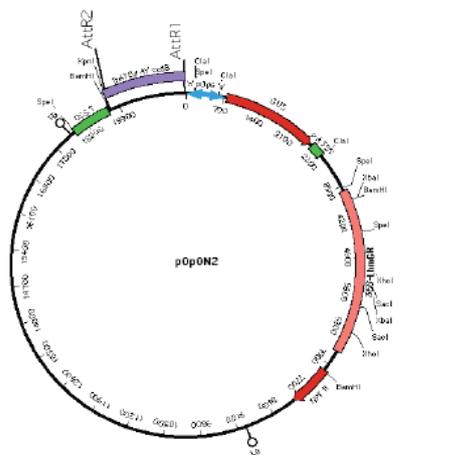
VECTOR pEarleyGate100
INSERTO 1122 pb
SECUENCIA
CEPA E.coli(cepa TOP10) Agro C58
RESISTENCIA Kanamicina
FECHA 1/6/2007

NOMBRE pMNG52

ORIGEN ETT CDS
Procede del plásmido pMNG26 por reacción Gateway.

PROPOSITO Infiltrar *Arabidopsis*. Generar plantas transgénicas que sobreexpresen ETT únicamente cuando sean tratadas con Dexametasona.

INSERTO ETT CDS
att B1 : 5' ATG ETT STOP 3' : att B2



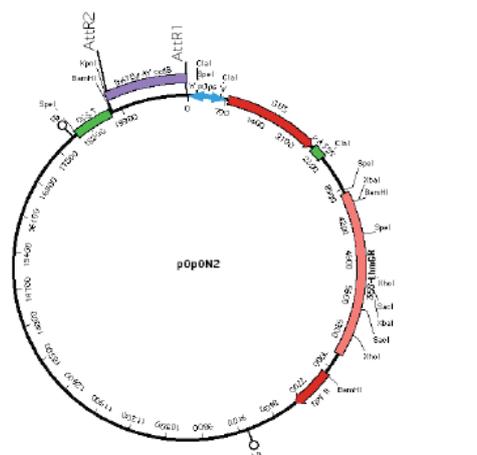
VECTOR pOpON2
INSERTO 1827 pb
SECUENCIA no
CEPA E.coli(cepa TOP10) Agro C58
RESISTENCIA Espectinomicina (bacterias) Kan (plantas)
FECHA 27/11/2007

NOMBRE pMNG53

ORIGEN SPT CDS
Procede del plásmido pMNG27 por reacción Gateway.

PROPOSITO Infiltrar *Arabidopsis*. Generar plantas transgénicas que sobreexpresen SPT únicamente cuando sean tratadas con Dexametasona.

INSERTO SPT CDS
att B1 : 5' ATG SPT STOP 3' : att B2



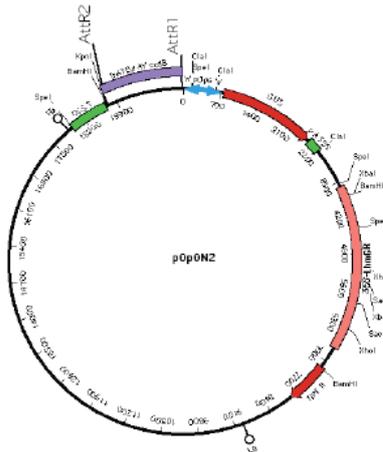
VECTOR pOpON2
INSERTO 1122 pb
SECUENCIA no
CEPA E.coli(cepa TOP10) Agro C58
RESISTENCIA Espectinomicina (bacterias) Kan (plantas)
FECHA 22/4/2007

NOMBRE pMNG54

ORIGEN **STY1 CDS**
Procede del plásmido pMNG45 por reacción Gateway.

PROPOSITO Infiltrar *Arabidopsis*. Generar plantas transgénicas que sobreexpresen STY1, únicamente cuando sean tratadas con Dexametasona.

INSERTO STY1 CDS
att B1 : 5' ATG **STY1** STOP 3' : att B2



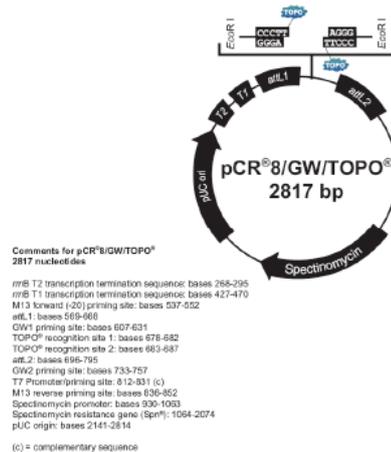
VECTOR
pOpON2
INSERTO
759pb
SECUENCIA
no
CEPA
E.coli (cepa TOP10)
Agro C58
RESISTENCIA
Espectinomycin
(bacterias)Kan
(plantas)
FECHA
22/4/2008

NOMBRE pMNG55

ORIGEN **NGA1::VP16**
Obtenido mediante PCR's seriadas a partir de genómico de *Columbia* con los oligos oMNG38, oMNG39, oMNG-VP16Dir y oMNG-VP16Rev.

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en pEarleyGate100 mediante reacción de Gateway.

INSERTO NGA1::VP16
M13 Directo att L1 :5' (**NGA1::VP16**) 3': att L2 **M13 Reverso**



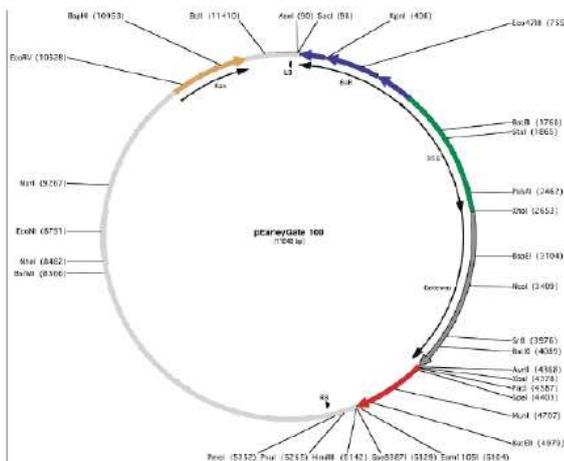
VECTOR
PCR8/GW/TOPO
INSERTO
1200 pb
SECUENCIA
si
CEPA
E.coli(cepa TOP10)
RESISTENCIA
Espectinomycin
FECHA
4/11/2008

NOMBRE pMNG56

ORIGEN **NGA1::VP16**
Procede del plásmido pMNG55 por reacción de Gateway.

PROPOSITO Infiltrar *Arabidopsis*. VP16 proviene del gen VP16 del virus Herpes simple, por tanto, queremos generar plantas transgénicas que sobreexpresen NGA1 pero que allá donde se exprese actúe como activador. También lo utilizamos en el ensayo Luciferasa para comprobar si se une al promotor de YUC4 activando la expresión del gen al que precede.

INSERTO MGA1::VP16
att B1 : 5' (**NGA1::VP16**) 3' : att B2



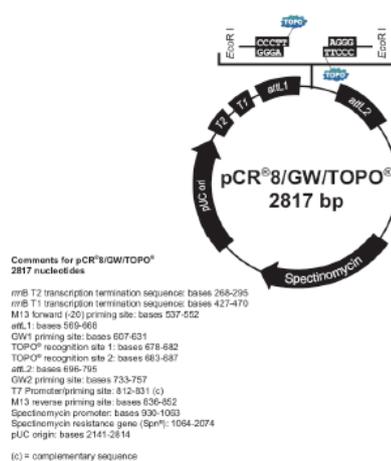
VECTOR
pEarleyGate 100
INSERTO
1200pb
SECUENCIA
no
CEPA
E.coli(cepa TOP10)
Agro C58
RESISTENCIA
Kanamycin
(bacterias y plantas)
FECHA
21/11/2008

NOMBRE pMNG57

ORIGEN **STY1:VP16**
Obtenido mediante PCR's seriadas a partir de genómico de *Columbia* con los oligos oMNG-STY1-3, oMNG-STY1-4, oMNG-VP16Dir y oMNG-VP16Rev.

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en pEarleyGate100.

INSERTO STY1::VP16
M13 Directo att L1 :5' (**STY1::VP16**) 3': att L2 **M13 Reverso**



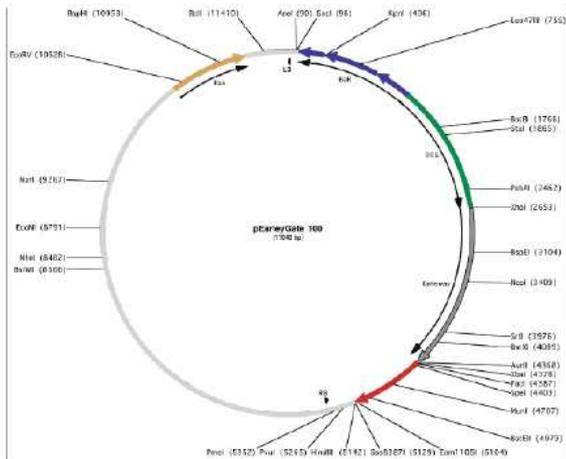
VECTOR
PCR8/GW/TOPO
INSERTO
1000pb
SECUENCIA
si
CEPA
E.coli (cepa TOP10)
RESISTENCIA
Espectinomycin
FECHA
24/10/2008

NOMBRE pMNG58

ORIGEN **STY1::VP16**
Procede del plásmido pMNG57 por reacción Gateway.

PROPOSITO Experimentos de expresión transitoria en tabaco. Queremos comprobar si NGA1 y STY1 regulan conjuntamente la expresión de YUCCA4, eso lo haremos mediante el ensayo de Luciferasa.

INSERTO STY1::VP16
att B1 : 5' (STY1::VP16) 3' : att B2

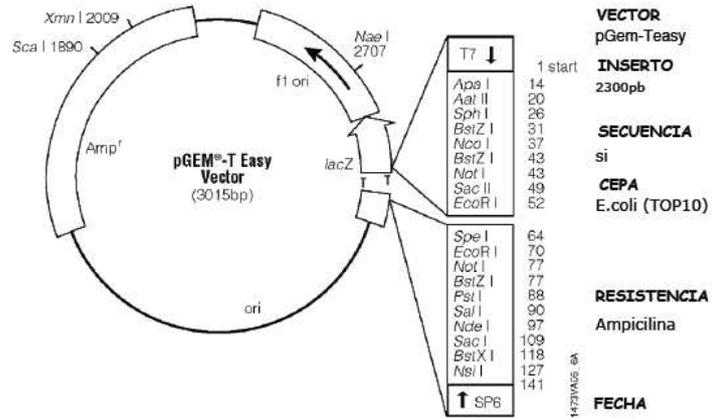


NOMBRE pMNG59

ORIGEN **Promotor YUC4 con sitio NcoI (3')**.
Obtenido por PCR a partir de genómico de Columbia con los oligos YUC4 DII y oMNG-YUC4 RIII

PROPOSITO Paso intermedio para clonar el promotor de YUC4 en pGreenII 0800 -5LUC+.

INSERTO Promotor YUCCA4
T7: 3' NcoI(5' YUC4) 5': SP6



NOMBRE pMNG60

ORIGEN **Promotor YUC4 con sitio NcoI (3')**.
Obtenido a partir del plásmido pMNG59 mediante digestión Sall, comprobación de la linealización total del plásmido, y digestión con NcoI.

PROPOSITO Estudiar posibles interacciones proteicas entre NGA1 y STY1, SPT o ETT, así como todas las posibles combinaciones entre ellos, para regular la expresión de YUC4.

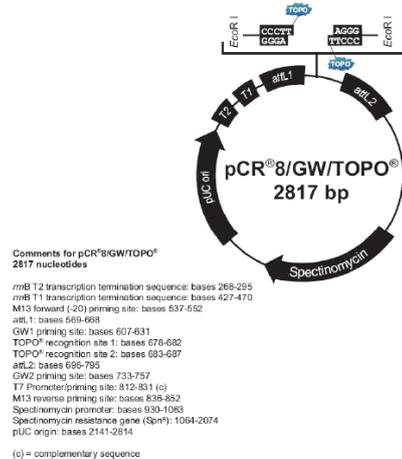
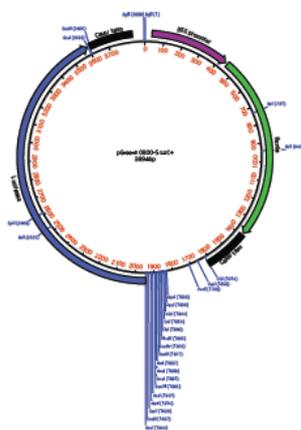
INSERTO Promotor YUCCA4
5' Sall (5' YUC4) NcoI 3'

NOMBRE pMNG61

ORIGEN **CRC CDS**
Obtenido por PCR a partir de cDNA de Columbia con los oligos oMNG-CRC1 y oMNG-CRC2

PROPOSITO Paso intermedio para clonar en pEarleyGate100 y en los plásmidos de BiFC.

INSERTO CRC CDS
M13 Directo att L1 :5' (CRC) 3': att L2 **M13 Reverso**



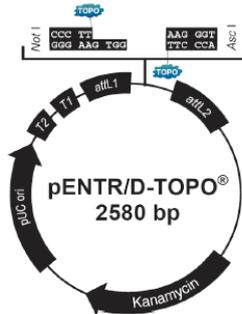
NOMBRE pMNG66

ORIGEN ACT2 CDS
(ATG en fase)

PROPOSITO Clonar en plásmidos pBiFC.

INSERTO ACT2 CDS

att L1 : 5' ATG ACT2 STOP 3' : att L2



Comments for pENTR/D-TOPO®
2580 nucleotides

rrnB T2 transcription termination sequence: bases 268-295
rrnB T1 transcription termination sequence: bases 427-470
M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
attL1: bases 569-688 (complementary strand)
TOPO® recognition site 1: bases 680-684
Overhang: bases 685-688
TOPO® recognition site 2: bases 689-693
attL2: bases 705-804
M13 reverse priming site: bases 845-861
Kanamycin resistance gene: bases 974-1783
pUC origin: bases 1904-2577

VECTOR
pENTR D-TOPO

INSERTO
1134 pb

SECUENCIA

CEPA
E. coli (cepa
TOP10)

RESISTENCIA
Kanamicina

FECHA
18/06/2009

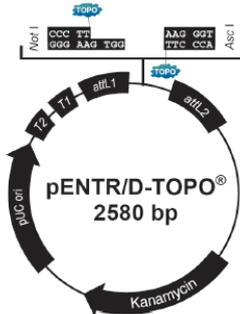
NOMBRE pMNG67

ORIGEN act2-2 CDS
(ATG en fase)

PROPOSITO Clonar en plásmidos pBiFC.

INSERTO act2-2 CDS

att L1 : 5' ATG act2-2 STOP 3' : att L2



Comments for pENTR/D-TOPO®
2580 nucleotides

rrnB T2 transcription termination sequence: bases 268-295
rrnB T1 transcription termination sequence: bases 427-470
M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
attL1: bases 569-688 (complementary strand)
TOPO® recognition site 1: bases 680-684
Overhang: bases 685-688
TOPO® recognition site 2: bases 689-693
attL2: bases 705-804
M13 reverse priming site: bases 845-861
Kanamycin resistance gene: bases 974-1783
pUC origin: bases 1904-2577

VECTOR
pENTR D-TOPO

INSERTO
1134 pb

SECUENCIA

CEPA
E.coli (TOP10)

RESISTENCIA
Kanamicina

FECHA
18/06/2009

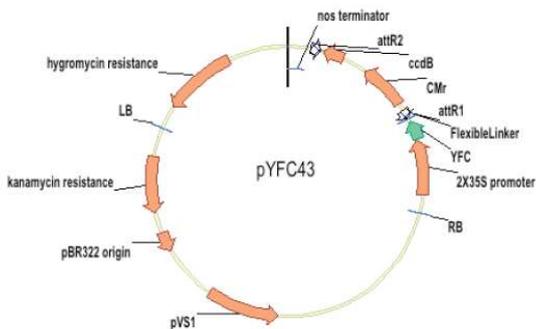
NOMBRE pMNG68

ORIGEN ACT2 CDS
Procede del plásmido pMNG66 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si interaccionan las proteínas ACT2 y NGA41 y ACT2 y BRX.

INSERTO ACT2 CDS

att B1 : 5' ATG ACT2 STOP 3' : att B2



VECTOR
pYFC43

INSERTO
1134pb

SECUENCIA
no

CEPA
e.coli (cepa
DH10B) y agro
(cepa C58)

RESISTENCIA
kanamicina =
amicacina

FECHA
03/07/2009

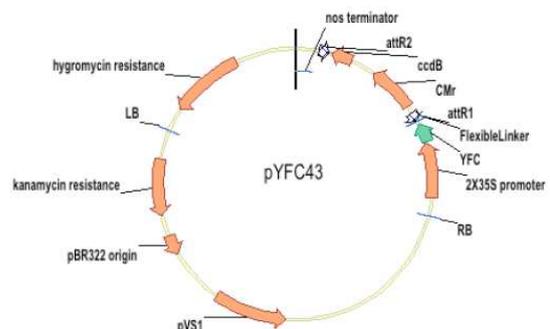
NOMBRE pMNG69

ORIGEN act2-2 CDS
Procede del plásmido pMNG67 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si interaccionan las proteínas act2-2 y NGA1 y act2-2 y BRX.

INSERTO act2-2 CDS

att B1 : 5' ATG act2-2 STOP 3' : att B2



VECTOR
pYFC43

INSERTO
1134pb

SECUENCIA
no

CEPA
e.coli (cepa
DH10B) y agro
(cepa C58)

RESISTENCIA
kanamicina =
amicacina

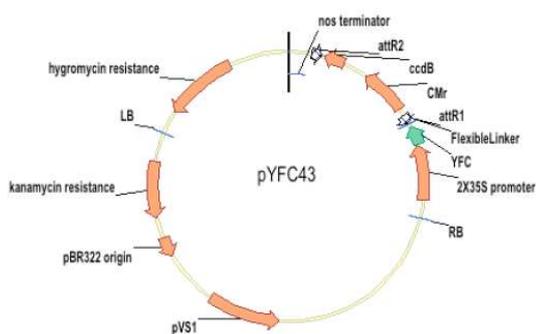
FECHA
03/07/2009

NOMBRE pMNG70

ORIGEN BRX CDS
Procede del plásmido pMNG65 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Estudios de interacción proteína-proteína (BiFC).

INSERTO BRX CDS
att B1 : 5' ATG BRX STOP 3' : att B2



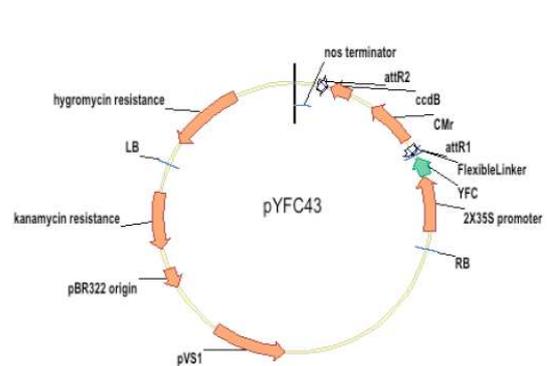
VECTOR
pYFC43
INSERTO
1035 pb
SECUENCIA
no
CEPA
e.coli (cepa DH10B) y agro (cepa C58)
RESISTENCIA
kanamicina = ampicacina
FECHA
03/07/2009

NOMBRE pMNG71

ORIGEN SPT CDS
Procede del plásmido pMNG27 por reacción Gateway.

PROPOSITO Comprobar si las proteínas SPT y NGA1 interaccionan, o cualquier otro gen clonado en el plásmido YFC43

INSERTO STP CDS
att B1 : 5' ATG SPT STOP 3' : att B2



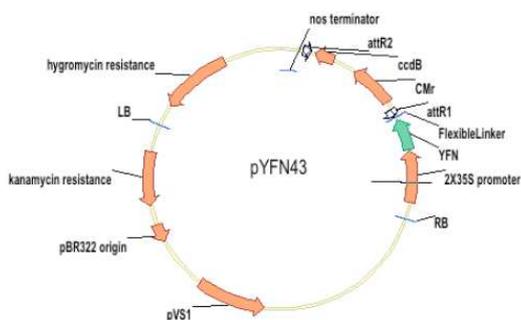
VECTOR
pYFN43
INSERTO
1122 pb
SECUENCIA
no
CEPA
e.coli (cepa DH10B) y agro (cepa C58)
RESISTENCIA
kanamicina = ampicacina
FECHA
14/3/2009

NOMBRE pMNG72

ORIGEN CRC CDS
Procede del plásmido pMNG61 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si las proteínas CRC y NGA1 interaccionan, o cualquier otro gen clonado en el plásmido YFC43

INSERTO CRC CDS
att B1 : 5' ATG CRC STOP 3' : att B2



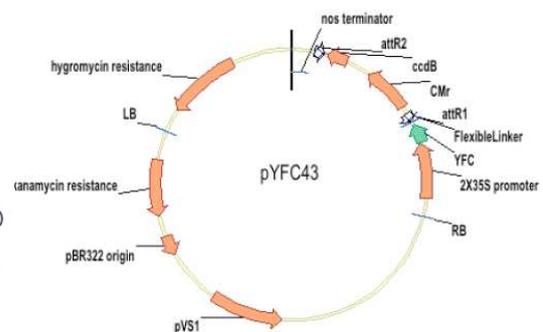
VECTOR
pYFN43
INSERTO
542pb
SECUENCIA
no
CEPA
e.coli (cepa DH10B) y agro (cepa C58)
RESISTENCIA
kanamicina = ampicacina
FECHA
14/3/2009

NOMBRE pMNG73

ORIGEN CRC CDS
Procede del plásmido pMNG61 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si las proteínas CRC y NGA1 interaccionan, o cualquier otro gen clonado en el plásmido YFN43

INSERTO CRC CDS
att B1 : 5' ATG CRC STOP 3' : att B2



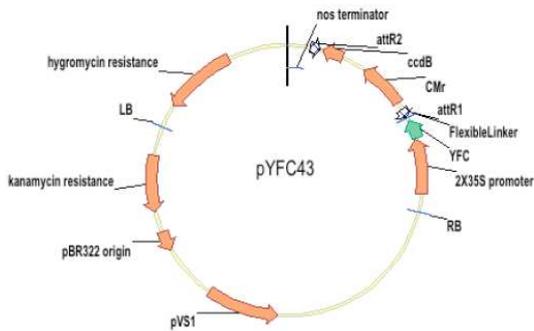
VECTOR
pYFC43
INSERTO
542pb
SECUENCIA
no
CEPA
e.coli (cepa DH10B) y agro (cepa C58)
RESISTENCIA
kanamicina = ampicacina
FECHA
14/3/2009

NOMBRE pMNG74

ORIGEN **STY1 CDS**
Procede del plásmido pMNG45 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si las proteínas CRC y STY1 interaccionan, o cualquier otro gen clonado en el plásmido YFN43

INSERTO STY1 CDS
att B1 : 5' ATG **STY1** STOP 3' : att B2



VECTOR
pYFC43

INSERTO
759pb

SECUENCIA
no

CEPA
e.coli (cepa DH10B)
agro (cepa C58)

RESISTENCIA
kanamicina =
amicacina

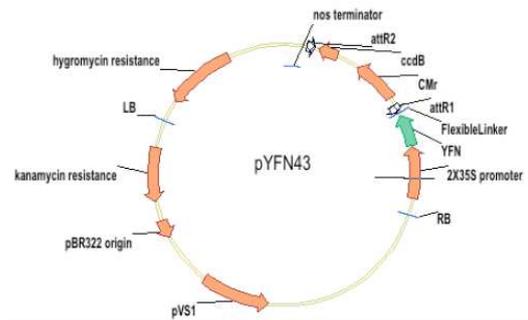
FECHA
14/3/2009

NOMBRE pMNG75

ORIGEN **STY1 CDS**
Procede del plásmido pMNG45 por reacción LR de Gateway.

PROPOSITO Comprobar si las proteínas CRC y STY1 interaccionan, o cualquier otro gen clonado en el plásmido YFC43

INSERTO STY1 CDS
att B1 : 5' ATG **STY1** STOP 3' : att B2



VECTOR
pYFN43

INSERTO
759pb

SECUENCIA
no

CEPA
e.coli (cepa DH10B)
agro (cepa C58)

RESISTENCIA
kanamicina =
amicacina

FECHA
14/3/2009

This article is a *Plant Cell* Advance Online Publication. The date of its first appearance online is the official date of publication. The article has been edited and the authors have corrected proofs, but minor changes could be made before the final version is published. Posting this version online reduces the time to publication by several weeks.

The *NGATHA* Genes Direct Style Development in the *Arabidopsis* Gynoecium

Marina Trigueros,^{a,1} Marisa Navarrete-Gómez,^{a,1} Shusei Sato,^b Sioux K. Christensen,^c Soraya Pelaz,^{b,d} Detlef Weigel,^{c,e} Martin F. Yanofsky,^b and Cristina Ferrándiz^{a,b,2}

^a Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 46022 Valencia, Spain

^b Section of Cell and Developmental Biology, University of California at San Diego, La Jolla, California 92093

^c Plant Biology Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California 92037

^d Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats and Centre for Research in Agricultural Genomics, 08034 Barcelona, Spain

^e Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, 72076 Tübingen, Germany

The gynoecium is the most complex floral organ, designed to protect the ovules and ensure their fertilization. Correct patterning and tissue specification in the developing gynoecium involves the concerted action of a host of genetic factors. In addition, apical-basal patterning into different domains, stigma and style, ovary and gynophore, appears to depend on the establishment and maintenance of asymmetric auxin distribution, with an auxin maximum at the apex. Here, we show that a small subfamily of the B3 transcription factor superfamily, the *NGATHA* (*NGA*) genes, act redundantly to specify style development in a dosage-dependent manner. Characterization of the *NGA* gene family is based on an analysis of the activation-tagged mutant named *tower-of-pisa1* (*top1*), which was found to overexpress *NGA3*. Quadruple *nga* mutants completely lack style and stigma development. This mutant phenotype is likely caused by a failure to activate two auxin biosynthetic enzymes, *YUCCA2* and *YUCCA4*, in the apical gynoecium domain. The *NGA* mutant phenotypes are similar to those caused by multiple combinations of mutations in *STYLISH1* (*STY1*) and additional members of its family. *NGA3/TOP1* and *STY1* share almost identical patterns of expression, but they do not appear to regulate each other at the transcriptional level. Strong synergistic phenotypes are observed when *nga3/top1* and *sty1* mutants are combined. Furthermore, constitutive expression of both *NGA3/TOP1* and *STY1* induces the conversion of the ovary into style tissue. Taken together, these data suggest that the *NGA* and *STY* factors act cooperatively to promote style specification, in part by directing *YUCCA*-mediated auxin synthesis in the apical gynoecium domain.

INTRODUCTION

The last two decades have seen substantial advances in our knowledge of the molecular genetics directing floral meristem and organ identity development, leading to a clear picture of how floral organ identity is acquired (Robles and Pelaz, 2005). Once organ identity is established; however, different tissues must differentiate in the correct pattern to ensure organ function, and we are only now beginning to understand the genetic pathways directing floral organ patterning.

The gynoecium, the female reproductive structure from which fruits derive, is the most complex floral organ. In *Arabidopsis thaliana*, the gynoecium comprises two congenitally fused carpels that arise from the floral meristem forming a hollow cylinder.

Subsequently, apical-basal, adaxial-abaxial, and radial patterns are established and distinct tissues differentiate sequentially. Along the apical-basal axis, the mature *Arabidopsis* gynoecium consists of a short basal, stem-like structure, the gynophore, on top of which a bilocular ovary forms, capped with a solid style and stigmatic papillae (Figure 1A). In the transversal plane, three major regions can be distinguished: the valves, which correspond to the two carpel walls, and the valve margins and the replum in the zones of carpel fusion (Figure 1A). Meristematic tissues are present in the carpel margins, which give rise to the apical style and stigma, and the internal septum, transmitting tract and ovule producing placenta on the adaxial side of the gynoecium (Ferrándiz et al., 1999; Balanza et al., 2006). Most of the tissues that make up these regions in the gynoecium can be distinguished functionally and/or morphologically, and several mutants that specifically affect subsets of these tissues have been identified (Balanza et al., 2006).

The genetic networks underlying differentiation of valves, valve margins, and replum have been extensively studied in the last few years, leading to the proposal of a well-supported and detailed model for patterning on the transversal plane of the ovary (Dinnyen and Yanofsky, 2005; Alonso-Cantabrana et al., 2007). Similarly, a number of mutants affecting the distribution of tissues along the apical-basal axis of the gynoecium have been

¹ These authors contributed equally to this work.

² Address correspondence to cferrandiz@bmcp.upv.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Cristina Ferrándiz (cferrandiz@bmcp.upv.es).

 Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

 Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.065508

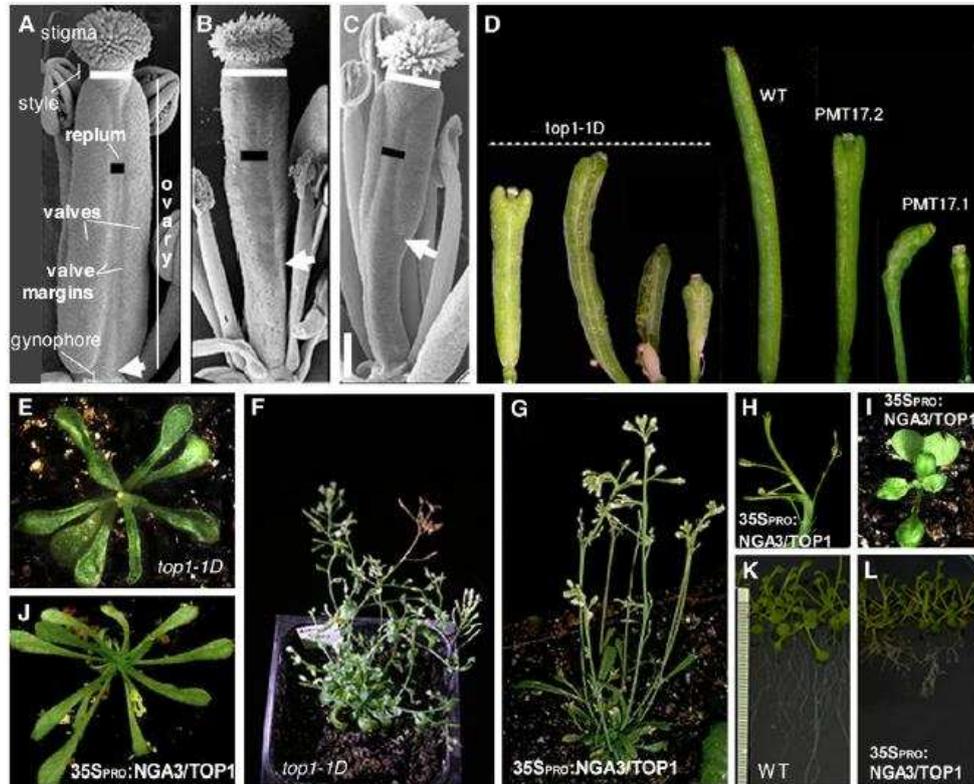


Figure 1. Phenotypes Caused by Ectopic Expression of *NGA3/TOP1*.

(A) to (C) Scanning electron micrographs of anthesis gynoecia from the wild type (A), *top1-1D* (B), and $35S_{PRD}:NGA3$ (C). The different regions of the anthesis gynoecium are indicated in (A). Arrows mark the valve-gynophore boundary, black horizontal bars indicate the width of the replum, and white horizontal bars indicate the width of the style. Bars = 200 μ m.

(D) Comparison of mature siliques from the *top1-1D* mutant (left), the wild type (center), and two independent $35S_{PRD}:NGA3$ lines (right), where PMT17.2 is representative of an intermediate phenotype and PMT17.1 of a strong phenotype.

(E) and (J) Rosette morphology of *top1-1D* (E) and $35S_{PRD}:NGA3$ (J) lines, 20 d after sowing.

(F) and (G) Plant architecture phenotypes of *top1-1D* (F) and $35S_{PRD}:NGA3$ lines (G), 5 weeks after sowing.

(H) Fasciation of the stem in a $35S_{PRD}:NGA3$ inflorescence.

(I) Partially fused cotyledons of a $35S_{PRD}:NGA3$ young plant.

(K) and (L) Root morphology of wild-type Col (K) and $35S_{PRD}:NGA3$ lines (L) grown for 6 d in vertical Murashige and Skoog plates.

identified, but their regulatory hierarchies or their mechanisms of action are much less understood. A major factor for the differentiation of the apical tissues of the gynoecium is the *SPATULA* (*SPT*) gene, which encodes a basic helix-loop-helix transcription factor (Heisler et al., 2001). *spt* mutant gynoecia have reduced style and stigmatic tissues, are partially unfused at the apical end, and lack transmitting tract development (Alvarez and Smyth, 1999). *SPT* protein is able to interact with the *HECATE* basic helix-loop-helix proteins, three related factors that redundantly participate in stigma, septum, and transmitting tract development (Gremski et al., 2007). *STYLISH1* (*STY1*), *STY2*, and other members of the small SHI-like gene family of RING-finger transcription factors also direct apical tissue formation, as

revealed by the partial loss of style and stigma caused by mutations in *STY1* and related genes or the ectopic development of patches of style-like tissue in the valves of plants overexpressing *STY1* (Kuusk et al., 2002, 2006). Somewhat opposite phenotypes to *spt* or *sty* multiple mutants are seen when *ETTIN* (*ETT*)/*AUXIN RESPONSE FACTOR3* is mutated. *ett* mutants show severe defects in apical-basal patterning, with an increase of the apical and basal regions (style/stigma and gynophore, respectively) and a decrease in the size of the ovary (Sessions and Zambryski, 1995; Sessions et al., 1997; Pekker et al., 2005). The regulatory hierarchies of these factors are only partially known. Genetic analyses have placed *STY1* and related genes downstream of *SPT*, although the precise molecular

mechanisms are not known (Groszmann et al., 2008; Staldal et al., 2008). Likewise, it appears that *ETT* restricts *SPT* expression to the apical domain and that ectopic expression of *SPT* is largely responsible for the apical-basal patterning defects in *ett* mutants (Heisler et al., 2001).

Together with these genetic factors, auxin appears to play a key role in the specification of the different domains along the apical-basal axis of the *Arabidopsis* gynoecium. This was first suggested by the phenotypes of mutants affecting auxin transport or signaling. Several of these mutants show defects in apical-basal patterning, with an increase of the apical and basal regions (style/stigma and gynophore, respectively) and a decrease in the size of the ovary (Okada et al., 1991; Bennett et al., 1995; Sessions et al., 1997). Second, gynoecia treated with polar-auxin-transport inhibitors exhibit very similar defects, leading Nemhauser et al. (2000) to propose a model where the apical-basal patterning is dependent on an auxin gradient spanning the gynoecial primordium with peak levels in the apical regions and descending levels basally. According to this hypothesis, high auxin levels would promote proliferation of style and stigma; intermediate levels the ovary and low levels the gynophore. Inhibition of auxin transport in the gynoecium would lead to auxin accumulation in source tissues, hypothesized to be the apical parts, and depletion in the basal regions, which is in agreement with the observed effects (Nemhauser et al., 2000). The *YUCCA* (*YUC*) genes encode flavin monooxygenases involved in auxin biosynthesis. Two of the 11 *Arabidopsis* *YUC* genes, *YUC2* and *YUC4*, are expressed in the apical gynoecium, and multiple *yuc* mutants exhibit a strongly affected gynoecium patterning, supporting the proposed key role of auxin synthesis in the apical domains to direct gynoecium morphogenesis (Cheng et al., 2006). This hypothesis has received further support by the finding that *STY1* activates *YUC4* expression (Sohlberg et al., 2006) and the restoration of *sty1 sty2* defects in apical gynoecium development by exogenous application of auxin (Staldal et al., 2008).

Our understanding of the genetic networks directing apical-basal patterning in the gynoecium has increased greatly in the last few years, although the current models that explain the underlying molecular mechanisms are not as complete as for the transversal plane of the ovary. Among other reasons, it is likely that other gene functions influencing this process have yet to be identified. Among those, there may be highly redundant genes, whose functions are difficult to reveal through traditional mutant screening approaches. This work describes the functional characterization of four highly related genes that promote the formation of apical tissues during carpel development, the *NGATHA* (*NGA*) genes. We identified *NGA3/TOP1*, in an activation tagging mutagenized population (Weigel et al., 2000), by the severe phenotype observed in gynoecium development caused by *NGA3/TOP1* overexpression. We then used a reverse genetics approach to obtain loss-of-function mutants in *NGA3/TOP1* and three closely related homologs, *NGA4*, *NGA2*, and *NGA1*. The *NGA* genes act redundantly to promote apical tissue development in the *Arabidopsis* gynoecium. We present data based on genetic analyses that indicate that the *NGA* genes act in parallel with the *STY* genes to direct style development, partially through activation of *YUC*-mediated auxin synthesis in the apical gynoecium.

RESULTS

Phenotypic Defects of the Activation Tagging Mutant *top1-1D*

To identify genes involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis*, we screened a population derived from an activation-tagging mutagenesis, in which cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S transcriptional enhancers are randomly integrated into the genome. We identified a putative mutant among the primary transformants, which we named *tower-of-pisa1-1D* (*top1-1D*), which showed elongation and patterning defects in silique development (Weigel et al., 2000). This line had very reduced self-fertility; therefore, we outcrossed it to wild-type Columbia (Col) plants to test for heritability of the phenotype in the progeny. The original phenotype was reproduced in approximately three-quarters of the progeny, as expected for a dominant mutation, and cosegregated with herbicide resistance encoded by the activation tagging vector, but showed different degrees of expressivity.

The *top1-1D* plants had severely affected fruit size and shape. The *top1-1D* phenotypes were highly variable even within the same plant: the strongest phenotypes corresponded to fruits with reduced valve size, long gynophores, and enlarged styles (Figure 1B); other fruits showed an abnormal replum morphology (Figures 1B and 1D); finally, aberrant shapes were also found, most frequently an outgrowth of the tip of the valves to produce fruit with the shape of an inverted arrow head (Figure 1D). *top1-1D* plants also showed pleiotropic phenotypes that affected root growth, leaf morphology (Figure 1E), and inflorescence development (Figure 1F), as well as a high rate of mortality before completing the reproductive cycle. The expressivity of these phenotypes was found to be highly variable and rapidly lost in subsequent generations, probably due to silencing of the CaMV 35S enhancer. Therefore, we did not perform a more detailed phenotypic characterization of this line.

top1-1D Mutants Overexpress the *NGA3* Gene Encoding a B3 DNA Binding Protein

The *top1-1D* line was found to contain a single insertion of the activation tagging T-DNA. Plasmid rescue was performed, and we determined the site of insertion in a region covered by BAC T25K16 in chromosome 1. An open reading frame (ORF) annotated as a B3 DNA binding domain protein (At1g01030) was found 2654 bp downstream of the 4x35S enhancer of the T-DNA (see Supplemental Figure 1A online). We found the corresponding RNA to be strongly upregulated in *top1-1D* inflorescences compared with the wild type, where it was detected only at low levels (see Supplemental Figure 1D online). At1g01030 has been described in the literature as *NGA3*, which is part of a small gene family having four members (*NGA1* to *NGA4*; Alvarez et al., 2006). To further confirm that the observed phenotypes were caused by ectopic *NGA3* expression, we transformed wild-type Col-0 plants with two different constructs. CFM97 consisted of a 5.2-kb *EcoRI-PstI* genomic fragment spanning a region containing the *NGA3* ORF placed after a tandem repeat of the CaMV 35S promoter in a pBIN19 vector backbone (35SX2_{PRO}-*NGA3*). The 35SX2_{PRO}:

NGA3 lines showed phenotypes similar to *top1-1D* mutants; moreover, these lines also behaved similarly in the gradual phenotypic attenuation in subsequent generations. To overcome this effect, we generated a new construct, pMT17 (35S_{PRO}:NGA3), where the NGA3 ORF was placed after a single copy of the CaMV 35S promoter in a pGREENII vector backbone. Nine out of 12 35S_{PRO}:NGA3 T1 transgenic lines showed abnormal leaf morphology: rosette leaves were long and narrow and of darker color, similar to those observed in *top1-1D* lines (Figure 1J). Three of them developed carpels with the inverted arrow morphology found in the attenuated *top1-1D* lines, while two other lines showed the strong carpel development defects initially found in the *top1-1D* line: long gynophores, enlarged repla, and reduced valves (Figures 1C and 1D). In addition to their major effect in gynoecium patterning, 35S_{PRO}:NGA3 strong lines showed pleiotropic phenotypes that affected most phases of vegetative and reproductive development. Approximately 20% of the 35S_{PRO}:NGA3 seedlings showed altered cotyledon development, with either fused or cup-shaped cotyledons (Figure 1I). Roots of 35S_{PRO}:NGA3 plants were frequently short and showed a higher proliferation of secondary roots, similar to those grown in the presence of exogenous auxin (Figure 1L). The 35S_{PRO}:NGA3 plants had reduced apical dominance and altered flower phyllotaxy, with frequent fasciation of the stem (Figures 1G and 1H). All these phenotypes have been previously associated with either altered auxin homeostasis or signaling (Bennett et al., 1995). The 35S_{PRO}:NGA3 strong phenotypes were maintained in subsequent generations; therefore, this line could be used for genetic analysis.

Identification of *nga3/top1* Loss-of-Function Mutants

To gain further insight into NGA3/TOP1 gene function, we identified loss-of-function *nga3/top1* mutants in publicly available insertion collections. Two alleles of NGA3/TOP1 from the AMAZE transposon-tagged population (Wisman et al., 1998) and one in the SAIL collection (Sessions et al., 2002) were isolated by reverse genetics in the Col-0 genetic background (see Supplemental Figure 1B online). The strongest phenotypes corresponded to the *nga3-3* allele, where a 600-bp nontransposable fragment of the En-1 element is located in the second exon at position 404 (see Supplemental Figure 1B online). Homozygous *nga3-3* mutant plants showed variable phenotypic effects, affecting only gynoecium development. A variable fraction of the fruits of each plant showed defects in their apical domain. Most frequent were fruit with long and narrow styles, where valve growth was slightly unequal at the top, causing the style to be tilted to one side, hence the original "Tower of Pisa" name (Figures 2A, 2B, 2F, and 2G). Occasionally, fruit showed more severe phenotypes, with an incomplete fusion of the upper region of the carpel that caused a reduced stigma, an abnormal split style, and reduced fertility (Figure 2G). These severe phenotypes were apparent from early stages of development (see Supplemental Figure 2 online). *nga3-1* has a T-DNA insertion at position 221, and *nga3-2* has an En-Spm element inserted at position 861 of the NGA3 ORF. Both *nga3-1* and *nga3-2* plants exhibited only a subtle phenotype of long and narrow styles (Figure 2H), and only at low frequency (<2%) were tilted styles or open gynoecia found.

NGA1, NGA2, and NGA4 Are Related Genes with Similar Function to NGA3/TOP1

Database search analysis revealed three close NGA3/TOP1 homologs in the *Arabidopsis* genome. The four related genes define a subgroup in the RAV family of the B3 superfamily of transcription factors (Swaminathan et al., 2008) and were described previously by Alvarez et al. (2006) as NGA1-NGA4. The most similar to NGA3/TOP1 is NGA4 (41% identity in predicted amino acid sequence), followed by NGA2 (37% identity) and NGA1 (37% identity), with NGA2 and NGA1 being more similar to each other (58% identity).

We identified two insertions in NGA4 in the AMAZE collection, where the En-1 element was inserted at positions -95 (*nga4-2*) and 125 bp (*nga4-3*), respectively, of the NGA4 coding region (see Supplemental Figure 1B online). These mutations caused phenotypes related to those found in *nga3/top1* mutants, fully penetrant, but subtle, affecting style morphology. The styles of both mutant lines were longer and narrower than the wild type, and only occasionally, slightly tilted styles developed, with a stronger effect of the second allele (Figures 2C and 2I). An additional insertion mutant, named *nga2-2*, was identified for NGA2. *nga2-2* mutants had an En-1 element inserted in position 572, which prevented full-length NGA2 RNA accumulation (see Supplemental Figure 1C online) but did not cause clear phenotypic alterations in gynoecium development or elsewhere (Figures 2D and 2J). No insertions were found in the NGA1 coding region, but a line was identified, named *nga1-4*, in which a T-DNA was inserted 171 bp downstream of the stop codon of NGA1 exhibited a significant reduction in NGA1 mRNA levels but had no obvious phenotypic effects other than causing slightly longer styles at low frequency (Figure 2K; see Supplemental Figure 1C online).

Transgenic lines expressing NGA2, NGA3, or NGA4 under the control of the CaMV 35S promoter showed phenotypes similar to those caused by ectopic expression of NGA3 (see Supplemental Figure 3A online). The sequence similarity and the resemblance of both the loss-of-function and the overexpression phenotypes suggested that the four NGA genes could be regulating the same processes. To uncover possible functional redundancy, we characterized double, triple, and quadruple mutants. All double combinations tested showed stronger defects in gynoecium development, especially those containing the *nga3-3* allele. Double mutant combinations with *nga3-3* together with *nga1*, *nga2*, or *nga4* caused most gynoecia to show severe defects in style and stigma development. Double mutant plants showed variable phenotypic expressivity, ranging from completely unfused carpels with poor style or stigma development to mild defects in apical gynoecium development similar to the typical tilted styles of *nga3-3* single mutants (Figures 2L to 2O). The most striking phenotypes were observed in triple and quadruple mutants in which all carpels were completely unfused at the apical end, terminating in serrated structures with no apparent style or stigma development (Figures 2P to 2R). Dose-dependent function of the four NGA activities was further suggested by the long narrow and occasionally tilted styles found in quadruple heterozygotes (*nga1-4/+ nga2-2+ nga3-3+ nga4-3/+*; Figure 2E). In addition to defects in gynoecium morphology, triple and quadruple mutants developed enlarged serrated leaves and flowered slightly later than the wild type (see Supplemental Figure 3B online).

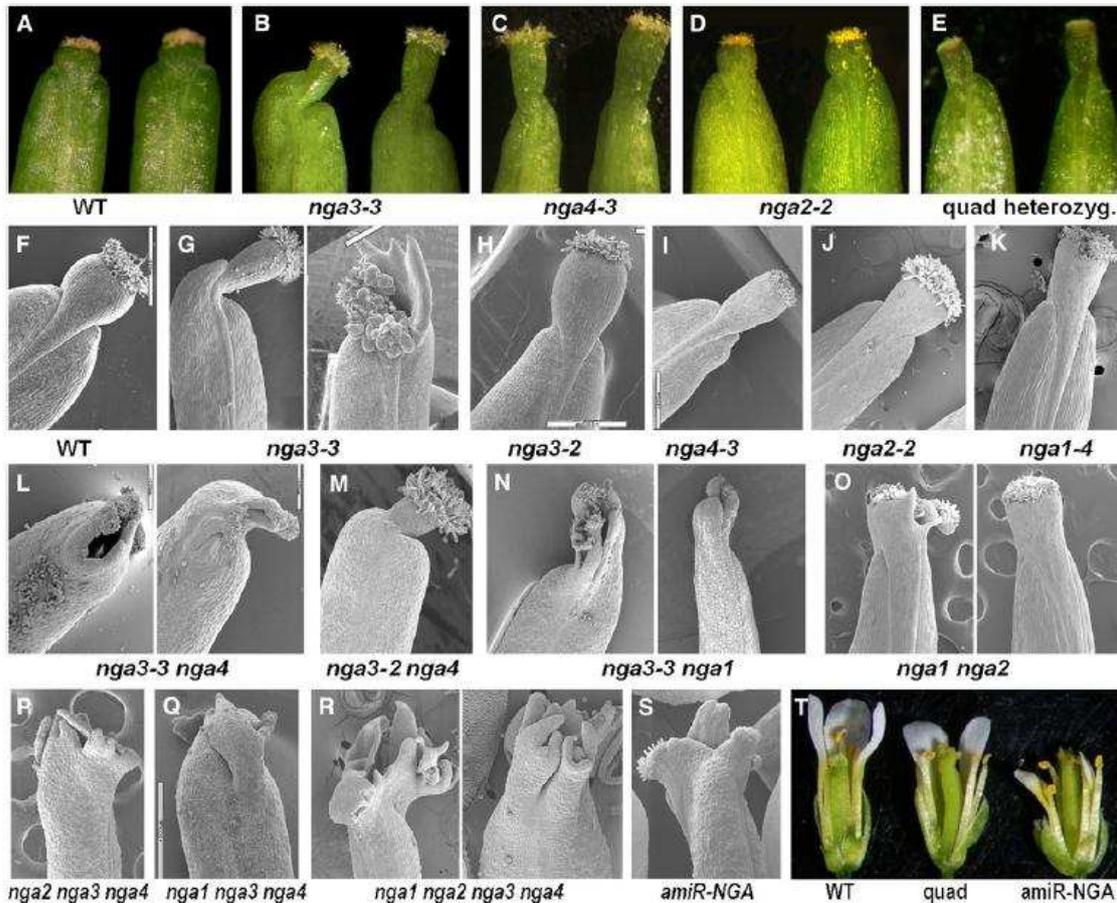


Figure 2. Phenotypes Caused by Different Mutations in the NGA Genes and Their Combinations.

(A) to (E) Apical regions of mature siliques from wild type (A), *nga3-3* (B), *nga4-3* (C), *nga2-2* (D), and a quadruple heterozygote *nga1-4/+ nga2-2/+ nga3-3/+ nga4-3/+* (E).

(F) to (S) Scanning electron micrographs of fruits 10 d after anthesis from the wild type (F), *nga3-3* (G), *nga3-2* (H), *nga4-3* (I), *nga2-2* (J), *nga1-4* (K), *nga3-3 nga4-3* (L), *nga3-2 nga4-3* (M), *nga3-3 nga1-4* (N), and *nga1-4 nga2-2* (O) and scanning electron micrographs of anthesis gynoecia from triple mutants *nga2-2 nga3-3 nga4-3* (P), *nga1-4 nga3-3 nga4-3* (Q), the quadruple mutant *nga1-4 nga2-2 nga3-3 nga4-3* (R), and from an amiR-NGA line carrying the amiRNA targeted against the four NGA genes (S).

(T) Flowers at approximately stage 14 of the wild type, *nga* quadruple mutants, and an amiR-NGA line. Note the protruding gynoecia and the abnormally short sepals and petals.

Since some of the alleles that we were using were not null, and to facilitate genetic analyses, we generated a line where an artificial miRNA targeting the four NGA genes was expressed under the control of the CaMV 35S promoter (amiR-NGA line; see Supplemental Figure 4A online) (Schwab et al., 2006). Four independent amiR-NGA lines showing identical phenotypes were selected, and RNA levels for the four NGA genes were shown to be significantly reduced (see Supplemental Figure 4B online). These lines showed a slightly stronger phenotype than the quadruple *nga1 nga2 nga3 nga4* mutant, probably due to the weak nature of the *nga1* allele used in our study. While carpel

development was similarly affected in the amiR-NGA lines and the quadruple mutant, all floral organs in amiR-NGA plants were shorter than in the *nga1 nga2 nga3 nga4* quadruple mutants (Figure 2T), and leaf serration and expansion was further enhanced (see Supplemental Figure 3B online), suggesting a general role for NGA genes in the regulation of lateral organ growth.

NGA Genes Are Widely Expressed throughout Development

Real-time PCR analysis showed NGA1, NGA2, NGA3/TOP1, and NGA4 genes to be expressed in all tissues tested (roots, stems,

leaves, and inflorescences; see Supplemental Figure 5A online), confirming the data available from the AtGenExpress expression atlas (Schmid et al., 2005). RNA in situ hybridization was performed on wild-type inflorescences. *NGA3/TOP1* and *NGA4* showed similar patterns of expression. *NGA3/TOP1* transcript was detected in the inflorescence and floral meristems, with stronger expression at the center of floral meristems at stages 2 and 3 (Figure 3A). Low *NGA3/TOP1* expression was found in developing floral organs with higher RNA levels at the distal portion of all growing primordia (Figure 3B). From stage 9 flowers, *NGA3/TOP1* RNA accumulated in the developing style and stigma and strongly in developing ovules (Figure 3C). *NGA4* RNA was detected in a similar pattern to *NGA3/TOP1* (Figures 3D and 3E).

NGA2 and *NGA1* patterns of expression were also similar to that described for *NGA3/TOP1* and *NGA4*, although some differences were apparent. In floral meristems, *NGA1* expression was detected preferentially in the adaxial half of the floral primordium (Figure 3I). *NGA1* expression was detected in all floral organ primordia with stronger expression levels in distal positions (Figures 3I and 3J). In the gynoecium primordium, up to stage 8, expression was strong at the apical end and in the adaxial (internal) side of the gynoecial tube (Figure 3J). From stage 10, *NGA1* expression restricted to placental tissue, apical regions, and developing ovules, similar to what was observed for *NGA3/TOP1* and *NGA4* (Figures 3K and 3L). However, the expression levels at the apical end relative to expression in ovules appeared lower than those observed for *NGA3/TOP1* and *NGA4* at similar stages (cf. Figures 3C and 3E to 3L). *NGA2* expression pattern followed that of *NGA1* (Figures 3F to 3H).

To describe in more detail the spatial and temporal pattern of *NGA3/TOP1* expression, we generated transgenic lines harboring a *NGA3/TOP1* reporter construct, pMT5, in which a fragment of *NGA3/TOP1* upstream genomic sequence (−2728 to +12), including the first untranslated exon and the first and only intron, was fused to the β-glucuronidase (GUS) coding sequence.

Twelve out of 15 pMT5 independent lines showed identical patterns of GUS expression. In these lines, *NGA3_{PRO}:GUS* activity was found in a wide complex spatial pattern. In seedlings, GUS was detected in hypocotyls and cotyledons (Figure 3O), and strong signals were associated with very young leaf primordia, especially at the distal tip (Figure 3O; see Supplemental Figures 5B and 5C online). In expanded leaves, GUS was mainly detected in the hydathodes (see Supplemental Figure 5D online). In roots, signal was detected just above the root meristem and in lateral root primordia (Figures 3M and 3N). In reproductive structures, GUS activity matched RNA in situ hybridization results. In inflorescences, GUS activity was found at high levels in all meristems and young floral organ primordia (Figure 3Q). In developing flowers, GUS activity was associated with young floral organ primordia, with a maximum in the distal tips of the organs and decreasing as these organs grew and differentiated (Figure 3Q). In young carpel primordia (up to stages 7 to 8), GUS was detected at high levels in the apical end, decreasing toward the base (Figures 3Q and 3R). Previous to apical closure of the gynoecium (stage 9), GUS was detected only in the developing ovules and the apical ring of the gynoecial tube (Figure 3R).

Expression in ovules was strongest in the nucellus (Figure 3S). From stage 10 to anthesis, expression in the apical gynoecium was maintained, but restricted progressively to the region between the style and the incipient stigma (Figures 3P and 3R). In ovules of anthesis or stage 14 flowers, GUS activity was uniformly detected (Figure 3T). After anthesis, GUS gradually disappeared from the apical end and was restricted to the abscission zone of floral organs and the embryo, where it was expressed uniformly through seed development (Figures 3P, 3U, and 3V). In summary, *NGA3_{PRO}:GUS* confirmed RNA in situ data through inflorescence and flower development and revealed the *NGA3/TOP1* expression pattern in vegetative tissues.

nga Mutants Are Affected in Auxin Responses

We had noted that the phenotype of *NGA*-overexpressing lines resembled plants with increased levels of auxin; for example, rosette morphology in *35S_{PRO}:NGA3* plants is very similar to plants overexpressing the *YUC* auxin biosynthesis genes (Woodward et al., 2005; Kim et al., 2007). In addition, *NGA3_{PRO}:GUS* was detected in positions normally associated with high levels of auxin synthesis or accumulation, such as hydathodes, lateral root primordia, distal gynoecium, or ovule primordia (Aloni et al., 2003, 2006). To check whether *NGA* loss of function affected auxin responses, we determined classical auxin responses in *nga* mutants, such as root gravitropism, lateral root formation, and apical dominance. We found a modest reduction of all these traits in different *nga* mutant combinations (see Supplemental Figures 6B to 6D online).

It has been described that vascular development is induced by auxin (Reinhardt, 2003) and that the modification of auxin distribution, such as inhibiting auxin transport by treatment with naphthylphthalamic acid (NPA; a drug blocking polar auxin transport) affects vascular patterning in the gynoecium (Nemhauser et al., 2000). In the wild-type anthesis gynoecium, the medial veins running along the repla bifurcate near the valve-style junction to form ramified vascular fans (Figure 4A). We observed a slight reduction of these stylar fans in all *nga* single mutants, with a lower point of medial vein bifurcation (see Supplemental Figure 6A online). *nga3 nga4* double mutants showed an enhanced phenotype, with medial veins bifurcating at even lower positions and producing less stylar fans (Figure 4B). In a few severely affected flowers of *nga3 nga4* double mutants and in triple or quadruple mutants, vascular development was strongly perturbed: the medial vein did not bifurcate and stopped below the presumptive style, and in consequence no stylar fans were formed (Figure 4C). Conversely, *35S_{PRO}:NGA3* gynoecia showed an extensive vascular development that resulted in increased stylar fans (Figure 4D). Lateral veins in all mutant backgrounds were less affected, being occasionally shorter than in the wild type (Figure 4).

Exogenous treatment with auxin, inhibition of auxin transport by NPA treatment, or genetically elevated auxin levels (in *35S_{PRO}:YUC1* plants) did not alter *NGA3_{PRO}:GUS* expression, indicating that the *NGA3/TOP1* gene was not induced by high auxin levels (see Supplemental Figures 6E to 6I online). To determine if reducing auxin levels in the tissues in which *NGA3/TOP1* is normally expressed influences gynoecium development, we

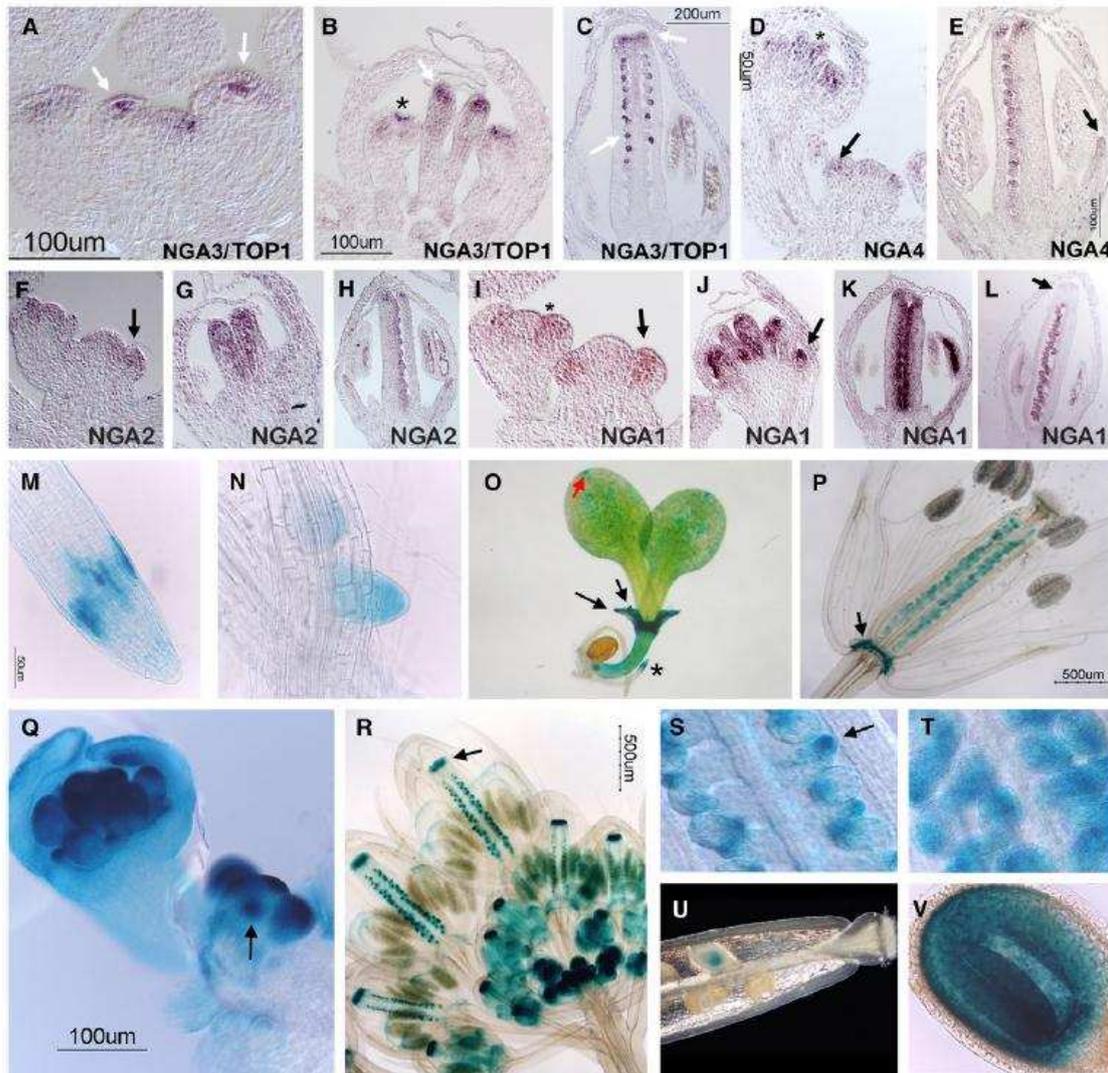


Figure 3. Expression Pattern of *NGA* Genes.

(A) to (L) RNA in situ hybridization in wild-type inflorescences and developing flowers.

(A) to (C) *NGA3/TOP1* RNA expression pattern.

(A) Inflorescence apex showing localized expression of *NGA3/TOP1* in the center of the floral meristems (arrows).

(B) Stage 8 flower showing strong *NGA3/TOP1* expression at the distal end of the gynoeical tube (arrow) and the tip of the stamens (asterisk).

(C) Stage 11 flowers showing *NGA3/TOP1* expression at the apical end of the gynoecium and the external surface of the ovules (arrows).

(D) and (E) *NGA4* RNA expression pattern.

(D) Inflorescence apex showing expression of *NGA4* in the floral meristems (arrow) and the apical portion of the growing gynoecium (asterisk) and the stamens of a stage 7 flower (top left).

(E) Stage 10 flower showing *NGA4* expression at the apical end of the gynoecium and the external surface of the ovules. *NGA4* expression is also detected in the tip of the growing petals (arrow).

(F) to (H) *NGA2* RNA expression pattern.

(F) Inflorescence apex. *NGA2* expression is detected in the adaxial half of the stage 2 floral primordium (arrow) and in the adaxial side of sepal primordia of the stage 4 flower on the left.

(G) Stage 7 flower. *NGA2* is detected in the adaxial side of the gynoeical tube.

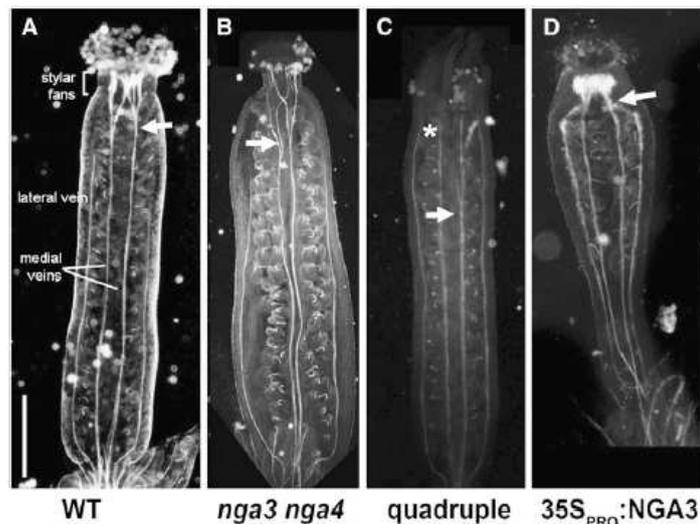


Figure 4. Vascular Patterning in Wild-Type, *nga* Mutant Combinations, and 35S_{PRO}:NGA3 Gynoecia at Anthesis.

(A) The wild type.

(B) *nga3-3 nga4-3* double mutants. Vascular fans in the style appear very reduced.

(C) *nga1-4 nga2-2 nga3-3 nga4-3* quadruple mutant. Medial vein bifurcation is found at a low position (arrow) or is absent (asterisk). No vascular fans are formed.

(D) 35S_{PRO}:NGA3. Vascular fans at the style overproliferate. Bifurcation of the medial vein is distalized.

Bar = 500 μ m. Arrows indicate medial vein primary bifurcation.

expressed the *laaL* gene from the *NGA3/TOP1* promoter (NGA3_{PRO}:*laaL*). *laaL* is a bacterial gene that encodes an enzyme that inactivates free auxin through conjugation to Lys (Jensen et al., 1998). We found that in NGA3_{PRO}:*laaL* transgenic plants, >50% of the gynoecia had reduced apical tissues, similar to that

observed in *nga* double mutant combinations (Figure 5). These data are consistent with the idea that *NGA3/TOP1* could be promoting auxin accumulation in the apical gynoecium and that the *nga* phenotypes were related to reduced auxin levels in this domain.

Figure 3. (continued).

(H) Stage 9 flower showing *NGA2* expression at the apical end of the gynoecium and the placental tissue. *NGA2* expression is also detected in the tip of the growing petals.

(I) to (L) *NGA1* RNA expression pattern.

(I) Inflorescence apex. *NGA1* expression is similar to *NGA2* in (F). *NGA1* is expressed in the adaxial side of the stage 2 flower (arrow) and the adaxial side of sepal primordia in the stage 4 flower on the left (asterisk).

(J) Stage 7 flower. *NGA1* is detected in the adaxial side of the gynoecial tube, the stamen primordia, and in the tip of the petal primordia (arrow).

(K) Stage 9 flower showing *NGA1* expression in the placenta and the apical end of the developing gynoecium.

(L) Stage 11 flower similar to that shown in (C). Expression of *NGA1* is detected in the ovules but is very reduced in apical positions (arrow).

(M) to (V) NGA3_{PRO}:GUS histochemical staining.

(M) Primary root of a 5-d-old seedling.

(N) Emerging lateral root primordium.

(O) Young seedling showing expression in the emerging leaves (black arrow), the distal end of the cotyledons (red arrow), and the root tip (asterisk).

(P) Stage 14 flower (after anthesis). GUS activity is detected in the ovules, the abscission zone of floral organs (arrow), and in a thin layer between the style and the stigma.

(Q) Inflorescence apex. GUS activity is detected in the center of emerging floral primordia (arrow) and the tip of floral organs (stage 7 flower on the left). (R) GUS staining in an inflorescence with flowers of different stages. Staining in developing flowers is mainly associated with the apical end of gynoecia (arrow), the ovules, and the distal portions of developing petals and stamens.

(S) Ovule primordia of a stage 12 flower. GUS activity is detected mainly in the outer integument and the nucellus (arrow).

(T) Stage 14 flower showing uniform GUS activity in the ovules.

(U) In stage 17 fruits, GUS detection is restricted to the developing embryo.

(V) Mature seed showing uniform GUS staining in the embryo.

NGA and STY Genes Cooperatively Interact to Activate YUC4 and to Direct Style Development

The *STY1* gene encodes a RING-finger transcription factor belonging to a small family of nine members (SHI-like). *sty1* mutants show subtle defects in style and stigma development (Figures 6A, 6C, 6E, and 6G), which increase in severity when combined with mutations in the other members of the family, similarly to what we observed for *nga* multiple mutants (Kuusk et al., 2006). Moreover, the overexpression of *STY1* shows similarities to that of *NGA3/TOP1*, such as the narrow shape of leaves or the massive vascular fans in the style (Kuusk et al., 2002). In addition, the *STY1* and *NGA3/TOP1* patterns of expression are almost identical (Kuusk et al., 2002).

The combination of *nga3/top1* and *sty1* mutations severely altered gynoecium development. *nga3-3 sty1-1* carpels appeared unfused at the apical end and lacked most of the style and the stigma, which were transformed into leafy protrusions and frequently developed hom-like structures (Figures 6B and 6F). *nga3 sty1* mutants had reduced fertility, probably as a consequence of the reduction of the transmitting tissues and subsequent lack of ovule fertilization. *nga3 sty1* double mutants resembled multiple combinations of mutations in the SHI-like gene family (Kuusk et al., 2006) or in the NGA family (Figure 2F). Moreover, in a *nga3 sty1 sty2* triple mutant, the *sty2* mutation did not further enhance the *nga3 sty1* phenotype (Figures 6D and 6H) and, conversely, neither did *nga4* in a triple *nga3 nga4 sty1* mutant (see Supplemental Figure 7 online). We introduced a *STY1_{PRO}:GUS* reporter gene (Kuusk et al., 2002) into a *nga3 nga4* mutant background and into an amiR-NGA line. In both backgrounds, we found *STY1* pattern of expression to be similar to the wild type, indicating that *STY1* was not regulated by NGA activities (Figures 6K and 6L). Likewise, *NGA3_{PRO}:GUS* activity was unaffected in a *sty1 sty2* background (Figures 6I and 6J). Taking these data together, it appears that the NGA and SHI-like factors do not regulate each other's expression, but probably SHI-like and NGA proteins require each other to exert their functions, at least in the gynoecium context.

Interestingly, a gene driving auxin synthesis, *YUC4*, has been suggested as a putative direct *STY1* target (Sohlberg et al., 2006). *YUC4* is expressed in wild-type gynoecia in the apical

domain and in the developing ovules, overlapping with both *STY1* and *NGA3/TOP1* expression domains. Since *nga* mutant phenotypes mimicked the effect of reducing auxin levels in the apical gynoecium, we wondered whether *YUC4* activation could be dependent on NGA activity. To test this hypothesis, a *YUC4_{PRO}:GUS* reporter line (Cheng et al., 2006) was crossed to an amiR-NGA line, which as shown in Figures 7A and 7B, still expresses *STY1* in the apical gynoecium. *YUC4* expression was very reduced or absent in apical gynoecial tissues of this line, indicating that STY factors may require NGA activity to upregulate the *YUC4* gene in the style (Figures 7C and 7D). Since *YUC2*, an additional member of the *Arabidopsis YUC* family, is also expressed in the style, we also checked *YUC2_{PRO}:GUS* expression (Cheng et al., 2006) in amiR-NGA lines. As for *YUC4*, *YUC2* expression was absent or very reduced in amiR-NGA apical gynoecia (Figures 7E and 7F).

No positive interactions were found between *NGA3/TOP1* and *STY1* in a yeast two-hybrid assay or in a bimolecular fluorescence complementation experiment in planta (data not shown). Still, this did not exclude the possible synergy of both factors on putative common targets to direct apical gynoecium development. To test for this interaction, we generated a *35S_{PRO}:STY1 35S_{PRO}:NGA3* line. We found a new phenotype in the double overexpressors, dramatically different from that of the individual *STY1* and *NGA3/TOP1* overexpressing lines. As previously described, *NGA3/TOP1* overexpression strongly affected gynoecium patterning, which developed fruits with long gynophores, reduced ovaries, and enlarged misshaped repla (Figure 8B). Vegetative phenotypes included narrow leaves, altered phyllotaxis, and smaller plant size (Figure 1). The *35S_{PRO}:STY1* phenotypes consisted of ectopic style tissue in patches in the center of the valves, which caused wrinkled ovaries to develop, and similar but weaker vegetative phenotypes to *35S_{PRO}:NGA3* plants (Figure 8A; Kuusk et al., 2002). In *35S_{PRO}:NGA3 35S_{PRO}:STY1* lines, overall plant size was further reduced. Leaf size, internode length, and flower size were strongly decreased (Figure 8G). Surprisingly, in the floral context, overall gynoecium morphology was much less affected than in the individual overexpressing lines. The relative proportions of gynophore, ovary, and apical tissues were restored to the wild type, although overall fruit size was strongly reduced (Figure 8C). While a clear distinction of valve, valve margin, and replum was observed, most epidermal cells in the valves showed the characteristic morphology of style cells, with regular morphology, early differentiating stomata, and typical crenellations (Figures 8D to 8F, 8H, and 8I). The replacement of valve tissues by style cells in the ovary of *35S_{PRO}:NGA3 35S_{PRO}:STY1* plants strongly supports the hypothesis that the STY and NGA proteins act cooperatively to direct style identity specification.

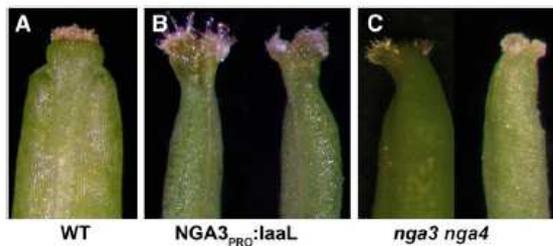


Figure 5. Effect in the Fruits of Reducing Auxin Levels in the *NGA3/TOP1* Expression Domain.

Apical regions of young fruits of the wild type (A), *NGA3_{PRO}:laaL* (B), and *nga3-3 nga4-3* double mutants (C). Styles of *NGA3_{PRO}:laaL* and *nga3 nga4* fruits appear poorly developed and partly unfused.

DISCUSSION

The NGA Genes Act Redundantly to Direct Fruit Patterning in the *Arabidopsis* Gynoecium in a Dose-Dependent Manner

We have shown here that the NGA factors are redundantly required for style and stigma specification and that this

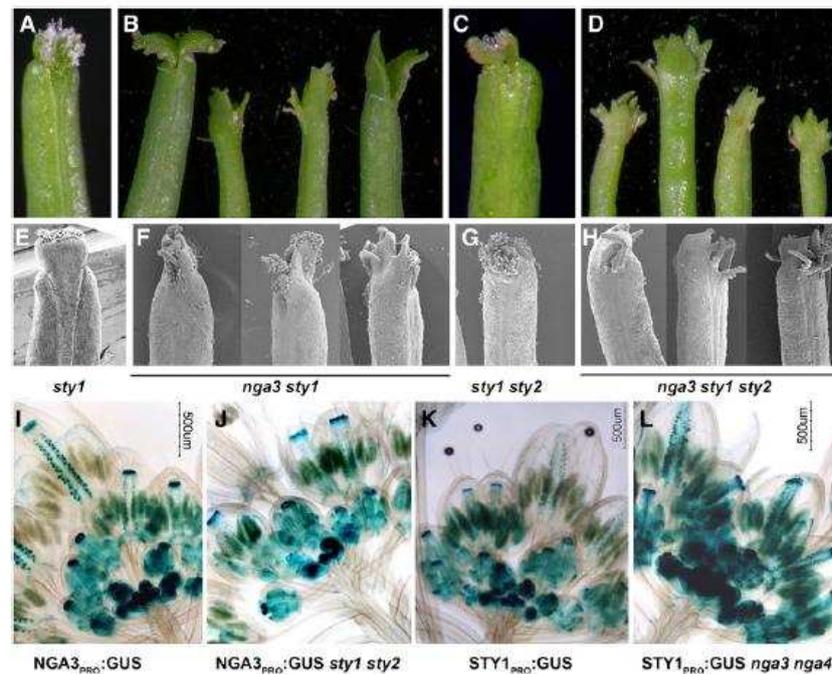


Figure 6. Genetic Interactions between *NGA* and *STY* Family Members.

Apical regions of mature siliques [(A) to (D)] and scanning electron micrographs of anthesis gynoecia [(E) to (H)].

(A) and (E) *sty1* mutant.

(B) and (F) *nga3-3 sty1* double mutants. The phenotype is similar to the quadruple *nga* mutant in Figure 2.

(C) and (G) *sty1 sty2* double mutant. The phenotype of the unfused style is enhanced with respect to the *sty1* single mutant in (A).

(D) and (H) *nga3-3 sty1 sty2*. The phenotype is identical to the double *nga3-3 sty1* mutants.

(I) and (J) Histochemical detection of *NGA3*_{PRO}:GUS in wild-type (I) or *sty1 sty2* double mutant inflorescences (J). No significant differences were found.

(K) and (L) Histochemical detection of *STY1*_{PRO}:GUS in wild-type (K) or *nga3 nga4* double mutant inflorescences (L). Likewise, *STY1* expression is not significantly altered in the *nga3 nga4* mutant background.

redundancy is dosage dependent. While single mutants in the different *NGA* loci show subtle or no defects in carpel morphology, higher-order mutant combinations exhibit increasingly enhanced defects in apical gynoecium development, which is completely disrupted in the quadruple mutant. Among all the alleles used in this study, only *nga3-1* and *nga4-3* are likely to be null, both of them showing a weak phenotype in the style. *nga7-4* and *nga2-2* do not exhibit abnormal gynoecium development, but since they are probably not null, it is not possible to conclude whether their functions are completely redundant or not. The strongest phenotype corresponds to the *nga3-3* allele, where the *NGA3* gene bears an Spm fragment insertion toward the end of the B3 domain, which might produce a truncated protein that could have an antimorphic effect. The style phenotype of the quadruple mutant had already been preliminary described when the *NGA* genes were targeted by an amiRNA as proof of concept for the use of amiRNAs in functional studies (Alvarez et al., 2006).

The four members of the *NGA* family share a common organization, with a single N-terminal B3 DNA binding domain and three short conserved motifs in the C-terminal half (see Supple-

mental Figures 1B and 8A online). Sequence similarity is high throughout the B3 domain, but also extends to the rest of the protein, being higher between the pairs *NGA1/NGA2* and *NGA3/NGA4*. Conservation of protein sequence fits well with the highly similar phenotypes of plants overexpressing any of the four *NGA* genes. In addition, expression patterns of *NGA* genes are also similar. The four *NGA* loci are located toward the telomeric regions of different chromosomes, in regions that have been shown to correspond to duplicated blocks (Blanc et al., 2003). A cumulative benefit related to gene dosage effects and/or benefits derived from buffering against dominant-negative mutations can explain the frequency of functional redundancy. Regulatory proteins are often part of multimeric complexes particularly sensitive to gene dosage and dominant-negative mutations; accordingly, transcription factors are overrepresented among the duplicated genes retained in the *Arabidopsis* genome (Blanc and Wolfe, 2004). The unusual level of redundancy found in the *NGA* genes is in agreement with their proposed regulatory role directing carpel development and parallels that of *STY* family members in highly related functions, suggesting a concerted

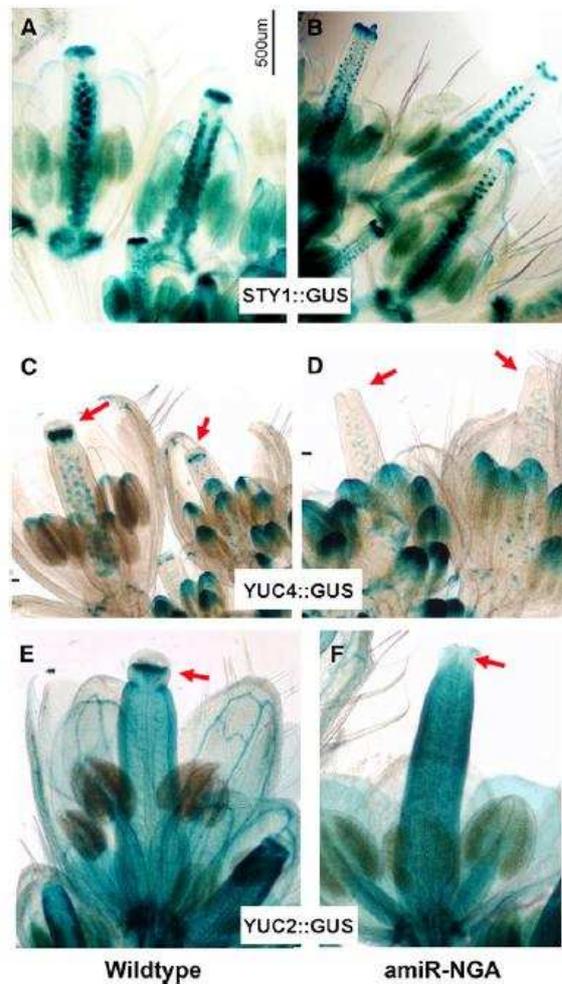


Figure 7. Reduced NGA Activity Severely Affects *YUC2* and *YUC4* Expression in the Style.

Histochemical detection of GUS activity driven by *STY1* (**[A]** and **[B]**), *YUC4* (**[C]** and **[D]**), or *YUC2* promoters (**[E]** and **[F]**) in inflorescences of the wild type (**[A]**, **[C]**, and **[E]**) and an amiR-NGA line (**[B]**, **[D]**, and **[F]**). While *STY1* expression is not affected by the reduced NGA activity in the amiR-NGA lines, *YUC4* and *YUC2* are activated only in the style of wild-type gynoecia and not in the amiR-NGA lines. Arrows indicate styles of flowers at different stages of development.

action of NGA and STY factors that could require an adequate stoichiometry of both activities (see below).

Database mining has not revealed any NGA homologs with a similar domain organization outside the angiosperms. Intriguingly, while the copy number of NGA genes in *Arabidopsis* is consistent with a single ancestor previous to monocot/dicot divergence, in species where whole-genome sequence is available, NGA homologs with similar domain organization are found

frequently in several copies that could possibly be derived from independent duplication events (for example, at least five related proteins are found in *Oryza sativa*, two in *Populus trichocarpa*, and two in *Vitis vinifera*; see Supplemental Figure 8 and Supplemental Data Set 1 online for alignments and a phylogenetic tree). This suggests that maintaining multiple copies of NGA genes could be beneficial for reproductive success, although deeper phylogenetic and functional analyses are required to support this hypothesis.

NGA Proteins Are Involved in Auxin Signaling Pathways

Both gain- and loss-of-function mutations in NGA genes cause phenotypes related to altered auxin homeostasis or signaling pathways. For example, several classic auxin responses, such as apical dominance or gravitropism, are moderately altered in the multiple combinations of nga mutants, like in plants with reduced auxin levels or impaired auxin sensing (Timpte et al., 1995; Hobbie et al., 2000; Cheng et al., 2007). Likewise, vascular development in the gynoecia of nga mutants is reduced (Cheng et al., 2006). In addition, the severe epinasty of rosette leaves in 35S_{PRO}:NGA3 lines is similar to that caused by increased auxin production, as in lines overexpressing *YUC* or the bacterial *IaaM* gene (Romano et al., 1995; Zhao et al., 2001; Marsch-Martinez et al., 2002). These phenotypes suggest that nga mutants could have reduced levels of auxin. Consistent with this idea, we have shown that a reduction of auxin levels in the NGA3/*TOP1* expression domain (as in NGA3_{PRO}:*IaaL* lines) mimics some of the nga loss-of-function phenotypes.

Auxin accumulation in the apical gynoecium is likely a consequence of direct auxin synthesis in this domain (Aloni et al., 2006), and here we show that lack of NGA activity leads to a failure to activate *YUC2* and *YUC4* in these positions. Our data are thus consistent with a role of NGA genes in driving auxin synthesis in the apical gynoecium through the upregulation of *YUC* gene expression. However, outside of the apical gynoecium, NGA proteins appear not to be required to activate *YUC2* and *YUC4* transcription. While absent in the style of amiR-NGA lines, *YUC2* and *YUC4* expression is normal in the rest of the flower, suggesting that independent activation of *YUC* genes by other factors takes place in these other domains. Alternatively, the residual NGA activity in the amiR-NGA lines may still activate *YUC* expression in these nonapical gynoecium positions. *YUC4* is not constitutively expressed in the 35S_{PRO}:NGA3 line (see Supplemental Figure 9 online), so it is likely that additional gene functions are required along with NGA activity for *YUC2* and *YUC4* upregulation, suggesting a complex scenario for spatial and temporal regulation of the *YUC* genes.

Many different studies support the auxin gradient hypothesis for gynoecium patterning at the apical-basal axis (reviewed in Balanza et al., 2006). The requirement for locally high auxin levels at distal positions of the gynoecial tube has been suggested by experiments showing that localized application of exogenous auxin at the apical end of developing gynoecia is able to restore carpel closure and style and stigma development in *sty1 sty2* mutants (Staldal et al., 2008). Likewise, treatment with NPA, an inhibitor of polar auxin transport that would cause pooling of auxin in the apical domain, restores style development in several

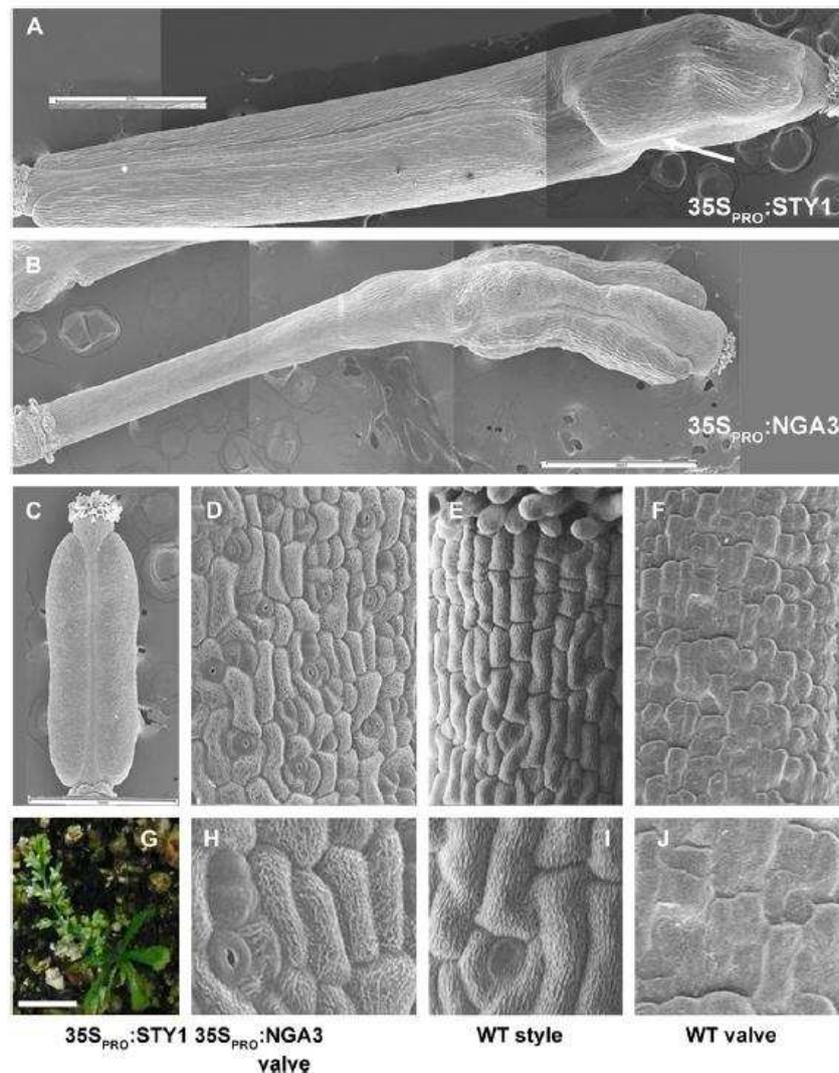


Figure 8. Phenotypic Effects of the Ectopic Expression of *NGA3/TOP1*, *STY1*, or Both in Fruit Morphology.

(A) to (F) and (H) to (J) Scanning electron micrographs. Bars = 50 μ m in (D) to (F) and 10 μ m in (H) to (J).

(A) Mature $35S_{PRO}:STY1$ silique. Stripes of ectopic style tissue in the center of the apical half of the valves cause the fruits to wrinkle (arrow).

(B) Mature $35S_{PRO}:NGA3$ silique. The gynophore is elongated, the valves are dramatically reduced, and the replum appears wide and with an abnormal cell orientation.

(C) Mature $35S_{PRO}:NGA3\ 35S_{PRO}:STY1$ silique. Fruit morphology is restored to wild-type-like appearance, with normal relative proportions of gynophore, valve, replum, and style. However, overall fruit size is dramatically decreased. Note that the same magnification applies for (A) to (C) (bars = 1 mm). Valves are covered by cells with typical style morphology.

(D) and (H) Close-up view of epidermal cells in the central region of the valves of $35S_{PRO}:NGA3\ 35S_{PRO}:STY1$ gynoecium at anthesis. Cells show typical column-like morphology, and crenellations of style cells and early differentiating stomata are also visible.

(E) and (I) Close-up view of the style of a wild-type gynoecium.

(F) and (J) Close-up view of the epidermal cells of a wild-type valve.

(G) Dramatically reduced plant size and internode elongation of a $35S_{PRO}:NGA3\ 35S_{PRO}:STY1$ plant. Bar = 1 cm.

[See online article for color version of this figure.]

unrelated mutants with defects in apical gynoecium development (Nemhauser et al., 2000; Staldal et al., 2008). In this work, we show that reducing auxin levels in the *NGA3/TOP1* expression domain causes poor development of the style and the stigma, thus providing direct support for the requirement of auxin for correct specification of apical gynoecium development.

NGA, STY, and Style Specification

Striking similarities are found between the *NGA* and the *STY* gene families. While the corresponding gene products are unrelated, loss-of-function phenotypes for multiple mutants in *NGA* genes or in *STY* genes are very similar. Both families also share a high level of functional redundancy among their members and show dosage-dependent loss-of-function phenotypes. Moreover, expression patterns of *NGA* and *STY* genes are similar, and, in fact, *NGA3/TOP1* and *STY1* have almost identical patterns of expression. Our expression analyses indicate that *STY1* and *NGA3/TOP1* do not regulate each other at the transcriptional level. Moreover, significant homology is found among fragments of *NGA3/TOP1* and *STY1* upstream genomic regions, suggesting that they might be coregulated. Taken together, these data suggest that *NGA* and *STY* could act at the same level to regulate putative common targets. The strong phenotypes of *nga3 sty1* double mutants suggest that *NGA* and *STY* proteins could be required to cooperatively direct style formation. Additional support for this idea is provided by the striking phenotype of *35S_{PRO}:NGA3 35S_{PRO}:STY1* plants, where valve cells are replaced by style cells. While it is possible that the *NGA* and *STY* proteins physically interact, we have thus far not been able to detect such interaction. A possible scenario is that additional factors are required in this putative style-promoting complex. This hypothesis is in accordance with the phenotype of *35S_{PRO}:NGA3 35S_{PRO}:STY1*, which promotes ectopic style development only in the valves, suggesting that factors specifically present in this domain could contribute to *NGA*-*STY* activity. Different pieces of evidence suggest *CRC*, a member of the *YABBY* family expressed in valve tissues, as a candidate factor for this predicted interaction (Bowman and Smyth, 1999). Thus, *crc* mutants show defects in gynoecium closure and a reduction of style and stigma (Alvarez and Smyth, 1999).

The Distribution of Tissues in the Gynoecium

The phenotype of loss-of-function mutations in the *NGA* genes indicates a role for *NGA* factors in directing style and stigma development; in fact, the effect of overexpressing simultaneously *STY1* and *NGA3/TOP1* supports this idea. However, the phenotypes of *NGA* gain-of-function lines are also compatible with a possible role of *NGA* factors regulating the distribution of tissues within the gynoecium. In general, *35S_{PRO}:NGA3* lines show an altered patterning of the different regions of the carpel, most frequently a reduction of the ovary at the expense of an enlarged gynophore and style, but also an expansion of the replum and the valve margin region into the reduced valves. Thus, patterning along both apical-basal and medial-lateral axes is compromised. The apical-basal defects in *35S_{PRO}:NGA3* lines are reminiscent of the phenotype of the *35S_{PRO}:HEC1* or *35S_{PRO}:HEC3* lines (Gremski et al., 2007), while the medial-lateral phe-

notypes resemble that caused by overexpression of *INDEHISCENT (IND)*, a key factor for the development of the dehiscence zone in the valve margins and the closest homolog to the *HEC* genes (Liljegren et al., 2004). While the molecular bases for the parallelisms of the observed phenotypes are still unclear, it would be interesting to test if they depend on genetic or physical interactions between the *NGA* and the *HEC/IND* factors.

The striking effect of constitutive coexpression of *STY1* and *NGA3/TOP1* factors also awaits further studies. One possible explanation for the observed effects could be as follows: when high levels of *STY1* are available, as in the apical domain of the gynoecium or in the *35S_{PRO}:STY1* lines, *NGA3/TOP1* acts cooperatively with *STY1* to direct style formation; however, when *STY1* factors are not available, overexpression of *NGA3/TOP1*, through still unknown mechanisms, interferes with genetic pathways directing tissue distribution in the gynoecium.

In summary, we have characterized a small subfamily of highly redundant B3 transcription factors, the *NGA* family, with a key role in style specification. Together with previous work, our data point to a complex landscape of regulatory activities and hormonal pathways established in the developing gynoecium that will need to be addressed in the future.

METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana plants were grown in cabinets at 21°C under long-day (16 h light) conditions, illuminated by cool-white fluorescent lamps (150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), in a 1:1:1 mixture of sphagnum:perlite:vermiculite.

The *Arabidopsis* plants used in this work were from the Col ecotype. The *top1-1D* line was identified in an activation tagging mutagenized population (Weigel et al., 2000). *nga3-2*, *nga3-3*, *nga4-2*, and *nga4-3* were identified screening the AMAZE collection. *nga3-3* has a fragment of a *En-1* element inserted at position 404; *nga3-2*, *nga4-2*, and *nga4-3* carry *En-1* elements at positions 861, -25, and 125, respectively. *nga3-1*, *nga1-4*, and *nga2-2* mutants were obtained from the ABRC Stock Center. *nga3-1* has a T-DNA inserted at position 221 (line Sail_232_E10). *nga1-4* bears a T-DNA insertion 171 bp downstream the STOP codon (line WiscDsLox429G06), while *nga2-2* carries an *En-1* insertion at position 572 (line SM.20993). *sty1 sty2* mutant seeds and the *STY1_{PRO}:GUS* and *35S_{PRO}:STY1* lines were kindly donated by Eva Sundberg (Kuusk et al., 2002). *35S_{PRO}:YUC1*, *YUC2_{PRO}:GUS*, and *YUC4_{PRO}:GUS* were kindly provided by Yunde Zhao (Cheng et al., 2006).

The *35S_{2PRO}:NGA* constructs were generated by PCR amplification of the different *NGA* ORFs to introduce *SalI* and *BamHI* flanking restriction sites, except for *NGA4*, where the *XhoI* site was preferred to *SalI*, and subsequently cloned into *SalI*-*BamHI*-digested pBIN-JIT vector (Ferrández et al., 2000). The *35S_{PRO}:NGA3* (PMT17) construct was generated by cloning the *NGA3* ORF into *BamHI* and *EcoRI* site of the pGreenII0229-35S vector (www.pgreen.ac.uk). amiR-*NGA* lines were generated as previously described (Schwab et al., 2006). The sequence of the mature miRNA targeting all four *NGA* genes was 5'-UACUU-UGUCGAACAUGUGCCC-3'. The corresponding amiRNA was PCR amplified (see Supplemental Table 1 online for primer sequence) according to the protocol provided via WMD2 Web MicroRNA Designer (<http://wmd2.weigelworld.org>) with the greatly appreciated help of Rebecca Schwab and cloned into *SalI*-*BamHI* sites of the pBIN-JIT vector. Transgenic plants were selected based on the kanamycin resistance.

The *NGA3_{PRO}:laaL* construct was generated by replacing the *GUS* coding sequence with the coding sequence of the *laaL* gene from

Pseudomonas syringae into a BamHI-SacI-digested pMT5 plasmid (see below). Transgenic plants were selected based on kanamycin resistance.

Cloning of *top1-1D* and Isolation of Loss-of-Function Alleles

Plasmid rescue on the original *top1-1D* line was performed as described by Weigel et al. (2000).

To identify insertion alleles of *nga3/top1* and *nga4*, we screened a population of *Arabidopsis* Col plants that carries ~50,000 independent insertions of the autonomous maize transposable element *En-1* using previously established methods (Baumann et al., 1998). Primers used in PCR reactions were SS020 and SS023. Each oligo was used with both *En-1*-specific primers En205 and En8130. Genomic DNA from single plants was used to PCR amplify the region of *En-1* insertion, and subsequent sequence analyses identified the insertion site.

Homozygous plants with single Spm or T-DNA insertions were identified in the progeny of backcrosses of each mutant allele to wild-type Col by genomic DNA gel blot analyses probed with the full ORF of the corresponding NGA gene following standard procedures.

Phenotypic Characterization

For scanning electron microscopy, samples were vacuum infiltrated with 4% formaldehyde (w/v) in 1 × PBS for 10 min and fixed with fresh solution for 16 h at 4°C. Samples were dehydrated in an ethanol series and critical point dried in liquid CO₂ (Polaron E300 apparatus). Dried samples were mounted on stubs; when necessary, several outer whorl organs of individual flowers were removed manually. Then, samples were coated with gold palladium (4:1) in a Sputter Coater SCD005 (BALTEC). Scanning electron microscopy was performed with a JEOL JSM-5410 microscope (10 kV).

Vascular Clearing

Anthesis gynoecia from wild-type and mutant lines were fixed, cleared in chloralhydrate, and mounted according to Weigel and Glazebrook (2002) to be viewed under dark-field microscopy.

Auxin Responses

Seeds were grown on vertical plates. For lateral root counts, roots were counted at 10 d after planting. For root reorientation assays, plates were rotated 90° with respect to gravity and photos were taken 24 h later. Root angles were calculated in Adobe Photoshop using the measure tool.

Apical dominance was measured by quantifying the number of lateral inflorescences longer than 1 cm from the rosette from 15 plants per genotype when the main inflorescence reached 10 cm.

Expression Analyses

For quantitative PCR, 100 ng of total RNA was used for cDNA synthesis performed with the iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad), and the qPCR master mix was prepared using the iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primers used to amplify the NGA genes were as follows: OMNG48 and OMNG49 for *NGA1*, OMNG46 and OMNG47 for *NGA2*, OMNG42 and OMNG43 for *NGA3*, and OMNG44 and OMNG45 for *NGA4*. Results were normalized to the expression of the *UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME21 (UBC21)* mRNA, amplified with UBC21F and UBC21R primers. PCR reactions were run and analyzed using the ABI PRISM 7700 sequence detection system.

RNA in situ hybridization with digoxigenin-labeled probes was performed on 8-μm longitudinal paraffin sections of Col inflorescences as described by Ferrándiz et al. (2000). *NGA3/TOP1* RNA antisense and

sense probes were generated from a 423-bp fragment of the *NGA3/TOP1* cDNA (positions 655 to 1077), *NGA4* from a 320-bp fragment (positions 655 to 987), *NGA2* from a 388-bp fragment (positions 513 to 900), and *NGA1* from a 372-bp fragment (positions 505 to 877). All fragments were cloned into the PCRII vector (Invitrogen), and sense and antisense probes were synthesized using the corresponding SP6 or T7 polymerases.

The pMT5 construct (*NGA3_{PRC}:GUS*) was generated by cloning a fragment of *NGA3/TOP1* upstream genomic sequence (−2728 to +12) PCR amplified from Col genomic DNA into *HindIII-BamHI* sites of a pGREENII0029 vector (<http://www.pgreen.ac.uk>) previously modified by introducing the GUS coding sequence from pBI101.2.

For GUS histochemical detection, samples were treated for 15 min in 90% ice-cold acetone and then washed for 5 min with washing buffer (25 mM sodium phosphate, 5 mM ferrocyanide, 5 mM ferricyanide, and 1% Triton X-100) and incubated from 4 to 16 h at 37°C with staining buffer (washing buffer + 1 mM X-Gluc). Following staining, plant material was fixed, cleared in chloralhydrate, and mounted according to Weigel and Glazebrook (2002) to be viewed under bright-field microscopy. All detections were made in heterozygous lines for the reporter transgene.

Genetic Combinations

Homozygous single mutants were cross-fertilized, and double mutants were identified among the F2 segregants by novel phenotypes and confirmed by genotyping or by segregation of F3 progenies.

For genotyping *nga1-4*, PCR with primers OTL2RWT and p745 gave a 0.6-kb product for the mutant allele and PCR with primers OTL2RWT and SS071 produced a 1-kb fragment for the wild-type allele. For genotyping *nga2-2*, PCR with primers OMNG14 and En8130 gave a 0.6-kb product for the mutant allele and PCR with primers OMNG14 and OMNG15 produced a 0.7-kb fragment for the wild-type allele. For genotyping *nga3-3*, PCR with primers SS044 and SS043 produced a 1.5-kb fragment for the wild-type allele and 2.1 kb for the *nga3-3* allele. For genotyping *nga4-3*, PCR with primers SS065 and SS066 gave a 1-kb product for the wild-type allele, and PCR with primers SS065 and En8130 produced a 0.4-kb fragment for the mutant allele.

sty1-1 and *sty2-1* genotyping was performed as previously described (Kuusk et al., 2002).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative (AGI) or GenBank/EMBL data libraries under the following accession numbers: for *NGA1* to *NGA4*, the AGI numbers are At2g46870, At3g61970, At1g01030, and At4g01500, respectively. STY1, STY2, YUC1, YUC2, YUC4, and UBC21 correspond to At3g51060, At4g36260, At4g32540, At4g13260, At5g11320, and At5g25760, respectively. The GenBank number for the *laaL* sequence is M35373.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Description of the Alleles Used in This Study.

Supplemental Figure 2. Preanthesis Gynoecium Phenotypes of *nga3-3* Single Mutants.

Supplemental Figure 3. Fruit Phenotypes Caused by Overexpression of the NGA Genes and Leaf Phenotypes Caused by NGA Loss of Function.

Supplemental Figure 4. Design of the amiR-NGA Transgene and Effect in NGA Expression.

Supplemental Figure 5. Expression of NGA Genes in Different Tissues.

Supplemental Figure 6. Auxin-Related Phenotypes in *nga* Mutants.

Supplemental Figure 7. Phenotype of *nga3 nga4 sty1* Fruits.

Supplemental Figure 8. Multiple Alignment of C-t Domains of NGA Homologs and Phylogenetic Relationships of These Factors.

Supplemental Figure 9. Expression of YUC4_{PRO}:GUS in 35S_{PRO}:NGA3 Flowers.

Supplemental Table 1. Primers Used in This Work.

Supplemental Data Set 1. Text File of the Alignment Used to Generate the Phylogenetic Tree Shown in Supplemental Figure 7.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Desmond Bradley, Francisco Madueño, and members of the Ferrándiz lab for critical reading of the manuscript and helpful comments and suggestions; Eva Sundberg and Yunde Zhao for providing seeds; and Rebecca Schwab for help in amiRNA design. Our work is supported by Research Grants BIO2002-01301 and BIO2005-01541 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain to C.F. and BFU2006-00771 to S.P. and by grants from the National Science Foundation to M.Y. and D.W., and from the Max Planck Society to D.W. M.N.-G. and M.T. are supported by doctoral fellowships of the Generalitat Valenciana.

Received January 8, 2009; revised March 31, 2009; accepted April 23, 2009; published May 12, 2009.

REFERENCES

- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., and Ullrich, C.I. (2006). Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**: 315–328.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., and Ullrich, C.I. (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Planta* **216**: 841–853.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J.J., Ochando, I., Vera, A., Ferrandiz, C., and Martinez-Laborda, A. (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Development* **134**: 2663–2671.
- Alvarez, J., and Smyth, D. (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* **126**: 2377–2386.
- Alvarez, J.P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z., and Eshed, Y. (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**: 1134–1151.
- Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M., and Ferrandiz, C. (2006). Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* **57**: 3457–3469.
- Baumann, E., Lewald, J., Saedler, H., Schulz, B., and Wisman, E. (1998). Successful PCR-based reverse genetic screens using an En-1-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 729–734.
- Bennett, S.R.M., Alvarez, J., Bossinger, G., and Smyth, D.R. (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **8**: 505–520.
- Blanc, G., and Wolfe, K.H. (2004). Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during Arabidopsis evolution. *Plant Cell* **16**: 1679–1691.
- Blanc, G., Hokamp, K., and Wolfe, K.H. (2003). A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome Res.* **13**: 137–144.
- Bowman, J., and Smyth, D. (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* **126**: 2387–2396.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev.* **20**: 1790–1799.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2430–2439.
- Dinneny, J.R., and Yanofsky, M.F. (2005). Drawing lines and borders: How the dehiscent fruit of Arabidopsis is patterned. *Bioessays* **27**: 42–49.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., and Yanofsky, M. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**: 725–734.
- Ferrándiz, C., Pelaz, S., and Yanofsky, M.F. (1999). Control of carpel and fruit development in Arabidopsis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 321–354.
- Gremski, K., Ditta, G., and Yanofsky, M.F. (2007). The HECATE genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **134**: 3593–3601.
- Groszmann, M., Paicu, T., and 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.
- Heisler, M., Atkinson, A., Bystira, Y., Walsh, R., and Smyth, D. (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development* **128**: 1089–1098.
- Hobbie, L., McGovern, M., Hurwitz, L., Pierro, A., Liu, N., Bandyopadhyay, A., and Estelle, M. (2000). The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development. *Development* **127**: 23–32.
- Jensen, P.J., Hangarter, R.P., and Estelle, M. (1998). Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown Arabidopsis. *Plant Physiol.* **116**: 455–462.
- Kim, J.I., et al. (2007). *yucca6*, a dominant mutation in Arabidopsis, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiol.* **145**: 722–735.
- Kuusk, S., Sohlberg, J.J., Long, J.A., Fridborg, I., and 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., and Sundberg, E. (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J.* **47**: 99–111.
- Liljgren, S.J., Roeder, A.H., Kempin, S.A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K., and Yanofsky, M.F. (2004). Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* **116**: 843–853.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Van Arkel, G., Herrera-Estrella, L., and Pereira, A. (2002). Activation tagging using the En-I maize transposon system in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**: 1544–1556.
- Nemhauser, J., Feldman, L., and Zambryski, P. (2000). Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development* **127**: 3877–3888.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y. (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**: 677–684.
- Pekker, I., Alvarez, J.P., and Eshed, Y. (2005). Auxin response factors

- mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**: 2899–2910.
- Reinhardt, D.** (2003). Vascular patterning: More than just auxin? *Curr. Biol.* **13**: R485–R487.
- Robles, P., and Pelaz, S.** (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 633–643.
- Romano, C.P., Robson, P.R., Smith, H., Estelle, M., and Klee, H.** (1995). Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: Hypocotyl elongation phenotype and interactions with the hy6-1 hypocotyl elongation and axr1 auxin-resistant mutants. *Plant Mol. Biol.* **27**: 1071–1083.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* **37**: 501–506.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D.** (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1121–1133.
- Sessions, A., et al.** (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985–2994.
- Sessions, A., Nemhauser, J., McColl, A., Roe, J., Feldmann, K., and Zambryski, P.** (1997). *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**: 4481–4491.
- Sessions, R.A., and Zambryski, P.C.** (1995). *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild type and in *ettin* mutants. *Development* **121**: 1519–1532.
- Sohlberg, J.J., Myrenas, M., Kuusk, S., Lagercrantz, U., Kowalczyk, M., Sandberg, G., and Sundberg, E.** (2006). STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant J.* **47**: 112–123.
- Staldal, V., Sohlberg, J.J., Eklund, D.M., Ljung, K., and 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.
- Swaminathan, K., Peterson, K., and Jack, T.** (2008). The plant B3 superfamily. *Trends Plant Sci.* **13**: 647–655.
- Timppe, C., Lincoln, C., Pickett, F.B., Tumer, J., and Estelle, M.** (1995). The AXR1 and AUX1 genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *Plant J.* **8**: 561–569.
- Weigel, D., et al.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**: 1003–1013.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Wisman, E., Cardon, G.H., Fransz, P., and Saedler, H.** (1998). The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* **37**: 989–999.
- Woodward, C., Bemis, S.M., Hill, E.J., Sawa, S., Koshida, T., and Torii, K.U.** (2005). Interaction of auxin and ERECTA in elaborating *Arabidopsis* inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol.* **139**: 192–203.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., and Chory, J.** (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**: 306–309.

Development 136, 2059-2067 (2009) doi:10.1242/dev.035444

Dynamic, auxin-responsive plasma membrane-to-nucleus movement of *Arabidopsis* BRX

Emanuele Scacchi^{1,*}, Karen S. Osmont^{1,*}, Julien Beuchat¹, Paula Salinas¹, Marisa Navarrete-Gómez², Marina Trigueros², Cristina Ferrándiz² and Christian S. Hardtke^{1,†}

In *Arabidopsis*, interplay between nuclear auxin perception and trans-cellular polar auxin transport determines the transcriptional auxin response. In *brevis radix* (*brx*) mutants, this response is impaired, probably indirectly because of disturbed crosstalk between the auxin and brassinosteroid pathways. Here we provide evidence that BRX protein is plasma membrane-associated, but translocates to the nucleus upon auxin treatment to modulate cellular growth, possibly in conjunction with NGATHA class B3 domain-type transcription factors. Application of the polar auxin transport inhibitor naphthalene phthalamic acid (NPA) resulted in increased BRX abundance at the plasma membrane. Thus, nuclear translocation of BRX could depend on cellular auxin concentration or on auxin flux. Supporting this idea, NPA treatment of wild-type roots phenocopied the *brx* root meristem phenotype. Moreover, BRX is constitutively turned over by the proteasome pathway in the nucleus. However, a stabilized C-terminal BRX fragment significantly rescued the *brx* root growth phenotype and triggered a hypocotyl gain-of-function phenotype, similar to strong overexpressors of full length BRX. Therefore, although BRX activity is required in the nucleus, excess activity interferes with normal development. Finally, similar to the PIN-FORMED 1 (PIN1) auxin efflux carrier, BRX is polarly localized in vascular cells and subject to endocytic recycling. Expression of *BRX* under control of the *PIN1* promoter fully rescued the *brx* short root phenotype, suggesting that the two genes act in the same tissues. Collectively, our results suggest that BRX might provide a contextual readout to synchronize cellular growth with the auxin concentration gradient across the root tip.

KEY WORDS: Plants, Hormones, Auxin, *Arabidopsis*, BRX, PIN1, Root meristem, Endocytosis

INTRODUCTION

The establishment of cell polarity in a coordinated tissue context is a common phenomenon in multicellular eukaryotes. In plants, such polarity often requires directional transport of the phytohormone auxin, known as polar auxin transport (PAT) (Men et al., 2008; Reinhardt et al., 2000; Sauer et al., 2006). PAT is important throughout plant development, for instance in the formation and placement of lateral organs. Proper local auxin activity is conveyed by the interplay between nuclear auxin signaling and trans-cellular PAT, and molecular mechanisms for both processes have recently been well defined (Benjamins and Scheres, 2008; Leyser, 2005). PAT requires the activity of integral plasma membrane auxin efflux carriers, the PIN-FORMED (PIN) proteins (Wisniewska et al., 2006), whose polar cellular localization is crucial for the establishment of complex auxin flux patterns, needed for embryo axis formation and root growth, for example (Blilou et al., 2005; Friml et al., 2003; Grieneisen et al., 2007; Sabatini et al., 1999). Several PIN family genes are feedback-controlled by transcriptional regulators that convey cellular auxin concentration into gene expression responses (Sauer et al., 2006; Vieten et al., 2005). This is mediated by auxin receptors such as TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1), the F-box component of the E3 ubiquitin ligase complex that targets transcriptional corepressors of the auxin/indole-3-acetic acid (AUX/IAA) family for proteasome-mediated degradation (Dharmasiri et al., 2005a; Dharmasiri et al.,

2005b; Kepinski and Leyser, 2005). Affinity of AUX/IAA proteins for TIR1-type auxin receptors is enhanced by the latter binding to auxin. Thus, auxin promotes AUX/IAA degradation. Since AUX/IAA inhibits the activation potential of auxin response factors (ARFs), this releases ARFs to activate transcriptional targets of auxin signaling (Benjamins and Scheres, 2008; Tiwari et al., 2004).

Despite this impressive progress, it appears that auxin signaling may be even more complex and may involve unidentified components (Badescu and Napier, 2006; Benjamins and Scheres, 2008; Strader et al., 2008). For instance, rapid effects of auxin on cellular growth are difficult to account for with the canonical auxin signaling pathway described above (Badescu and Napier, 2006), and indeed auxin-responsive pathways that do not involve the TIR1-type auxin receptors appear to exist (Strader et al., 2008).

The *Arabidopsis* gene *BREVIS RADIX* (*BRX*) is a more recently identified rate-limiting component for auxin-responsive gene expression. *brx* mutants display impaired root growth due to decreased cell proliferation in the root meristem and vasculature and generally reduced cell elongation (Mouchel et al., 2004; Sibout et al., 2008). Global gene expression analyses have indicated that auxin-responsive gene expression is impaired in *brx* mutants, affecting expression of the synthetic auxin response reporter gene, *DR5::GUS* (Mouchel et al., 2006). This is likely to be the result of effects on brassinosteroid biosynthesis, as the *brx* phenotype and impaired *DR5::GUS* expression can be significantly rescued by exogenous application of this class of phytohormones (Mouchel et al., 2006). These findings are part of accumulating evidence for a rate-limiting role of the brassinosteroid pathway in the auxin response (Hardtke, 2007; Kuppasamy et al., 2008; Nemhauser et al., 2004; Vert et al., 2008). Interestingly, expression of *BRX* is itself strongly induced by auxin (Mouchel et al., 2006). Consistently, *BRX* expression is no longer auxin-responsive in *brx* mutants, suggesting that auto-regulatory feedback exists. In this study, we investigated

¹Department of Plant Molecular Biology, University of Lausanne, Biophore Building, CH-1015 Lausanne, Switzerland. ²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, 46022 Valencia, Spain.

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (e-mail: christian.hardtke@unil.ch)

Accepted 10 April 2009

auxin control of *BRX* in more detail, revealing that *BRX* might be part of a novel, context-specific auxin signaling pathway that could serve to modulate cellular growth along the auxin concentration gradient of the root tip.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Seeds were stratified 2–4 days at 4°C before transfer into constant light of 120 μ E intensity on 0.5 \times Murashige and Skoog (MS) media. Transgenic plants were generated according to standard procedures as previously described (Mouchel et al., 2004). The *brx^S*, *brx^C*, *brx^C brxl1*, *pBRX::BRX::GFP*, *p35S::BRX::GFP* and *pRCP1::BRX::GFP* lines have been described (Mouchel et al., 2004; Mouchel et al., 2006). *brx^S*: introgression of the natural Uk-1 *brx* loss-of-function allele into the Sav-0 background; *brx^C*: introgression of the natural Uk-1 *brx* loss-of-function allele into the Col-0 background; the *p35S::BRX::GFP* (with the N- and C-terminal fragment fusions with GFP) were created in the pMDC83 vector (Curtis and Grossniklaus, 2003). Hormone and inhibitor treatments were carried out in liquid media or on plates. All reagents were stored as frozen, small aliquots of stock solution and not reused after thawing.

Molecular biology and biochemistry

Molecular biology and biochemistry procedures were carried out according to standard protocols. *BRX*-GFP and GFP were detected using a monoclonal anti-GFP antibody (JL-8; Clontech, USA), whereas RNA polymerase I subunit TFIIS and H⁺-ATPase were detected using antibodies against the endogenous protein (Agrisera, Sweden). GUS stainings of *pBRX::GUS* and *pBRXL1::GUS* plants were performed as described (Mouchel et al., 2006).

Root gravitropism assays

Seeds were stratified and then transferred into constant light for 24 hours to promote germination before being grown vertically in the dark for 2 days. To provoke gravitropic response, plates were then rotated 90° and grown for another 24 hours. Plates were scanned on a flat bed scanner immediately before and after, and reorientation of root growth was scored with ImageJ software (version 1.36b).

Microscopy

For confocal microscopy, roots of 3- to 4-day-old seedlings grown on solid media were placed in liquid media including any treatments before analysis using a Leica SP2 AOBs confocal laser scanning microscope (CLSM). All images were taken with an offset of less than 5%. Intensity correlation analysis and Manders' overlap coefficient calculation were performed as described (Li et al., 2004; Manders et al., 1993) using an ImageJ plugin (http://www.macbiophotonics.ca/imagej/colour_analysis.htm). For analysis of embryo phenotypes, ovules were collected and fixed in chloral hydrate:glycerol:H₂O (8:3:1) solution. Microscopy was then performed using a Leica DM5000B compound microscope.

Microsomal fractionation

To isolate membranes, 6-day-old seedlings were ground in extraction buffer (400 mM glucose, 100 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) and centrifuged at 1000 *g* for 10 minutes to eliminate debris. The supernatant was filtered through two layers of Miracloth and again centrifuged, at 8000 *g* for 15 minutes. The supernatant was then centrifuged at 150,000 *g* for 1 hour to yield a pellet containing membrane fractions and supernatant containing soluble protein (Bassham and Raikhel, 1998).

In planta bimolecular fluorescence complementation

Open reading frames of full length NGA1 and *BRX*, as well as *BRX* C- and N-terminal fragments, were cloned into vectors pYFP^N43 and pYFP^C43 (kindly provided by A. Ferrando, University of Valencia, Burjassot, Valencia, Spain). These different binary vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 (pGV2260) and grown in Luria-Bertani medium to late exponential phase. Cells were harvested by centrifugation and resuspended (10 mM MES-KOH, pH 5.6, 10 mM MgCl₂, 150 μ M acetosyringone) to an OD₆₀₀ of 1. The cells were mixed with an equal volume of strain C58C1 (pCH32 35S:p19), which expresses the

silencing suppressor p19 of tomato bushy stunt virus (Voinnet et al., 2003), so that the final density of *Agrobacterium* solution was 1. Bacteria were then incubated for 3 hours at room temperature before being injected into young, fully expanded leaves of 4-week-old tobacco plants. Leaves were examined after 3 to 4 days by confocal microscopy.

RESULTS

BRX is required for correct transcriptional auxin response

Previous physiological and gene expression analyses have suggested that auxin-responsive gene expression is impaired in *brx* null mutants (Mouchel et al., 2006). However, *brx* root growth was still responsive to exogenous application of the prototypical natural auxin, indole-3-acetic acid (IAA; Fig. 1A), suggesting that auxin perception by the canonical auxin signaling pathway is principally intact in the mutant. To better understand the manner in which loss of *BRX* function affects auxin-responsive gene expression, we took advantage of another *Arabidopsis* mutant, *elongated hypocotyl 5 (hy5)*, which has been shown to display constitutively elevated expression of auxin-responsive genes

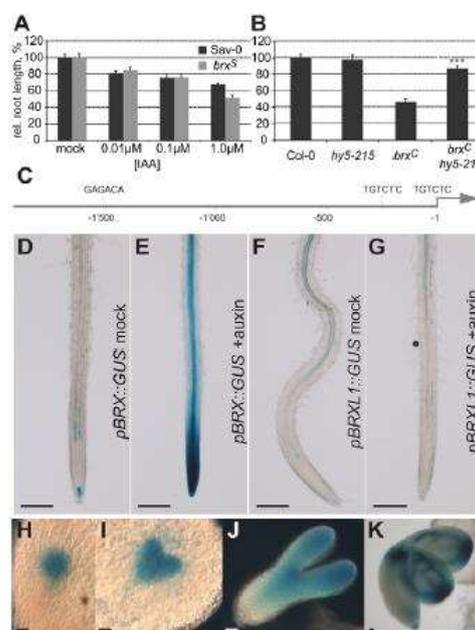


Fig. 1. Auxin-induced and embryonic expression of *BRX*. (A) Auxin [indole-3-acetic acid (IAA), the major natural auxin] inhibition of primary root growth of wild-type versus *brx* mutant seedlings measured at 7 days after germination (dag). (B) Primary root growth in *hy5* (*hy5-215* null allele), *brxC* and the *hy5-215 brxC* double mutant measured at 9 dag. (C) Schematic overview of the *BRX* promoter region and the localization of ARF binding sites. (D,E) Transgenic plants expressing the *GUS* reporter gene under control of the *BRX* promoter (*pBRX::GUS*) stained for *GUS* activity after mock (D) or auxin (10 μ M IAA for 1 hour, E) treatment. (F,G) Similar to D,E for the *BRXL1* promoter. (H-K) Expression of *pBRX::GUS* during embryogenesis, from globular (H) via early heart (I) and torpedo stage (J), up to mature embryos (K). Scale bars: 0.5 mm in D-G; 50 μ m in H-K. Error bars represent standard error of the mean, ****P*<0.001.

(Sibout et al., 2006). Strikingly, introduction of the *hy5* mutation into the *brx* background resulted in significant rescue of the *brx* root growth phenotype (Fig. 1B), suggesting that basic auxin-responsiveness of the transcriptional machinery is diminished in *brx* mutants.

Auxin-responsive and embryonic expression of BRX

In line with the auxin-responsiveness of *BRX* transcription, the *BRX* promoter contains several auxin-responsive elements, among them two prototypical ARF binding sites (Ulmasov et al., 1997) close to the transcription initiation site (Fig. 1C). Consistently, expression of the β -glucuronidase reporter gene (*GUS*) under control of the *BRX* promoter (*pBRX::GUS*) was auxin-inducible (Fig. 1D-E), whereas expression under the control of the promoter of the homologous gene *BRXL1*, which does not contain ARF binding sites, was not (Fig. 1F-G). This difference possibly contributes to the expression level difference and thus the lack of functional redundancy between the two genes, as *BRXL1* can replace *BRX* if expressed constitutively under control of the *35S* promoter (Briggs et al., 2006). Redundancy also appears limited because of overlapping but not identical expression patterns (Fig. 1D,F). For instance, whereas *BRXL1* expression was observed in the root vasculature, similar to *BRX*, this was largely restricted to mature tissue. By contrast, *BRX* was expressed throughout all root phloem vasculature as well as in the root tip, in a pattern that was remarkably similar to the expression pattern of *DR5::GUS* (Mouchel et al., 2006). Notably, auxin response is of pivotal importance during embryogenesis and it has been previously suggested that *BRX* activity might be required at this stage (Mouchel et al., 2006). Indeed, analysis of *pBRX::GUS* expression in embryos revealed that *BRX* is ubiquitously expressed at early stages and becomes restricted to the (incipient) vasculature in the mature embryo and at later stages of (adult) development (Fig. 1H-K) (Bauby et al., 2007).

brx mutants display embryo phenotypes reminiscent of auxin pathway mutants

In *Arabidopsis*, embryogenesis progresses through a series of stereotypical cell divisions that eventually lead to the formation of an apical-basal embryo axis. Several key players in auxin signaling and PAT, including PINs, are required for this process and respective mutants show embryonic phenotypes of variable penetrance and severity, depending on allele strengths and genetic redundancies (Blilou et al., 2005; Hamann et al., 2002; Hardtke and Berleth, 1998; Hardtke et al., 2004). Similarly, we found that a significant portion of *brx* embryos displayed defects in the stereotypical arrangement of cells in the basal layers that strongly resembled those of auxin signaling or transport mutants from as early as the dermatogen stage (Fig. 2A-H). Moreover, this portion significantly increased in *brx brxl1* double mutants (Fig. 2I), suggesting redundancy of the two homologs during embryogenesis. Therefore, our data suggest that *BRX* expression during embryogenesis is physiologically relevant and more important than previously recognized.

Auxin negatively regulates BRX protein abundance

A salient feature of AUX/IAA corepressors is that while their abundance is negatively regulated by auxin, their respective genes are themselves primary auxin-induced genes, establishing a negative-feedback loop (Benjamins and Scheres, 2008; Dharmasiri et al., 2005a; Gray et al., 2001; Kepinski and Leyser, 2005). To

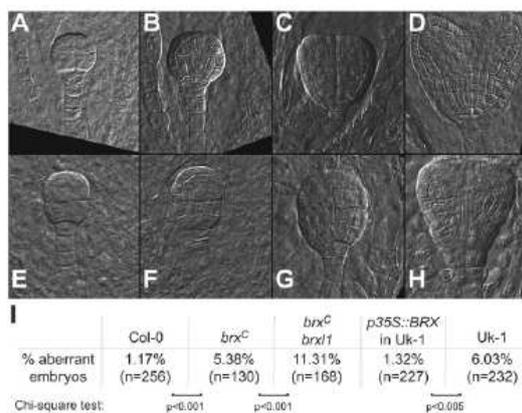


Fig. 2. Embryo phenotypes in *brx* loss-of-function mutants.

(A-D) Microscopic images (Nomarski optics) of stereotypical wild-type embryos from the early dermatogen up to the heart stage. (E-H) *brx* embryos with basal patterning defects at various stages (corresponding to A-D). (I) Penetrance of *brx* embryo phenotypes, scored from early dermatogen to heart stage. Uk-1, natural accession from which the *brx* loss-of-function allele was isolated; *brxC*, introgression of the Uk-1 *brx* loss-of-function allele into the Col-0 background.

determine whether *BRX* is also controlled at multiple levels, we investigated the behavior of the BRX protein. This was primarily done by monitoring the functional BRX-GFP (green fluorescent protein) fusion protein expressed under control of the constitutive *35S* promoter (*p35S::BRX::GFP*), as BRX-GFP expressed from its endogenous promoter (*pBRX::BRX::GFP*) was not detectable in western blots. Investigation of BRX-GFP fusion protein behavior in response to auxin treatment revealed that, strikingly, auxin negatively regulated BRX-GFP abundance. The degree of this response was variable in replicate experiments, but occasionally led to nearly total disappearance of the protein (Fig. 3A). Moreover, treatment with the proteasome inhibitor MG132 could interfere with this degradation and led to accumulation of BRX-GFP (Fig. 3B). Since neither control protein nor GFP alone displayed these characteristics, we concluded that BRX must be a target for auxin-induced, proteasome-mediated degradation.

BRX is primarily a plasma membrane-associated protein

To corroborate our results in planta, we took advantage of transgenic *p35S::BRX::GFP* lines in which the BRX-GFP fusion protein could be observed by confocal microscopy in root tissue. Notably, BRX is a putative transcriptional regulator, which could localize to the nucleus in transiently transformed epidermal onion cells (Mouchel et al., 2004). Thus, we were surprised to observe BRX-GFP fluorescence localized nearly exclusively to the outline of cells in *Arabidopsis*, coinciding with the plasma membrane (Fig. 3C). Slight, patchy BRX-GFP in the cytosol was observed occasionally in less vacuolated, meristematic cells (Fig. 3D). Western blot analysis of cell fractionations (Bassham and Raikhel, 1998) detected BRX-GFP nearly exclusively in the microsomal fraction, similar to the integral membrane protein H⁺-ATPase, but unlike an RNA polymerase subunit or GFP alone (Fig. 3F), thus biochemically verifying BRX membrane association. Finally, further verifying plasma membrane localization, BRX-GFP also

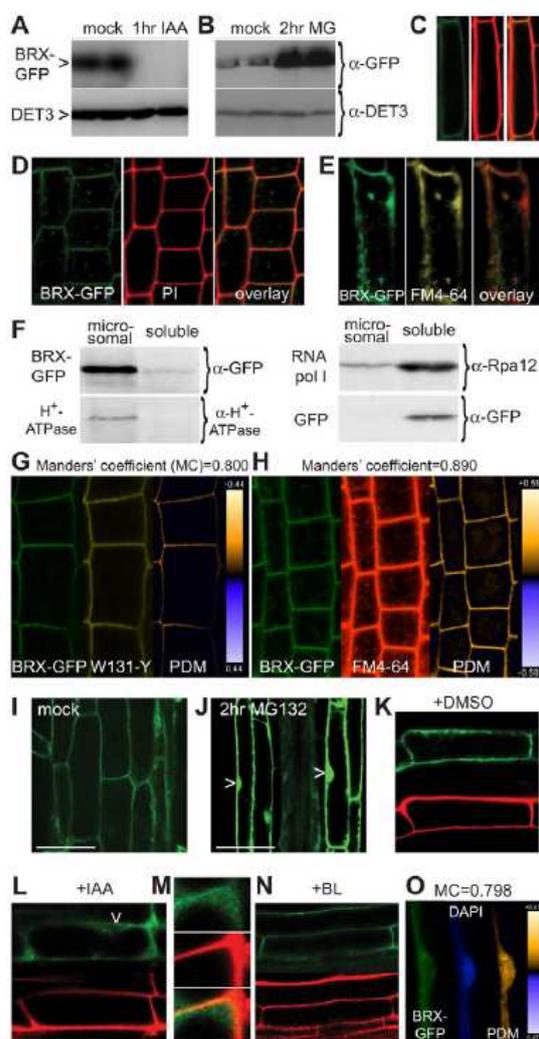


Fig. 3. Auxin-induced degradation and subcellular trafficking of BRX-GFP fusion protein. (A) Western blot analysis of transgenic *brx* seedlings complemented by expression of BRX-GFP fusion protein under control of the ubiquitous *35S* promoter (*p35S::BRX::GFP*). Seedlings were treated with solvent (mock) or 10 μ M IAA for 1 hour. Endogenous DE-ETIOLATED 3 (DET3) protein served as a control. (B) Stabilization of BRX-GFP fusion protein in seedlings treated with 50 μ M of the proteasome inhibitor MG132 (MG) for 2 hours. (C) Plasma membrane localization of BRX-GFP in *p35S::BRX::GFP* plants revealed by confocal microscopy (showing a cortex cell); left, BRX-GFP fluorescence; middle, propidium iodide (PI) cell wall staining; right, overlay. (D) As in C, showing multiple cortex cells in the root meristem. (E) BRX-GFP localization after 3 hours of 50 μ M brefeldin A (BFA) treatment: left, BRX-GFP fluorescence; middle, staining of endosomal compartments by FM4-64 tracer dye; right, overlay. (F) Western blot analysis of microsomal and soluble protein fractions isolated from *p35S::BRX::GFP* (left and upper right) or *p35S::GFP* (lower right) seedlings, probed with antibodies against GFP, H⁺-ATPase or the RNA polymerase I subunit RPA12. (G) Intensity correlation analysis (ICA) of BRX-GFP (left) and the citrine-based plasma membrane marker W131-Y (middle), and product of the differences from the mean (PDM) image (right, for the images to the left). Manders' coefficient: 0.0, no colocalization; 1.0, perfect colocalization. (H) ICA of BRX-GFP and FM4-64 dye in meristematic cells. (I) BRX-GFP fluorescence in root cells of *p35S::BRX::GFP* seedlings after 2 hours of mock treatment. (J) Stabilization of BRX-GFP and appearance in the nucleus (arrowheads) after 4 hours of 50 μ M MG132 treatment. (K-N) *p35S::BRX::GFP* plants pretreated with 50 μ M MG132 for 5 hours, then transferred into 30 μ M cycloheximide and DMSO (mock, K), 10 μ M IAA (L), or 10 pM brassinolide (BL, N) for 2 hours (BRX-GFP fluorescence versus PI staining). In the auxin treatment (L), BRX-GFP dissociates from the plasma membrane (M; top, BRX-GFP fluorescence; middle, PI staining; bottom, overlay) and persists in the nucleus (arrowhead). (O) ICA of BRX-GFP and DAPI staining of *p35S::BRX::GFP* plants treated with 50 μ M MG132, 30 μ M cycloheximide and 10 μ M IAA for 90 minutes. Scale bars: 50 μ m.

Auxin promotes translocation of BRX protein from the plasma membrane to the nucleus

Corroborating our western blot results in planta, BRX-GFP fluorescence increased upon MG132 treatment. Strikingly however, BRX-GFP fluorescence was now also observed in the nucleus (Fig. 3I, J). Thus, it appears that BRX can enter the nucleus, where it is turned over by proteasome-mediated degradation. To investigate in detail why BRX-GFP abundance decreases in response to auxin treatment, we circumvented the technically limiting factor of low BRX-GFP abundance by pretreating plants with MG132 before exposing them to auxin. At the same time as auxin treatment, we applied the protein biosynthesis inhibitor cycloheximide to exclude new BRX-GFP protein from entering the system. In both mock- and auxin-treated samples, nuclear BRX-GFP abundance gradually decreased as the effect of MG132 faded, consistent with the idea that BRX degradation is constitutive and that the biosynthesis of the factors involved does not depend on auxin. Moreover, it also became evident that auxin treatment promoted dissociation of BRX-GFP from the plasma membrane (Fig. 3L). This was accompanied by its occurrence in the cytoplasm (Fig. 3M) and extended persistence in the nucleus. Such behavior was never observed in controls, for instance in plants treated with solvent (mock; Fig. 3K) or brassinolide [which signals from the plasma membrane to the nucleus through the endocytic pathway (Geldner et al., 2007)] (Fig. 3N). Rather, in the controls BRX-GFP fluorescence swiftly disappeared from the nucleus after MG132 application was stopped,

colocalized with the citrine-based plasma membrane marker W131-Y (Geldner et al., 2009) [Manders' overlap coefficient (MC)=0.800] (Manders et al., 1993) (Fig. 3G).

PINs are integral plasma membrane proteins that are continuously recycled to and from the membrane through the endocytic pathway (Geldner et al., 2003; Geldner et al., 2001). Treatment with the drug brefeldin A (BFA) disrupts this process and leads to the accumulation of PIN protein in endosomal, so-called BFA, compartments (Geldner et al., 2003). These can be identified by simultaneous labeling with the endocytic tracer dye FM4-64. Strikingly, after BFA application, BRX-GFP could also be found in BFA compartments (Fig. 3E). In the absence of BFA, FM4-64 progressively marks endosomes as it is taken up into the cell. Intensity correlation analysis (ICA) (Li et al., 2004) of FM4-64-labeled root cells with BRX-GFP signal could thus be used to verify endosomal BRX-GFP localization (MC=0.890; Fig. 3H). Together, our results suggest that BRX, similar to PIN proteins, is recycled through the endocytic pathway.

but remained well visible at the plasma membrane. Finally, compared with controls, nuclear BRX-GFP accumulation was strongly accelerated by auxin treatment when MG132 was not administered prior to auxin and cycloheximide, but rather in parallel. ICA of respective DAPI-stained cells confirmed the notion that the nucleus was the target compartment (MC=0.798; Fig. 3O). Thus, the most parsimonious explanation for our observations is that plasma membrane-associated BRX protein translocates to the nucleus in response to auxin stimulus, eventually leading to BRX degradation.

BRX activity is required in the nucleus

The fact that BRX-GFP is hardly ever visible in the nucleus in the absence of proteasome inhibitor suggests that this degradation is an efficient constitutive process. To determine whether BRX entry into the nucleus is nevertheless required for its function, we assayed the subcellular localization of BRX fragments that displayed differential propensities to rescue the *brx* root growth phenotype. A GFP fusion protein with the conserved N-terminal domain of BRX (amino acids 1-57), excluding the conserved BRX domains, did not complement the mutant (Fig. 4C). This fusion protein was generally more abundant than full length BRX-GFP and was exclusively detected at the plasma membrane (Fig. 4A). By contrast, a GFP fusion protein comprising the BRX C-terminus (amino acids 139-344), including both BRX domains, significantly rescued *brx* root growth (Fig. 4C) and was not only detected at the plasma membrane, but also in the nucleus, even in the absence of MG132 (Fig. 4B). These results suggest that the N-terminus promotes BRX membrane association. Moreover, they suggest that efficient BRX degradation also requires N-terminal regions, as the C-terminal fusion protein was stabilized in the nucleus. In addition, the C-terminal fusion protein triggered a gain-of-function phenotype that was also occasionally observed in plants overexpressing full length BRX, i.e. a strongly elongated hypocotyl (Fig. 4D). Notably, a role for *BRX* in hypocotyl development has been described before (Sibout et al., 2008). Since the strength of this phenotype was either equal or higher in lines expressing the BRX C-terminus fusion protein as compared with full length BRX, this might also mean that the C-terminus is hyperactive and that the incomplete rescue of the short root phenotype could reflect auxin hypersensitivity (Li et al., 2009; Sibout et al., 2006). Most importantly however, collectively, our data suggest that the BRX C-terminus exerts an essential activity in the nucleus.

Consistent with the proposed role of *BRX* in transcriptional regulation, BRX can physically interact with a bona fide transcription factor of the B3 domain superfamily. This discovery originated from a yeast two hybrid screen, in which the BRX family protein, BRX-LIKE 4, was recovered as an interactor of NGATHA 1 (NGA1) (Alvarez et al., 2006; Trigueros et al., 2009). Given the high level of conservation among BRX family genes (Briggs et al., 2006), it was not surprising that NGA1 could also interact with BRX (Fig. 4E). To verify this interaction in planta, we employed a bimolecular fluorescence complementation approach. Indeed, interaction of BRX and NGA1 was again observed, in the nuclei of transiently transformed tobacco leaf cells (Fig. 4F). Moreover, similar to *BRX*, *NGA1* is expressed in the root vasculature (Birnbaum et al., 2003; Trigueros et al., 2009). Thus, BRX might regulate transcription in conjunction with NGA1.

Interference of BRX activity with root gravitropism

The impact of auxin on BRX subcellular localization, together with the similarities between *BRX* and *PINs*, i.e. endocytic recycling and the penetrance and morphology of *brx* and multiple *pin* mutant

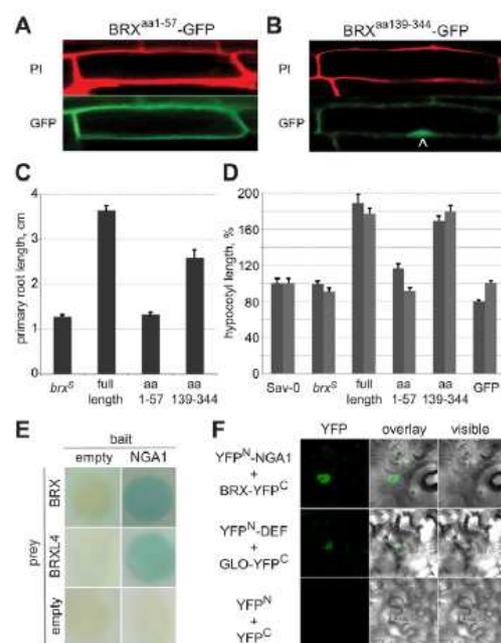


Fig. 4. Subcellular localization and gain-of-function effects of BRX fragments. (A) Bottom: subcellular localization of the BRX N-terminal fragment fusion protein (GFP fluorescence) at the plasma membrane. Top: PI staining. (B) Bottom: subcellular localization of the BRX C-terminal fragment fusion protein (GFP fluorescence) in the nucleus (arrowhead). Top: PI staining. (C) Propensity of fusion proteins between BRX fragments (amino acids indicated) and GFP to rescue the *brx* root growth defect. (D) Gain-of-function effects of BRX-GFP full length and fragment fusion proteins, and controls, on hypocotyl elongation (two replicate experiments). $n \geq 30$ seedlings in C and D. Error bars represent standard error of the mean. (E) Yeast two hybrid interactions between BRX family proteins and the NGA1 B3 domain transcription factor in the Matchmaker (Clontech) system. Positive interactions are indicated by colorimetric (blue color) colony assay. (F) Bimolecular fluorescence complementation in tobacco leaf cell nuclei between transiently expressed (*35S* promoter) full length NGA1 and BRX fusions to N- and C-terminal fragments of YFP, respectively. Known interaction between the MADS box transcription factors DEFICIENS (DEF) and GLOBOSA (GLO) served as a positive control. Right, visible; left, YFP fluorescence; middle, overlay.

embryo phenotypes (Blilou et al., 2005), prompted us to revisit whether *BRX* plays a direct role in PAT. Disrupting auxin transport does not only impinge on root growth, but also on tropic responses, such as gravitropism (Benjamins and Scheres, 2008; Leyser, 2005). This process is controlled by the columella root cap region, where dynamic relocalization of PIN proteins is required for proper gravitropism (Wisniewska et al., 2006). *BRX* is indeed expressed in the columella (Mouchel et al., 2006). However, *brx*, as well as *brx brx11* double mutants, only displayed a very slight and background-dependent delay in gravitropism (see Fig. S1A,B in the supplementary material), which could also be an indirect consequence of its diminished root growth rate. If specifically targeted to the root cap however, excess BRX activity could delay root gravitropism (see Fig. S1B in the supplementary material). This

was also occasionally observed in strong *BRX* overexpression lines (see Fig. S1C in the supplementary material). Since root growth rate was restored in these lines, this suggests that the effect on tropism was genuine. Despite these gain-of-function phenotypes, and although *brx* root growth displays resistance to the auxin transport inhibitor naphthalene phthalamic acid (NPA) (Dhonukshe et al., 2008; Geldner et al., 2001; Petrusek et al., 2003), it appears unlikely that *BRX* is involved in the actual physical process of auxin transport (Mouchel et al., 2004; Mouchel et al., 2006). Corroborating this idea, we could not detect statistically significant differences in acropetal PAT in the roots of *brx* mutants when directly measured (E.S., three replicates, data not shown). Thus, in summary, although *BRX* is able to interfere with a PAT-related process, it does not appear to be an integral component of the auxin transport machinery.

Polar plasma membrane localization of *BRX* protein in vascular cells

A key feature of the inherent polarity of auxin transport is the asymmetric localization of the PAT machinery, in particular the PIN auxin efflux carriers (Wisniewska et al., 2006). For instance, PIN1 is typically located at the basal end (towards the root tip) of vascular root cells, in line with the direction of PAT. Similar asymmetric, polar localization of *BRX*-GFP at the basal end of vascular root cells, the expression domain of endogenous *BRX*, was evident in those transgenic *pBRX::BRX::GFP* individuals where fluorescence could be detected (Fig. 5A-C). No such signal was ever observed in extensive imaging of mutant and wild-type controls. Thus, in its genuine expression domain, *BRX* is asymmetrically located at the PIN1 auxin efflux carrier domain. Since expression of *BRX* under control of the *PIN1* promoter fully rescues the *brx* short root phenotype (Mouchel et al., 2006), the two genes do indeed appear to act in the same tissues.

BRX nuclear translocation might be a vesicle-based process

An important effect of auxin treatment is its effect on PIN protein abundance and distribution at the plasma membrane, which is likely to be mediated through auxin-induced changes in endosomal dynamics (Abas et al., 2006; Paciorek et al., 2005; Sauer et al., 2006). Thus, it appears possible that the auxin response of *BRX*-GFP reflects the effects of auxin on endocytosis. Indeed, slow-down of endocytic recycling by BFA treatment swiftly promoted *BRX*-GFP translocation to the nucleus (see Movie 1 in the supplementary material) and enhanced auxin effects on *BRX*-GFP. Notably, BFA specifically inhibits cargo delivery to membrane compartments from endosomal compartments (Geldner et al., 2003; Richter et al., 2007; Teh and Moore, 2007). Thus, disruption of endosomal *BRX*-GFP recycling to the plasma membrane could result in redirection of *BRX*-GFP transport towards the nucleus. This could also mean that *BRX*-GFP translocation to the nucleus might involve a vesicle-based step, a notion that is supported by the occurrence of trafficking *BRX*-GFP patches (see Movie 1 in the supplementary material).

Polar plasma membrane abundance of *BRX* protein responds to polar auxin transport inhibition

Since it has been suggested that auxin promotes its own efflux by stimulating PAT through its effect on endocytosis (Paciorek et al., 2005), the *BRX*-GFP response to auxin could reflect a response to increased PAT. To test this idea, we conducted the inverse experiment by taking advantage of the PAT inhibitor, NPA

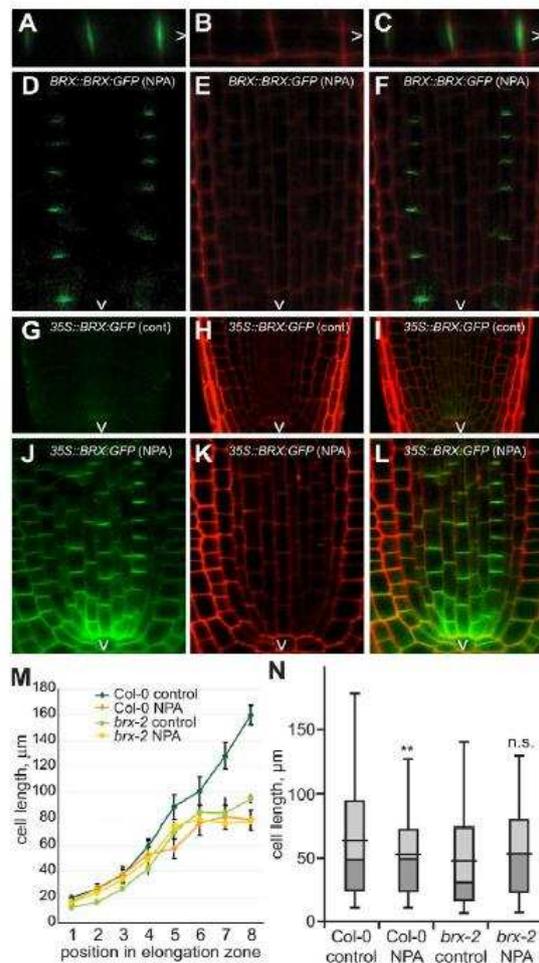


Fig. 5. Polar plasma membrane localization of *BRX* and response to auxin transport inhibition. (A-C) Polar plasma membrane localization of *BRX*-GFP expressed under its own promoter (*pBRX::BRX::GFP*) in root phloem pole cells: *BRX*-GFP fluorescence (A); corresponding PI staining (B); and overlay (C). (D-F) Stabilization of *BRX*-GFP fusion protein at its polar plasma membrane location in *pBRX::BRX::GFP* seedlings treated with 5 μ M of the auxin transport inhibitor NPA for 10 hours. *BRX*-GFP fluorescence in the root phloem vasculature (images show the stele only), close to the root tip (D), corresponding PI staining (E) and overlay (F). (G-I) Stabilization and accumulation of *BRX*-GFP at its polar plasma membrane location after NPA treatment in *p35S::BRX::GFP* seedlings. (G-I) Mock treatment. (J-L) Similar to D-F, after 3 hours of NPA treatment. Images G-L were taken with identical intensity settings. (M) Average cell lengths in the root meristem elongation zone of 4-day-old seedlings, starting from the first rapidly elongating cell upwards, for wild type (*Col-0*) or *brx* mutants, after 16 hours of growth on control media or media containing 5 μ M NPA. Sample size is 10-12 roots. Error bars represent standard error of the mean. (N) Size distribution of all cells measured in M, with average and quartiles indicated. Asterisks indicate t-test significance as compared with control treatment: ** $P < 0.01$; n.s., not significant. *brx-2*: *brx* null allele in the *Col-0* background. Arrowheads point towards the root tip.

(Dhonukshe et al., 2008; Geldner et al., 2001; Petrasek et al., 2003). Indeed, upon application of NPA at concentrations reported not to interfere with vesicle trafficking, BRX-GFP became stabilized at its polar plasma membrane localization in vascular cells. Thus, BRX-GFP became clearly visible in *pBRX::BRX:GFP* plants (Fig. 5D-F), in which it is hardly ever detectable under normal circumstances. This effect appeared to be non-genomic, as stabilization and polar accumulation of BRX-GFP could also be observed within less than 30 minutes of NPA treatment in plants in which *BRX:GFP* expression is no longer auxin-dependent (Fig. 5G-L). Thus, inhibition of PAT had an opposite effect on BRX-GFP localization as compared with auxin treatment. A plausible explanation for this observation would be that PAT inhibition also inhibited nuclear translocation of BRX-GFP, resulting in its increased plasma membrane abundance and stabilization.

PAT inhibition in wild type phenocopies the *brx* loss-of-function mutant

Notably, we had previously demonstrated that *brx* mutants are resistant to the inhibitory effects of NPA on root growth (Mouchel et al., 2006). In light of the above results, we revisited this physiological assay in more detail to determine the effect of NPA on a cellular level. We focused our investigation on the cell elongation zone of the root meristem, where *BRX* is genuinely expressed. Sixteen hours after transfer of 4-day-old wild-type or *brx* mutant seedlings from standard media to media containing 5 μ M NPA, we compared the progression of cell elongation by measuring cell size, starting from the first rapidly elongating cell up to ten older neighboring cells in the same cell file. Whereas wild-type roots on control media displayed continuous elongation up to ~15 cells above the cell proliferation zone, cell elongation had already ceased at ~6 cells in the NPA-treated roots (Fig. 5M). Notably, the cell size profile of the NPA-treated wild-type roots closely matched the profile of control *brx* roots, which were again insensitive to NPA in this assay (Fig. 5M). Consistently, the overall cell size distribution of NPA-treated wild-type seedlings was significantly different from the mock-treated wild-type control, but not significantly different from the distribution in NPA- or mock-treated *brx* mutants (Fig. 5N). Thus, NPA treatment of wild-type roots phenocopied the root cell elongation phenotype of *brx* mutants.

DISCUSSION

In *Arabidopsis brx* mutants, root growth is strongly diminished and coincides with impaired auxin-responsive transcription (Mouchel et al., 2004; Mouchel et al., 2006). However, the latter could reflect an indirect effect of brassinosteroid deficiency, as both root growth and auxin-responsiveness of *brx* can be largely restored by brassinolide treatment (Mouchel et al., 2006). This interpretation is in line with a growing body of literature that suggests that brassinosteroids are rate-limiting for auxin action (Hardtke, 2007; Kuppasamy et al., 2008; Nemhauser et al., 2004; Vert et al., 2008). Our finding that the *hy5* mutation can significantly suppress the *brx* root growth phenotype supports this idea, as it suggests that a parallel constitutive increase in auxin-responsive transcription as conferred by *hy5* loss of function (Sibout et al., 2006) can offset diminished basic auxin-responsiveness of the transcriptional machinery in *brx*. This interpretation would also be consistent with more recent findings, which suggest that the brassinosteroid pathway modulates auxin-induced gene expression by lowering the level of constitutive repression, through impinging on the DNA-binding capacity of the repressive ARF2 (Vert et al., 2008). An indirect, brassinosteroid-

mediated effect of BRX on ARF2 activity would also explain why auxin-responsiveness is impaired in *brx* mutants while at the same time canonical auxin signaling appears to remain intact.

An important feature of *BRX* is the control of its own expression by an autoregulatory feedback loop; *BRX* transcription is highly auxin-responsive and accordingly, *BRX* is no longer auxin-inducible and thus underexpressed in a *brx* background (Mouchel et al., 2006). Our results presented here suggest that auxin also controls BRX activity post-translationally, by negatively regulating the abundance of BRX protein. Since this could be counteracted by proteasome inhibitor treatment, BRX appears to be a target for auxin-induced, proteasome-mediated degradation. Interestingly, a salient feature of AUX/IAA corepressors is that their abundance is negatively regulated by auxin. Their respective genes, however, are themselves primary auxin-induced genes, which establishes a negative-feedback loop (Benjamins and Scheres, 2008; Dharmasiri et al., 2005a; Gray et al., 2001; Kepinski and Leyser, 2005). Thus, on both the transcriptional and post-translational level, BRX is controlled in a similar manner as AUX/IAAs. It therefore appears possible that BRX, just like AUX/IAAs, might be a substrate for TIR1-type auxin receptors. However, thus far, we could not detect any significant direct interaction between BRX and the prototypical auxin receptor, TIR1, using various approaches (K.S.O., unpublished). Therefore, BRX is possibly targeted for the proteasome pathway by other E3 ubiquitin ligases or, perhaps, BRX is stabilized by proteasome inhibitor treatment indirectly.

An alternative explanation for the negative regulation of BRX abundance by auxin is offered by the observed trafficking of BRX-GFP fusion protein from the plasma membrane to the nucleus. At steady state, BRX-GFP was nearly exclusively detectable at the plasma membrane. This is supported by our biochemical and colocalization studies. Since BRX contains neither secretion signals nor obvious modification sites for membrane anchor attachment, it appears that BRX is a membrane-associated protein. The plasma membrane localization of BRX-GFP together with its accumulation in BFA compartments after prolonged treatment, in the presence of cycloheximide, suggests that BRX is recycled through the endocytic pathway, similar to PIN proteins. Upon auxin treatment, BRX-GFP was released from the membrane and translocated to the nucleus. Interestingly, this effect could be mimicked by short BFA treatment, which also enhanced the effects of auxin if applied simultaneously. Notably, BFA specifically inhibits cargo delivery to membrane compartments by inactivating susceptible ARF-guanine nucleotide-exchange factors (ARF-GEFs). In *Arabidopsis* PAT, BFA specifically targets GNOM, an ARF-GEF that is involved in the plasma membrane delivery of PINs from endosomal compartments (Geldner et al., 2003; Richter et al., 2007; Teh and Moore, 2007). Thus, the BFA effect on BRX-GFP plasma membrane versus nuclear localization could be explained by a redirection of endosomal BRX-GFP transport towards the nucleus as redelivery to the plasma membrane becomes progressively blocked. This would also suggest that BRX-GFP translocation to the nucleus could, in part, be a vesicle-based process, a notion that is supported by the occurrence of trafficking BRX-GFP patches (see Movie 1 in the supplementary material). In summary, the most parsimonious explanation for our observations is that upon auxin stimulus, plasma membrane-associated BRX protein translocates to the nucleus, where it eventually is targeted for degradation by a constitutive, auxin-independent ubiquitin ligase.

It is noteworthy that, although our results are limited by the technical constraints on BRX-GFP detection, BRX-GFP abundance was considerably lower than GFP abundance in control lines using

the same constitutive promoter (typically <1/100) (Mouchel et al., 2006), consistent with high, efficient turnover of the protein. Thus, BRX-GFP was also less abundant than PIN1-GFP for instance, or BR11-GFP expressed under control of their respective native promoters (Benkova et al., 2003; Geldner et al., 2007). These findings suggest that our experimental system was not overloaded by excess BRX-GFP.

Importantly, our analyses of BRX fragments suggest that despite its rapid turnover, BRX exerts an essential activity in the nucleus. Based on our protein interaction studies and overlapping expression domains (Birbaum et al., 2003; Trigueros et al., 2009), this activity probably involves the B3 domain transcription factor NGA1. BRX might regulate the transcription of genes controlled by NGA1 by acting as a transcriptional coregulator, since so far we could not detect DNA-binding activity of BRX (C.S.H., unpublished). Although the exact role of NGA1 in root development remains to be explored, it is interesting to note that NGA1 is a B3 domain transcription factor that is related to ARFs. Thus, one possibility is that BRX family proteins and NGA family transcription factors could form novel coregulator-transcription factor pairs, whose regulatory logic is conceptually similar to the AUX/IAA-ARF transcriptional switches, and whose activity is also controlled by auxin.

This control is possibly exerted through auxin flux, as NPA treatment resulted in stabilization of BRX-GFP and its increased abundance at the polar PIN1 auxin efflux carrier domain. An alternative explanation for this accumulation at the plasma membrane could be increased cellular auxin concentration, due to inhibition of auxin efflux (and thus increased *BRX* transcription). However, this would be difficult to reconcile with the opposite effect of auxin treatment on BRX-GFP localization. Moreover, the effect of NPA treatment appeared to be non-genomic: stabilization and polar accumulation of BRX-GFP could also be observed in plants in which *BRX:GFP* expression is no longer auxin-dependent. A plausible explanation for this observation would be that PAT inhibition prevented nuclear translocation of BRX-GFP. This interpretation would also explain the morphological effects of NPA treatment on the root meristem, in the sense that in the context of root cell elongation, NPA treatment might largely act through promoting BRX plasma membrane association, thus abolishing BRX activity in the nucleus and consequently mimicking the *brx* loss-of-function phenotype.

Conclusions

In summary, we provide evidence that BRX is a plasma membrane-associated protein, which can translocate into the nucleus to regulate gene expression. Moreover, BRX appears to be localized at the PIN1 auxin efflux carrier domain and the extent of this plasma membrane localization versus transfer to the nucleus appears to respond to auxin activity, and possibly to the rate of polar auxin transport. Collectively, our results suggest that BRX is involved in a novel intracellular signaling pathway, which might act to convey auxin action at the efflux carrier domain into gene expression differences. Since *brx* mutants are impaired in cell proliferation and elongation, but not in lateral organ formation or tropisms, this facet of auxin signaling could mainly serve to control cellular growth. Conceptually, this pathway could thus serve as an important contextual readout of the auxin gradient observed across the root tip.

The authors thank Prof. N. Geldner for helpful comments on the manuscript and for the W131-Y plasma membrane marker line; Dr Rodríguez-Egea for the *brx-2* allele; Dr Brendan Davies and Barry Casuier for help with yeast two hybrid experiments; Dr Alejandro Ferrando for providing BiFC plasmids; and

Profs C. Fankhauser and K. Schumacher for anti-DET3 antibody. Work in the lab of C.F. was supported by grant BIO2005-01541 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, and by doctoral fellowships of the Generalitat Valenciana to M.N.-G. and M.T. Work in the lab of C.S.H. was supported by Swiss National Science Foundation grant 3100A0-107631, 'BRAVISSIMO' Marie-Curie Initial Training Network support for E.S., a Marie-Curie post-doctoral fellowship to K.S.O. and University of Lausanne support for J.B. We would also like to acknowledge support of the Cellular Imaging Facility of the University of Lausanne.

Author contributions

C.S.H., E.S. and K.S.O. conceived this study and wrote the manuscript with help from J.B., P.S. and C.F.; E.S. provided the data for Fig. 2, Fig. 3C-E, G-O, Fig. 4A,B,D, Fig. 5 and Movie 1; K.S.O. provided the data for Fig. 1H-K, Fig. 3A,B and Fig. 4C, and the materials for Fig. 4; J.B. provided the data for Fig. S1 and the materials for Fig. 1D-G; P.S. provided the data for Fig. 3F; M.T. provided the data for Fig. 4E; M.N.-G. provided the data for Fig. 4F; C.S.H. provided the data for Fig. 1A-G.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/136/12/2059/DC1>

References

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wisniewska, J., Moulinier-Anzola, J. C., Sieberer, T., Friml, J. and Luschign, C. (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat. Cell Biol.* **8**, 249-256.
- Alvarez, J. P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z. and Eshed, Y. (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**, 1134-1151.
- Badescu, G. O. and Napier, R. M. (2006). Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci.* **11**, 217-223.
- Bassham, D. C. and Raikhel, N. V. (1998). An *Arabidopsis* VPS45p homolog implicated in protein transport to the vacuole. *Plant Physiol.* **117**, 407-415.
- Bauby, H., Divol, F., Truernit, E., Grandjean, O. and Palauqui, J. C. (2007). Protophloem differentiation in early *Arabidopsis thaliana* development. *Plant Cell Physiol.* **48**, 97-109.
- Benjamins, R. and Scheres, B. (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 443-465.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G. and Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Birbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W. and Benfey, P. N. (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* **302**, 1956-1960.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**, 39-44.
- Briggs, G. C., Mouchel, C. F. and Hardtke, C. S. (2006). Characterization of the plant-specific BRX gene family reveals limited genetic redundancy despite high sequence conservation. *Plant Physiol.* **140**, 1306-1316.
- Curtis, M. D. and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plants. *Plant Physiol.* **133**, 462-469.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J. S., Jurgens, G. and Estelle, M. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F-box proteins. *Dev. Cell* **9**, 109-119.
- Dhonukshe, P., Grigoriev, I., Fischer, R., Tominaga, M., Robinson, D. G., Hasek, J., Paciorek, T., Petrasek, J., Seifertova, D., Tejos, R. et al. (2008). Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 4489-4494.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and Jurgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 147-153.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G. and Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**, 425-428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jurgens, G. (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.

- Geldner, N., Hyman, D. L., Wang, X., Schumacher, K. and Chory, J. (2007). Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* **21**, 1598-1602.
- Geldner, N., Dénervaud-Tendon, V., Hyman, D. L., Mayer, U., Stierhof, Y. D. and Chory, J. (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multi-color marker set. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-3113.2009.03851.x
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-276.
- Grieneisen, V. A., Xu, J., Maree, A. F., Hogeweg, P. and Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008-1013.
- Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M. and Jurgens, G. (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev.* **16**, 1610-1615.
- Hardtke, C. S. (2007). Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *BioEssays* **29**, 1115-1123.
- Hardtke, C. S. and Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* **17**, 1405-1411.
- Hardtke, C. S., Kuschumova, W., Vidaurre, D. P., Singh, S. A., Stamatiou, G., Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. and Berleth, T. (2004). Overlapping and non-redundant functions of the Arabidopsis auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development* **131**, 1089-1100.
- Kepinski, S. and Leyser, O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.
- Kuppusamy, K. T., Walcher, C. L. and Nemhauser, J. L. (2008). Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Mol. Biol.* **69**, 375-381.
- Leyser, O. (2005). Auxin distribution and plant pattern formation: how many angels can dance on the point of PIN? *Cell* **121**, 819-822.
- Li, H., Cheng, Y., Murphy, A., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (2009). Constitutive repression and activation of auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **149**, 1277-1288.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B. and Stanley, E. F. (2004). A syntaxin 1, G α (α), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: Analysis by quantitative immunocolocalization. *J. Neurosci.* **24**, 4070-4081.
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J. and Aten, J. A. (1993). Measurement of colocalization of objects in dual-color confocal images. *J. Microsc.* **169**, 375-382.
- Men, S., Boutte, Y., Ikeda, Y., Li, X., Palme, K., Stierhof, Y. D., Hartmann, M. A., Moritz, T. and Grebe, M. (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat. Cell Biol.* **10**, 237-244.
- Mouchel, C. F., Briggs, G. C. and Hardtke, C. S. (2004). Natural genetic variation in Arabidopsis identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev.* **18**, 700-714.
- Mouchel, C. F., Osmont, K. S. and Hardtke, C. S. (2006). BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signaling in root growth. *Nature* **443**, 458-461.
- Nemhauser, J. L., Mockler, T. C. and Chory, J. (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **2**, E258.
- Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrasek, J., Stierhof, Y. D., Kleine-Vehn, J., Morris, D. A., Emans, N., Jurgens, G., Geldner, N. et al. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* **435**, 1251-1256.
- Petrásek, J., Cerna, A., Schwarzzerova, K., Eldner, M., Morris, D. A. and Zazimalova, E. (2003). Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiol.* **131**, 254-263.
- Reinhardt, D., Mandel, T. and Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**, 507-518.
- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y. D., Rios, G., Koncz, C., Robinson, D. G. and Jurgens, G. (2007). Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* **448**, 488-492.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P. et al. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**, 463-472.
- Sauer, M., Balla, J., Luschnig, C., Wisniewska, J., Reinohl, V., Friml, J. and Benkova, E. (2006). Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev.* **20**, 2902-2911.
- Sibout, R., Sukumar, P., Hettiarachchi, C., Holm, M., Muday, G. K. and Hardtke, C. S. (2006). Opposite root growth phenotypes of hy5 versus hy5 hyh mutants correlate with increased constitutive auxin signaling. *PLoS Genet.* **2**, e202.
- Sibout, R., Plantegenet, S. and Hardtke, C. S. (2008). Flowering as a condition for xylem expansion in Arabidopsis hypocotyl and root. *Curr. Biol.* **18**, 458-463.
- Strader, L. C., Monroe-Augustus, M. and Bartel, B. (2008). The IRR5 phosphatase promotes Arabidopsis auxin responses through a novel mechanism distinct from TIR1-mediated repressor degradation. *BMC Plant Biol.* **8**, 41.
- Teh, O. K. and Moore, I. (2007). An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* **448**, 493-496.
- Tiwari, S. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**, 533-543.
- Trigueros, M., Navarrete-Gómez, M., Sato, S., Christensen, S., Pelaz, S., Weigel, D., Yanofsky, M. and Ferrándiz, C. (2009). The NGATHA genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium. *Plant Cell* (in press).
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-1868.
- Vert, G., Walcher, C. L., Chory, J. and Nemhauser, J. L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 9829-9834.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benkova, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C. and Friml, J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**, 4521-4531.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**, 949-956.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Bilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B. and Friml, J. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**, 883.

Journal of Experimental Botany Advance Access published October 5, 2006

Journal of Experimental Botany, Page 1 of 13
Major Themes in Flowering Research Special Issue
doi:10.1093/jxb/erf188



Journal of
Experimental
Botany

Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones

Vicente Balanzá, Marisa Navarrete, Marina Trigueros and Cristina Ferrándiz*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC), Campus de la Universidad Politécnica de Valencia, Avda de los Naranjos s/n, E-46022 Valencia, Spain

Received 26 June 2006; Accepted 6 September 2006

Abstract

The study of floral organ development has been a driving force in plant developmental biology research for the last two decades, and there is now an enormous wealth of information about the genetic networks underlying the specification of floral organ identity and the acquisition of its final morphology and function. These and parallel studies on leaf morphogenesis and development have made evident the common evolutionary origin of all plant lateral organs and the recurrent use of variations in the regulatory circuits involved in the shaping of leaves and flowers. This review summarizes the latest progress on the study of the development of the gynoecium, the female reproductive organ of the flower, stressing the connections with the developmental programme of leaf morphogenesis, and highlighting the common role of hormonal cues in these processes.

Key words: Auxin, carpel, floral organ, gynoecium, lateral organ development, morphogenesis, patterning.

Introduction

We all like flowers: they can be beautiful, attractive and inspiring in many ways, not only for poets and lovers but also for scientists, who have been interested for centuries in unravelling the mystery behind floral organ identity and patterning. But if something defines a flowering plant it is the carpel, the ovule-bearing organ of the flower. In fact, the very term angiosperm comes from the Greek and means 'seeds enclosed in a vessel' (*angion*, vessel, and *sperma*, seed). In general, one or more carpels make up the gynoecium, the female reproductive structure and most complex organ of the flower. The gynoecium provides protection for the ovules, helps to discriminate between male gametophytes,

and facilitates successful pollination. After ovule fertilization, the gynoecium develops into a fruit, the main functions of this specialized organ being seed protection and dispersal.

Goethe's early hypothesis that floral organs are 'metamorphosed' vegetative leaves has been heavily quoted in the last two decades, as the genetic networks controlling floral organ identity have progressively been revealed. Almost definitive support for it has come from the complete transformation of floral organs into leaves in the quadruple *sepallatal* (*sep1 sep2 sep3 sep4*) mutants, or the ectopic conversion of vegetative leaves into floral organs by the expression of *SEP* and floral homeotic genes (Honma and Goto, 2001; Pelaz *et al.*, 2001). Thus, it is widely accepted that carpels have evolved from modified leaves, probably sporophylls, the gametophyte-bearing leaves, although different theories about the ancestral type of sporophyll involved and how they evolved into a closed gynoecium are still subject to debate (reviewed in Scutt *et al.*, 2006).

Most of our current knowledge on the molecular genetics leading to gynoecium development comes from genetic and molecular research in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Comprehensive reviews describing carpel morphogenesis and fruit development in *Arabidopsis* have been published recently (Dinneny and Yanofsky, 2005; Roeder and Yanofsky, 2005). Our aim is to complement those, summarizing the latest progress in this rapidly expanding field, where new genes with a role in carpel development and new roles for known genes have been described recently. An attempt has been made to look into the carpels from the leaf hidden behind, stressing the parallels in leaf and carpel development and highlighting the role of hormonal cues in gynoecium patterning now that molecular genetics are rapidly changing the view on hormone action in relation to development.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: cferrandiz@ibmcp.upv.es

2 of 13 Balanzá et al.

The basic plan in lateral organs

If leaves can be transformed into floral organs by expression of the floral organ identity genes, the distribution of tissues in the floral organ, that is, patterning, must be underlying the basic plan of the leaf, and possibly further refined downstream in the floral organ identity genes. Accordingly, most of the mutations that affect floral organ patterning also affect the basic development of leaves and all lateral organs.

So, what is known about lateral organ patterning? In the last few years, huge progress has been made in unravelling the genetic networks underlying leaf initiation and development. Several reviews have been published recently that provide an in-depth approach to this field of plant development (Tsukaya, 2003, 2006; Byrne, 2005; Fleming, 2005). The aim in this section is to give a schematic picture of the basic plan of lateral organ development in *Arabidopsis*, that will be used later as the scaffold to build 'our' gynoecium.

Lateral organ primordia are produced in the periphery of the shoot apical meristem (SAM). SAM maintenance is mainly controlled by several related class-I KNOX homeobox transcription factors (Hake *et al.*, 2004). Down-regulation of *KNOX* genes occurs at positions for lateral organ primordia initiation, and auxins have been proposed as a major factor influencing this process. In the SAM, auxin efflux facilitators such as PINFORMED (PIN) direct auxin flux to sink positions, where they reach high concentrations, pinpointing the location of primordium emergence (Reinhardt *et al.*, 2000). In these auxin peak positions, the *KNOX* genes are excluded, and 'boundary' genes such as the *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* genes delimit the primordium borders. Concomitantly, auxin transporters appear to change their intracellular polar localization, redirecting auxin flux to a new position in the meristem (Heisler *et al.*, 2005). *KNOX* gene repression in the emerging primordium is maintained by the heterodimer formed by the transcription factors *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, of the Myb family, and *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)*, which encodes a LOB domain protein. Conversely, *AS1* and *AS2* are excluded from the SAM by the *KNOX* proteins (reviewed by Byrne, 2005). In addition to auxin, other plant hormones are important for inducing primordia differentiation. Thus, low levels of cytokinins (CK) and high levels of gibberellins (GAs) are needed to induce a differentiated state (Jasinski *et al.*, 2005). *KNOX* proteins appear to control hormonal balance in the SAM to maintain the undifferentiated state, inducing CK biosynthesis and reducing the level of active GAs (Frugis *et al.*, 2001; Hay *et al.*, 2002; Yanai *et al.*, 2005). In addition to the determination of primordia initiation, auxin distribution in the developing leaf appears to be an important factor controlling final shape and size, as well as venation patterning. It has been proposed that directed transport of auxin established the developing leaf primordia tip as an

auxin sink (Reinhardt *et al.*, 2003), thus generating a proximodistal auxin gradient with its maximum at the tip of the developing primordium (Benkova *et al.*, 2003), which could provide positional information for midvein development (Zgurski *et al.*, 2005). As they develop, primordia would become auxin sources, auxin biosynthesis taking place first at the leaf tip and then at the margins (hydathodes). This proposed sink-source transition coincides with the lateral growth of primordia and the formation of the secondary veins (Avsian-Kretchmer *et al.*, 2002; Aloni *et al.*, 2003). The symmetric pattern of auxin foci at the leaf margin has been postulated to direct symmetric blade expansion and vascular development, and, interestingly, auxin sources in the leaf primordia are asymmetrically positioned in *as* mutants (Aloni *et al.*, 2003; Zgurski *et al.*, 2005).

Dorsoventrality, that is, development along the abaxial-adaxial axis, is immediately specified in the emerging primordium. It has been proposed that this polarity requires a signal provided by the SAM, of yet unknown nature, as primordia microscopically separated from the SAM develop as radial abaxialized structures (Reinhardt, 2005). The genes involved in establishing this polarity are expressed in their corresponding adaxial or abaxial domains from primordia inception, although it is still not clear how this polar expression is first established. Adaxial identity is primarily conferred by members of the class III homeodomain-leucine zipper (HD-ZipIII) transcription factors PHABULOSA, PHAVOLUTA, and REVOLUTA, which also have a role in SAM initiation and maintenance (Emery *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2005; Prigge *et al.*, 2005), with the partially redundant help of AS1 and AS2. Abaxial fate specification is mainly carried out by two groups of genes expressed in abaxial positions: the *KANADI* genes, encoding putative transcription factors of the GARP family (Eshed *et al.*, 2001; Kerstetter *et al.*, 2001) and several *YABBY* genes such as *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *YABBY2 (YAB2)*, and *YABBY3 (YAB3)* (Eshed *et al.*, 1999, 2004; Sawa *et al.*, 1999; Siegfried *et al.*, 1999). Recently, *AINTEGUMENTA (ANT)*, a gene encoding a transcription factor of the AP2/ERF family and one of the earliest genes expressed in lateral primordia founder cells has been postulated as a positive regulator of both abaxial and adaxial factors because of the mixed abaxial and adaxial characters of both leaf surfaces caused by the loss of *ANT* function in a *yabby* mutant background (Nole-Wilson and Krizek, 2006). Later, in the developing primordium, the antagonistic action of abaxial and adaxial genes and a prominent role for microRNA-dependent transcriptional regulation define both domains and strengthen the maintenance of polarity in the developing leaf. Thus, *KAN* genes negatively regulate the adaxial *HD-ZipIII* genes, which, in addition, are targeted by microRNAs (miRNAs) (Engstrom *et al.*, 2004; Williams and Fletcher, 2005; Grigg *et al.*, 2006). The auxin response

factor encoding genes *ETTIN* (*ETT*) and *ARF4* have been shown to promote abaxial development in parallel with the *KAN* genes (Pekker *et al.*, 2005) and to be regulated by *trans*-acting siRNAs (ta-siRNAs) (Fahlgren *et al.*, 2006). The role of Auxin Response Factors in abaxial specification suggests a possible role for auxin in the adaxial/abaxial patterning process. This hypothesis is strengthened by the higher presence of *AUX1*, an auxin influx facilitator, in the abaxial epidermis of the leaf (Reinhardt *et al.*, 2005), which could result in the formation of an abaxial–adaxial gradient of auxin concentration in the leaf.

In addition to the adaxial/abaxial axis, leaves also show a proximal/distal axis of asymmetry. In the *Arabidopsis* simple leaf, proximal positions are occupied by a narrow petiole, while the leaf blade develops at the distal end (Fig. 1B). Growth of the leaf primordium into a flat expanding structure depends initially on the activity of a short-lived marginal meristem (Donnelly *et al.*, 1999), and it has been proposed that the juxtaposition of the abaxial and adaxial domains could direct the specification of this marginal meristem (Waites and Hudson, 1995). Subsequently, leaf growth depends on a diffuse cell proliferation, and the final shape is acquired by the combination of cell division and differences in polar cell elongation. In contrast to the increasing knowledge on the specification of the adaxial/abaxial domains, a clear picture of the genetic network controlling development in the proximal–distal axis has yet to emerge, although significant advances have been made recently when mutations that specifically affect the blade or the petiole domains have been described. Thus, the *JAGGED* (*JAG*) gene encodes a C₂H₂ zinc-finger transcription factor involved in the maintenance of cell-division activity in the growing leaf (Dinnyen *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2004). In *jag* loss-of-function mutants, distal growth of all lateral organs is suppressed, resulting in short and serrated organs. Constitutive expression of *JAG* leads to ectopic blade formation in the proximal end of the leaf, a similar phenotype to that caused by the loss of function of the *BLADE ON PETIOLE* (*BOP1* and *BOP2*) genes.

In the leaf primordium, *JAG* and the *BOP* genes are expressed in non-overlapping domains: *JAG* in distal positions and *BOP* at the proximal end. From genetic analyses, it appears that the *BOP* proteins restrict *JAG* expression to the distal part of the developing leaf, limiting cell division to this domain. *BOP* proteins also appear to act co-operatively with *AS1* and *AS2* in repressing *KNOX* gene expression in the emerging leaf primordia (Ha *et al.*, 2003; Hepworth *et al.*, 2005; Norberg *et al.*, 2005).

In summary, complex robust genetic networks ensure the maintenance of the meristematic-differentiated, adaxial–abaxial or proximal–distal dichotomies (Fig. 1). Cross-talk and common regulators are multiple in these pathways, as well as the general co-ordination provided by the interplay of hormonal balances, with auxin as a major morphogen.

The *Arabidopsis* gynoecium

The *Arabidopsis* gynoecium is derived from two congenitally fused carpels that appear as a single primordium in the centre of the flower, around stage 5 of flower development (according to Smyth *et al.*, 1990). Subsequently, a central invagination forms and the primordium elongates as an open hollow cylinder (stages 6 to 8). At later stages, two opposing internal meristematic outgrowths form at medial positions, which, in turn, produce the placenta and ovules laterally and fuse in the centre to form the septum (Fig. 2A, B). Shortly before anthesis, the developing gynoecium closes at its apical end and the first signs of tissue differentiation are visible. At anthesis, all the tissues required for fertilization have fully developed and those required for fruit maturation and dehiscence are already present, but will develop further after fruit set (Bowman *et al.*, 1999; Roeder and Yanofsky, 2005).

Figure 2C depicts the different regions of a mature gynoecium along the different axis of development. In the apical–basal axis, from top to base: a single cell layer of papillar cells or stigma; a short, solid style; the ovary,

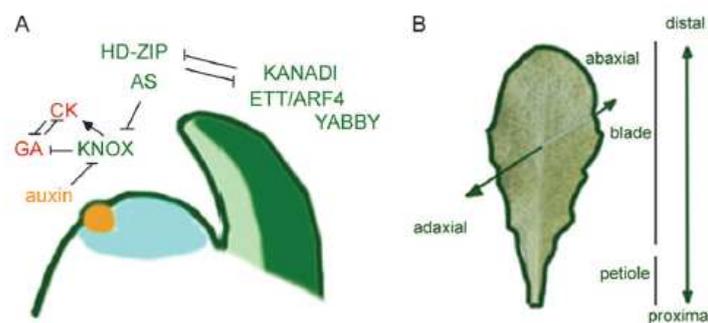


Fig. 1. (A) Interactions between transcription factors and hormones that mediate SAM maintenance, lateral organ specification, and adaxial–abaxial polarity in the leaf. (B) Cartoon of an *Arabidopsis* leaf, indicating terms used for description of polarity.

4 of 13 Balanzá et al.

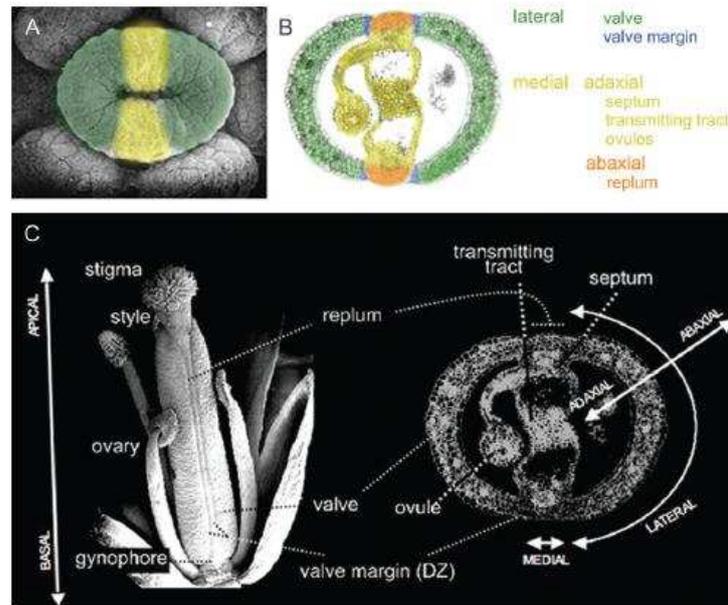


Fig. 2. Different views of an *Arabidopsis* gynoeceum and terms used for description of polarity and morphology. (A) Scanning electron micrograph of *Arabidopsis* gynoeceum at stage 7 (top view). Medial domains have been coloured in yellow, lateral domains in green. (B) Cross-section through the ovary of a gynoeceum at anthesis. Different tissues have been coloured to distinguish medial (or marginal) tissues, in yellow/orange, and lateral tissues, in green/blue. (C) Scanning electron micrograph of an *Arabidopsis* gynoeceum at anthesis (left) and cross-section through the ovary (right). Axes of polarity and morphological terms are indicated.

which contains the ovules and spans most of the length of the gynoeceum; and, basally, a short stalk-like structure, the gynophore, which attaches the ovary to the flower base. A transverse section of the ovary shows the arrangement of tissues in the medial–lateral axis: the valves correspond to the two carpel walls and are placed in lateral positions; they end in a column of smaller cells, forming a longitudinal crease, called the valve margin. In medial positions the fused margins of the carpels are found, as well as the abaxial side of the septum or replum, the post-genitally fused septum and the placentae and derived ovules. The transmitting tract, a specialized tissue that facilitates pollen tube growth, runs along the entire length of the gynoeceum from the stigma and through the centre of the style and the septum. All these medial tissues, together with the apical style and stigma, are collectively termed marginal tissues as they arise from the margins of the fused carpels. These marginal tissues clearly show adaxial–abaxial polarity. Abaxial positions are occupied by the replum, which forms a narrow stripe between the valve margins, whereas the septum, the transmitting tract, placentae, and ovules, are adaxial (Fig. 2B, C).

In mature fruits, different tissues have developed to ensure dehiscence, that is, the shattering process that opens the pod and frees the seeds to facilitate dispersal. The region that develops at the valve margin, sandwiched between the

valves and the replum, is called the dehiscence zone (DZ). The DZ comprises a separation layer of small cells, which defines a longitudinal plane of rupture at both sides of the replum, and a patch of adjacent lignified cells. The valve internal subepidermal cell layer (or endocarp) is also lignified, and when the mature fruit dries, it provides, together with the lignified patch at the DZ, mechanical tensions that facilitate pod opening (Ferrándiz, 2002).

Four longitudinal major veins run through the gynoeceum, two lateral and two medial. The lateral veins are placed at the centre of the valves and terminate at their apical end, being ontogenetically related to the middle vein in the leaf. The medial veins run through the replum and bifurcate extensively where valve and style meet, forming vascular fans in the lateral plane of the style. The medial veins are highly lignified and it is possible that they could also contribute to the dehiscence process.

Genetic factors controlling gynoeceum development

During the last few years, several mutations affecting gynoeceum development in *Arabidopsis* have been identified. Some of them primarily caused the loss of carpel identity, while others affected the differentiation of specific tissues within the gynoeceum. The cloning of the

corresponding genes and the determination of their expression patterns showed that, in general, loss of function mainly affected those domains where the gene was expressed. From these studies and analyses of genetic interactions it was suggested that most of the different tissues developed quite independently (Bowman *et al.*, 1999; Ferrándiz *et al.*, 1999). However, as will be seen later, it is becoming increasingly clear that the functional connections among them are stronger than anticipated and that development of the different compartments along the main axes of development shares many common regulators and is largely co-ordinated.

Most of the genes affecting gynoecium development also have a role in leaf patterning. Thus, the genetic networks that have previously been summarized for lateral organ development are essentially working in the same way in the two carpels that form the *Arabidopsis* gynoecium. Interestingly, many of these genes with a role in both gynoecium and leaf pattern were first identified by their phenotypes in gynoecium development, suggesting that redundancy must be more robust in leaves and, possibly, reflecting the shorter evolutionary trajectory for the acquired roles of these genes in carpel development.

From the leaf to the carpel: identity genes

As discussed above, and confirming the prediction of the widely accepted quartet model for floral organ identity (Jack, 2001; Krizek and Fletcher, 2005), a leaf can be transformed into a carpel by expressing the corresponding organ identity genes, specifically *AGAMOUS* (*AG*) and one or more of the *SEPALLATA* (*SEP*) genes (Honma and Goto, 2001). Conversely, simultaneous loss-of-function of the redundant *SEP* genes leads to a complete absence of carpel development, which in place develop as leaf-like organs (Ditta *et al.*, 2004; Pelaz *et al.*, 2000). *ag* mutants also lack carpels completely, although due to the homeotic transformations caused by the expansion of A-function genes when *AG* activity is lost, carpels are transformed into sepals (Bowman *et al.*, 1989). Both *AG* and *SEP* are members of the MADS box family of transcription factors, and they are already expressed at the inception of the carpel primordia, before any morphological sign of differentiation (Yanofsky *et al.*, 1990; Savidge *et al.*, 1995; Mandel and Yanofsky, 1997). However, in spite of the pivotal role of *AG* in carpel identity specification, most carpel-associated tissues, with the exception of valve-like tissue, can still develop in the absence of *AG* activity, such as, for example, in the ectopic first whorl organs of the double *apetala2* (*ap2*) *ag* mutant (Bowman *et al.*, 1991). This fact led to the proposal that additional factors could specify, at least partially, carpel identity in an *AG*-independent pathway. Such factors have turned out to be a pair of completely redundant and highly similar MADS box genes, *SHATTERPROOF1* and 2 (*SHP*), closely related to *AG* and primarily involved in specifying valve

margin identity (see below; Liljegren *et al.*, 2000). Thus, all carpelloid features disappear in the *ap2 ag shp1 shp2* quadruple mutant. Complementation studies have shown that *SHP* and *AG* proteins are largely equivalent at the functional level, and that their distinct roles mostly derive from their different expression patterns (Pinyopich *et al.*, 2003).

Two additional factors involved in the *AG*-independent carpel identity pathway are *SPATULA* (*SPT*) and *CRABS CLAW* (*CRC*). *SPT* encodes a bHLH transcription factor and is widely expressed in different specific tissues throughout vegetative and reproductive development (Heisler *et al.*, 2001), while *CRC* belongs to the *YABBY* family but is exclusively expressed in nectaries and carpels (Bowman and Smyth, 1999). *spt* mutants show defects in the development of most carpel specific tissues (see below), whereas *crc* gynoecia are shorter and wider than wild type and partially unfused at the top. The *crc spt* gynoecium develops as two unfused organs with very reduced amount of ovules and of stigmatic and stylar tissue and, furthermore, loss of *SPT* and *CRC* function in the *ap2 ag* background mimics the phenotype of *ap2 ag shp1 shp2* mutants (Alvarez and Smyth, 1999).

The precise hierarchy leading to carpel identity is not completely understood, although some hints have been revealed in the last few years. *AG* is activated in the floral meristem by the joint action of the products of the floral meristem identity gene *LEAFY* and the meristem maintenance homeobox gene *WUSCHEL* (Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001). Different studies placed the *SHP* genes downstream of *AG*, but this appears to be only partially true since, as seen in *ap2 ag* mutants, they can be activated independently of *AG* activity. Recently, *FIL*, *YAB3*, and *JAG*, present both in leaves and carpels, have been shown jointly to activate *SHP* (Dinnyen *et al.*, 2005; see below). Thus, *SHP* might be placed at the top of the carpel identity *AG*-independent pathway, and both *AG* and *SHP* could then, directly or indirectly, activate *SPT* and *CRC* independently (Fig. 3A)

Setting up territories

Once organ identity is specified, the gynoecium primordium becomes partitioned in different domains. Adaxial-abaxial patterning is established at the early stages of development. As for leaves, the *KAN* genes become initially expressed in abaxial domains together with the Auxin Response Factors *ETT* and *ARF4* (Sessions *et al.*, 1997; Kerstetter *et al.*, 2001; Pekker *et al.*, 2005). Leaf adaxial *YABBY* genes such as *FIL* or *YAB3* are also restricted to abaxial domains in the carpel primordia, together with *CRC*, another member of the family that is not expressed in leaves (Bowman and Smyth, 1999; Siegfried *et al.*, 1999). Single mutants in any of these loci show weak phenotypes related to adaxialization, but mutant combinations lead to strong polarity defects,

6 of 13 Balanzá et al.

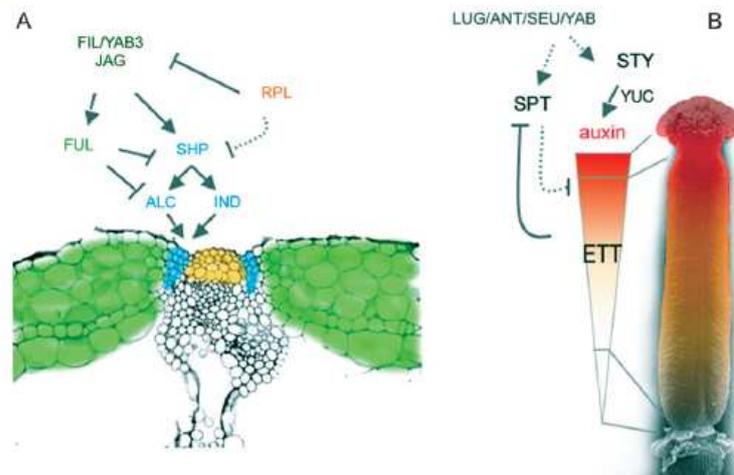


Fig. 3. (A) Model for genetic interactions directing the specification of valves (green), valve margins (blue), and replum (orange), according to Dinneny *et al.* (2005). (B) Model for patterning along the apical–basal axis, based on the auxin gradient hypothesis (Nemhauser *et al.*, 2002). Auxin levels (represented in red) would be highest in apical regions, directing stigma and style formation; intermediate levels would promote ovary development; and low levels towards the base would direct gynophore formation. Synthesis of auxin at source positions could be under the control of STY/SHI genes, while translation of auxin levels input into tissue differentiation could be mediated by the action of SPT and ETT in their respective domains.

indicating that all these functions act together to specify abaxial fate. Conversely, the *HD-ZIP* genes are expressed in their expected adaxial positions. Although the effect of both-gain-of-function and loss-of-function mutations in gynoecium development has not been described in detail, it appears to be milder than in leaves, perhaps indicating that additional factors could have a more prominent role in directing adaxial fate (McConnell and Barton, 1998; Alvarez *et al.*, 2006). A strong candidate for such activity has been identified recently. *NUBBIN* (*NUB*) is a C₂H₂ zinc-finger transcription factor closely related to *JAG*. While *JAG* is expressed in all lateral organs in a non-polar manner, *NUB* is restricted to the adaxial side of leaves and, in the flower, of stamens and carpels. *nub* single mutants do not show obvious phenotypic defects, but *jag nub* double mutants exhibit severe defects in organ growth and the abaxialization of stamens and carpels. Based on careful characterization of the expression patterns of polarity genes, it has been proposed that *NUB/JAG* activity could work downstream or in parallel to the *KAN/YAB/HD-ZIP* network, although it is still unclear whether the role of *NUB/JAG* in promoting adaxial fate is direct or reflects a requirement of correct organ growth to maintain organ polarity (Dinneny *et al.*, 2006).

A significant particularity of carpel morphogenesis is the early onset of mechanisms directing polarity in the gynoecial medial–lateral axis and subsequent partition of the gynoecium primordia into lateral and medial regions. The lateral domains later develop into the valves, while the medial domains give rise to the marginal tissues. The specification of the medial–lateral axis is clearly reflected by the early

specific expression of different genes in lateral or medial regions. The medial domain retains certain meristematic identity, possibly needed to differentiate the full complement of medial tissues in later stages. Accordingly, several of the *KNOX* genes involved in SAM maintenance are expressed in this domain, as well as the ‘boundary’ genes *CUC1* and *CUC2* (Long *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997; Ori *et al.*, 2000; Pautot *et al.*, 2001). Because of the severe developmental defects in mutants for most meristem maintenance genes, usually unable to form flowers, the precise role of these genes in gynoecium development is largely obscure. However, the importance of meristematic activity in medial regions is suggested by the phenotype of flowers produced out of calli regeneration of *cu1 cuc2* mutants, where marginal tissues fail to develop fully (Ishida *et al.*, 2000).

Interestingly, many of the genes directing adaxial–abaxial polarity also appear to be at work in the establishment of medial–lateral domains. *FIL*, *YAB3*, and *CRC*, the abaxial *YABBY* genes, are excluded from the medial domains in early stages of gynoecium development, although *CRC* later becomes expressed also in the abaxial medial regions (Bowman and Smyth, 1999; Siegfried *et al.*, 1999). Specific expression in lateral domains is also observed for *JAG* and *NUB* (Dinneny *et al.*, 2004, 2006). *CRC*, *JAG*, and *NUB* activities in the lateral domains are important to maintain growth in these regions, that later will develop into the valves. In contrast to the *YAB* genes, the expression pattern of *KANI* initiates in the abaxial side of gynoecium primordia but, intriguingly, this expression domain switches to the medial zones at later stages

(Kerstetter *et al.*, 2001). *kan1 kan2* mutants show an extreme phenotype, with adaxial marginal tissues such as ovules and transmitting tract developing all over the abaxial side of the gynoecium, indicating that, in addition to the adaxialized phenotype, the medial–lateral boundaries are lost, and therefore suggesting that KAN activity could be also required to maintain lateral domain specification (Eshed *et al.*, 2001). However, even with these emerging clues, we are still far from understanding how the medial and lateral domains are specified. An appealing hypothesis is that genetic networks that maintain the SAM and lateral organ boundaries are translated to the gynoecium context, and both antagonistic and co-operative activities fix the position of medial and lateral territories. Some recent work supports this view. Thus, the homeobox gene *REPLUMPLESS* (*RPL*, aka *BELLRINGER*, *PENNYWISE*, and *VAAMANA*) interacts with class-I KNOX factors in the SAM to maintain the undifferentiated meristematic fate (Byrne *et al.*, 2003; Smith and Hake, 2003; Bhatt *et al.*, 2004). *RPL* is also expressed in the gynoecium medial domains from the early stages of development, where it has been shown to repress *FIL*, *YAB3*, and *JAG* activities (see below; Roeder *et al.*, 2003; Dinneny *et al.*, 2005). Interestingly, *AS* genes are also expressed in carpels, as well as some class I KNOX genes (Byrne *et al.*, 2000). Our own unpublished results indicate that *AS* activity could have a role in restricting class I KNOX gene expression in the lateral domains of the gynoecium, thus maintaining the antagonistic relationship observed in SAM-lateral organ primordia (H Alonso, JJ Ripoll, I Ochando, A Vera, C Ferrandiz, A Martinez-Laborda, unpublished data).

Development of the lateral domains

The lateral domains differentiate into the valves, including the valve margins that eventually will develop into the dehiscence zones. Major factors directing valve margin formation have been studied for some time (reviewed in Dinneny and Yanofsky, 2005; Ferrándiz, 2002). *shp1 shp2* double mutants do not differentiate the dehiscence zones and therefore *shp1 shp2* mutant fruits do not shatter at maturity (Liljegren *et al.*, 2000). Similar indehiscent phenotypes are found in mutants in *INDEHISCENT* (*IND*) or *ALCATRAZ* (*ALC*), two additional transcription factors of the bHLH family (Rajani and Sundaresan, 2001; Liljegren *et al.*, 2004). Somehow opposite phenotypes are observed in *fruitfull* (*ful*) mutants, where the small lignified cells typical of dehiscence zones are ectopically found in place of valve cells, and, as a consequence, fruits do not elongate properly and prematurely break out from the internal pressure of the growing seeds (Gu *et al.*, 1998). Accordingly, *SHP*, *IND*, and *ALC*, which in wild-type fruits are expressed in the valve margin, are ectopically expressed in *ful* mutant valves (Ferrándiz *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2004). Similarly, in *rpl* mutants, the replum (the

abaxial medial region of the ovary) disappears, taking valve margin identity and expressing the corresponding valve margin genes (Roeder *et al.*, 2003).

A beautiful solid model has been put forward recently that explains the precise development of valves and valve margins in the ovary and accounts for the phenotypes and genetic interactions observed (Fig. 3A; Dinneny *et al.*, 2005). According to the model, the co-operating activities of *FIL*, *YAB3*, and *JAG* positively regulate the transcription of the MADS-box gene *FUL* and the *SHP* genes in the valve and the presumptive valve margin, respectively, in such a way that high levels of *FIL/JAG* activity in the valves would activate *FUL* expression while the transcription of *SHP* genes only would require the weaker *FIL/JAG* activity present in the valve margins. The *FUL* product, in turn, represses *SHP* gene expression, reinforcing the division of *FUL*-expressing valve and *SHP*-expressing valve margin territories (Ferrándiz *et al.*, 2000). In the replum, *RPL* blocks *FIL/JAG* activity, therefore preventing *SHP* activation (Roeder *et al.*, 2003; Dinneny *et al.*, 2005). Thus, by the action of *FUL* and *RPL*, *SHP* activity is restricted to a narrow strip of cells sandwiched between the valve and the replum, where it promotes the expression of *IND* and *ALC*. These two activities, *IND* and *ALC*, are, ultimately, the main factors responsible for the correct differentiation of tissues in the dehiscence zone (Rajani and Sundaresan, 2001; Liljegren *et al.*, 2000, 2004).

Marginal tissue development

Marginal tissues, such as replum, septum, transmitting tract, placentae, style, and stigma, are derived from the medial regions of the gynoecial primordium. Several genes are involved in the specification of these different tissues, as deduced from the phenotypes associated with mutations in these genes. As discussed previously, meristem-associated genes are expressed in these regions, although whether they are required for marginal tissue development or not is largely unknown due to the non-flowering phenotype of most of the corresponding mutants.

No single mutation has been identified so far that completely blocks marginal tissue formation. One of the most severe disruptions corresponds to mutations in the transcriptional co-repressor *LEUNIG* (*LUG*). *lug* mutant gynoecia are partially unfused at the apical end, forming horn-like projections at the top of the valves, and exhibit defects in septum fusion and ovule development. Again, *LUG* activity is not restricted to gynoecium development, but is also involved in leaf blade expansion and the negative regulation of *AG* in the first and second whorls of the flower (Liu and Meyerowitz, 1995; Conner and Liu, 2000; Cnops *et al.*, 2004). Mutations in *ANT*, a further gene involved in leaf blade growth through maintenance of cell proliferation in lateral primordia, cause similar though weaker defects in gynoecium development, and have been also regarded as an *AG* repressor in the outer whorls of

8 of 13 Balanzá et al.

the flower (Krizek *et al.*, 2000). Marginal tissue development is fully dependent on the co-operative activities of ANT and LUG as *ant lug* double mutants completely lack replum, style, septum, and placental tissues (Liu *et al.*, 2000). A third factor appears to contribute also to this pathway. Like *LUG*, *SEUSS (SEU)* encodes a transcriptional co-repressor, and *seu* mutants show similar though weaker defects in gynoecium development as *lug* mutants. LUG and SEU proteins are able to interact physically and they have been proposed to act co-operatively to regulate their targets throughout plant development (Franks *et al.*, 2002; Sridhar *et al.*, 2004). In fact, the double mutant shows severe developmental phenotypes, such as a strong reduction of flower size and plant height, a significant decrease in floral organ numbers and floral organ homeotic transformations. Usually, the fourth whorl organs of the flower fail to develop, but first whorl organs are carpelloid, although aberrant, developing as filamentous organs with no trace of marginal tissues. In addition to *ANT/LUG/SEU*, several lines of evidence point to *YABBY* genes as additional players in this pathway. First, *fil ant* double mutants carpels resemble those of both *ant lug* and *lug seu* mutant combinations (Nole-Wilson and Krizek, 2006). Second, *FIL* also appears to be a negative regulator of AG in the outer whorls of the flower (Chen *et al.*, 1999). Third, the Antirrhinum *LUG* orthologue *STYLOSA* has been shown to interact physically with *YABBY* proteins (Navarro *et al.*, 2004). Finally, a further functional connection has been recently reported: *LUG*, *SEU*, and *ANT* appear to be involved in maintaining abaxial–adaxial polarity by positively regulating *FIL* expression and/or activity (Franks *et al.*, 2006; Nole-Wilson and Krizek, 2006). However, the big question remains as to whether the phenotypes described above could reflect a role for *ANT/LUG/SEU/YAB* in specifying medial tissue identity, or, alternatively, could be the consequence of an arrest of the proliferative capacity of the medial region, unable then to grow and differentiate.

Putative downstream effectors of the *ANT/LUG/SEU/YAB* pathway are the members of the SHI gene family, encoding zinc-finger transcription factors that exhibit an unusual degree of functional redundancy. *STYLISHI (STY1)* is the only one of them that shows subtle defects in style development when knocked out. Mutations in the other nine members of the family do not show phenotypic defects in carpel development or elsewhere, but gradually enhance *sty1* phenotypes when two or more mutations are combined with *sty1* loss of function. Multiple mutants in *sty1* and other SHI-related genes have strongly reduced style and stigmatic tissues, unfused gynoecia in the apical end and incomplete septa. In addition, they exhibit defects in leaf development, such as serrated margins and partial loss of abaxial–adaxial polarity, resembling *lug* mutants and also very similar to those observed in multiple mutants in the *ANT/LUG/SEU/YAB* loci (Fridborg *et al.*, 1999;

Kuusk *et al.*, 2002, 2006). *lug* mutations are epistatic over *sty* phenotypes and, moreover, overexpression of *STY1* is able to rescue *lug* mutant phenotypes, placing *STY/SHI* genes genetically downstream of *LUG*. *35S::STY1* also causes ectopic development of style-like epidermal cells and the proliferation of style-like vascular fans along the valves, may be favouring the idea that *STY1/SHI* genes are involved in the specification of style identity instead of merely controlling cell proliferation. However, these possibilities are not mutually exclusive, since *35S::STY1* plants also have an additional leaf phenotype, with ectopic blades developing at the petioles. *STY/SHI* proteins have been proposed to mediate auxin signalling (see below), hence providing an additional functional link between *STY* and the *ANT/LUG/SEU/YAB* complex, as both *LUG* and *SEU* have been also related to auxin responses (Navarro *et al.*, 2004; Pfluger and Zambryski, 2004).

SPT, which is expressed in medial domains throughout gynoecium development, is another major factor involved in the differentiation of a subset of medial tissues. In *spt* mutants, transmitting tract tissue does not form, and other marginal tissues such as the style, the stigma, and the septum, are reduced (Alvarez and Smyth, 1999). *SPT* has also been proposed to mediate auxin signalling, since chemical inhibition of polar auxin transport restores normal gynoecium development in *spt* mutants (Heisler *et al.*, 2001). In addition, a strong synergistic interaction of *spt* and *sty/shi* mutations has been observed, although in some genetic backgrounds *spt* mutations are epistatic over some *sty/shi* phenotypes, suggesting that they could be involved in the same genetic pathway (Kuusk *et al.*, 2002, 2006). It is important to note that most of the functional characterization of the *SPT* role in carpel development has been derived from the characterization of the *spt-2* mutant allele, which carries a missense mutation in the putative DNA binding domain and had been regarded as the strongest allele. However, in an independent study on the role of *SPT* in the control of cold responses in seed germination it was observed that null alleles for *spt* show subtler gynoecium phenotypes, and that, probably, *spt-2* behaves as a dominant negative allele in carpel development. Interestingly, in this work, the authors also find that *SPT* can work as a repressor of GA3ox expression, which encodes a key enzyme in the GA biosynthetic pathway, although in a very different developmental context (Penfield *et al.*, 2005). While unrelated in scope, this work raises important questions that will have to be addressed in the future, such as the molecular basis of the dominant negative phenotype found in *spt-2* mutants, or a possible role of *SPT* in mediating hormone responses, by regulation of both auxin and gibberellin signalling pathways. Interestingly, *SHI*, one of the members of the *STY1/SHI* family, has been proposed to work as a repressor of GA responses (Fridborg *et al.*, 2001). In contrast to auxin, a role for GA in gynoecium patterning has not

been described, although it is tempting to translate the antagonistic relationship between auxins and GA in the SAM to the 'meristematic' medial domain of the gynoecium, and it could be interesting to explore whether *SPT* and *STY/SHI* genes could work together in promoting auxin responses, while reducing GA signalling, and if this balance could have a role in directing gynoecium medial tissue development.

Apical–basal patterning

As described above, several mutations disrupt normal patterning of the apical tissues of the gynoecium. Since they mainly affect carpel fusion and style/stigma development, the role of the corresponding genes in marginal tissue development has been discussed, but *SPT* and *STY/SHI* genes could also be considered as major factors directing the development of the apical regions of the gynoecium. In addition to *spt* or *sty/shi*, other mutants display an altered distribution of tissues along the apical–basal axis. Mutations in *ETT*, which encodes an Auxin Response Factor, cause severe defects in apical–basal patterning, with increased basal (gynophore) and apical (style/stigma) regions, and strongly reduced ovaries (Sessions *et al.*, 1997; Sessions and Zambryski, 1995). The role of *ETT* in promoting the formation of the ovary is largely mediated through the repression of *SPT* expression in this domain. Thus, *spt* mutations are epistatic to *ett*, suppressing the ectopic development of apical and adaxial tissues observed in *ett* mutants (Heisler *et al.*, 2001). Other mutants affecting auxin transport or signalling such as *pinoid* or *pinformed* also show enlarged apical and basal regions and reduced ovaries (Okada *et al.*, 1991; Bennett *et al.*, 1995). Moreover, chemical inhibition of auxin transport leads to very similar defects and differentially modifies the phenotype of apical–basal mutants, for instance, enhancing *ett* weak mutations or suppressing *spt* phenotypes (Nemhauser *et al.*, 2000). Taking all this evidence together, Nemhauser *et al.* (2000) proposed that the apical–basal patterning is dependent on an auxin gradient spanning the gynoecial primordium. Auxin would be synthesized at the apical end of the gynoecium and transported basally, forming a decreasing gradient. According to this hypothesis, high levels of auxin would induce style and stigma differentiation, intermediate levels would form the ovary, and low levels the basal gynophore. Inhibition of auxin transport in the gynoecium would lead to auxin accumulation in source tissues, hypothesized to be the apical parts, and depletion in the basal regions (Fig. 3B; Nemhauser *et al.*, 2000).

The auxin gradient model provides a nice framework to explain apical–basal patterning in the gynoecium, but we still need to understand the mechanisms of action of the genes involved. A key contribution towards this goal could be the recent finding of Sohlberg *et al.* (2006) which involve *STY1/SHI* genes in the regulation of auxin

synthesis. In this work, the authors identified *YUCCA4*, a gene encoding a key enzyme in the auxin biosynthetic pathway, as a primary target for *STY1* activation. In addition, *STY1* and *STY2* are expressed in the apical region of the developing gynoecium, the proposed auxin source according to the auxin gradient model, and levels of active auxin and auxin metabolites are reduced in *sty/shi* mutant combinations. Additional support for this hypothesis has been found on the functional characterization of *YUCCA4* and related genes throughout plant development. Several *YUCCA* genes are expressed in the apical regions of the developing gynoecium and, when mutated, severe phenotypic defects in carpel morphogenesis are found (Cheng *et al.*, 2006).

Taking all these findings together, we can then speculate on a model that would place *YUCCA*-dependent auxin synthesis directly under the control of *STY/SHI* genes at the apical end of the developing gynoecium. *SPT* could mediate the response to high levels of auxin to direct stigma, style, and transmitting tract differentiation and/or participate in the formation of the auxin gradient by regulation of its polar transport, both alternatives in accordance with the observed suppression of *spt* phenotypes by pooling of auxin in the apical regions caused by chemical inhibition of its transport. *ETT*, in addition to the spatial regulation of *SPT* expression, may respond to intermediate levels of auxin to establish the size of the medial region in the gynoecium where the ovary will develop. *ETT*, a member of the Auxin Response Factor family, is a likely candidate to directly interpret auxin gradients during gynoecium development and translate them into target gene activation/repression. The importance of *ETT* as a possible fine-tuning sensor of auxin morphogenetic inputs is suggested by the tight regulation of *ETT* mRNA and protein levels found throughout floral development: *ETT* is target for ta-siRNA directed degradation, and, in addition, upstream open reading frames are found in *ETT* 5'-transcript leader sequences that have been shown to reduce both mRNA stability and the rate of translation of the downstream major *ETT* ORF. However, little is known about the nature of *ETT* downstream targets, and this should be an important question to address in the near future.

Auxin at the top (or in the middle)

One clear conclusion jumps out from this overview on gynoecium patterning: auxin is related to all the major pathways directing polarity in the gynoecium. However, how auxin signalling is translated into gene regulation and the specific nature of its targets, ultimately directing specific tissue differentiation, is still far from understood. Even the precise pattern of auxin accumulation is not fully resolved, although in the last few years, diverse attempts to visualize the localization and concentration of auxin during gynoecium development have been carried out (Avsian-Kretschmer *et al.*, 2002; Aloni *et al.*, 2003, 2006; Benkova

10 of 13 Balanzá et al.

et al., 2003; Heisler *et al.*, 2005). The use of auxin responsive promoters to drive the expression of reporter genes or auxin tissue immunolocalization with specific monoclonal antibodies are providing useful clues on auxin dynamics throughout development, that will probably be refined in the future with further studies and the aid of new technical innovations. While no other plant hormone has such a prominent role in gynoecium morphogenesis, increasing evidence points to gibberellins and cytokinins as secondary players in the game, further complicating this already intricate picture. Hopefully, the recent identification of many plant hormone receptors and the rapid advances in this field will open ways for us to understand the logic and logistics of gynoecium morphogenetic pathways in the near future.

Making up a nice gynoecium is not easy, even if you start from a really well-designed leaf

It is evident that tremendous progress has been made in unravelling the way in which the *Arabidopsis* gynoecium is patterned. Many players have been identified, and a start has been made on discovery, but the story is not nearly complete. The gap has to be bridged between genetic data that point to interactions between players and the actual molecular mechanisms that underlie these interactions, as well as understanding how morphogenetic cues orchestrate them. As the exploration continues into what is common or specific in the complex genetic pathways directing development of the different types of lateral organs, and the extent of conservation of these pathways in the angiosperms, we continue to face the old challenge: understanding the mystery of life.

Acknowledgements

We thank Francisco Madueño for critical reading of the manuscript and helpful discussions. Our work is supported by research grants BIO2002-01301 and BIO2005-01541 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and GV04B-262 from the Generalitat Valenciana to CF, VB, MN, and MT are supported by doctoral fellowships of the Generalitat Valenciana. We apologize to those whose work we failed to address in this review because of lack of space.

References

Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant Cell* **9**, 841–857.

Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006. Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* **223**, 315–328.

Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI. 2003. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**, 841–853.

Alvarez J, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y. 2006. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate

simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *The Plant Cell* **18**, 1134–1151.

Alvarez J, Smyth D. 1999. *CRABS CLAW* and *SPATULA*, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with *AGAMOUS*. *Development* **126**, 2377–2386.

Avsian-Kretschmer O, Cheng JC, Chen L, Moctezuma E, Sung ZR. 2002. Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during *Arabidopsis* leaf ontogeny. *Plant Physiology* **130**, 199–209.

Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591–602.

Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR. 1995. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **8**, 505–520.

Bhatt AM, Etcchells JP, Canales C, Lagodienko A, Dickinson H. 2004. VAAMANA: a BEL1-like homeodomain protein, interacts with KNOX proteins BP and STM and regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**, 103–111.

Bowman J, Baum S, Eshed Y, Putterill J, Alvarez J. 1999. Molecular genetics of gynoecium development in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology* **45**, 155–205.

Bowman J, Smyth D. 1999. *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix–loop–helix domains. *Development* **126**, 2387–2396.

Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM. 1989. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **1**, 37–52.

Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1–20.

Byrne ME. 2005. Networks in leaf development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 59–66.

Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA. 2000. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967–971.

Byrne ME, Groover AT, Fontana JR, Martienssen RA. 2003. Phyllotactic pattern and stem cell fate are determined by the *Arabidopsis* homeobox gene *BELLRINGER*. *Development* **130**, 3941–3950.

Chen Q, Atkinson A, Otsuga D, Christensen T, Reynolds L, Drews GN. 1999. The *Arabidopsis* *FILAMENTOUS FLOWER* gene is required for flower formation. *Development* **126**, 2715–2726.

Cheng Y, Dai X, Zhao Y. 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin mono-oxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development* **20**, 1790–1799.

Cnops G, Jover-Gil S, Peters JL, Neyt P, De Block S, Robles P, Ponce MR, Gerats T, Micol JL, Van Lijsebettens M. 2004. The *rotunda2* mutants identify a role for the *LEUNIG* gene in vegetative leaf morphogenesis. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1529–1539.

Conner J, Liu Z. 2000. *LEUNIG*, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 12902–12907.

Dinneny JR, Weigel D, Yanofsky MF. 2005. A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4687–4696.

Dinneny JR, Weigel D, Yanofsky MF. 2006. *NUBBIN* and *JAGGED* define stamen and carpel shape in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 1645–1655.

- Dinneny JR, Yadegari R, Fischer RL, Yanofsky MF, Weigel D. 2004. The role of *JAGGED* in shaping lateral organs. *Development* **131**, 1101–1110.
- Dinneny JR, Yanofsky MF. 2005. Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. *BioEssays* **27**, 42–49.
- Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S, Yanofsky MF. 2004. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology* **14**, 1935–1940.
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG. 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Developmental Biology* **215**, 407–419.
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL. 2003. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III *HD-ZIP* and *KANADI* genes. *Current Biology* **13**, 1768–1774.
- Engstrom EM, Izhaki A, Bowman JL. 2004. Promoter bashing, microRNAs, and *Knox* genes. New insights, regulators, and targets-of-regulation in the establishment of lateral organ polarity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 685–694.
- Eshed Y, Baum S, Bowman J. 1999. Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**, 199–209.
- Eshed Y, Baum SF, Perea JV, Bowman JL. 2001. Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Current Biology* **11**, 1251–1260.
- Eshed Y, Izhaki A, Baum SF, Floyd SK, Bowman JL. 2004. Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by *KANADI* and *YABBY* activities. *Development* **131**, 2997–3006.
- Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC. 2006. Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Current Biology* **16**, 939–944.
- Ferrándiz C. 2002. Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2031–2038.
- Ferrándiz C, Liljgren S, Yanofsky M. 2000. *FRUITFULL* negatively regulates the *SHATTERPROOF* genes during *Arabidopsis* fruit development. *Science* **289**, 436–438.
- Ferrándiz C, Pelaz S, Yanofsky MF. 1999. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 321–354.
- Fleming AJ. 2005. The control of leaf development. *New Phytologist* **166**, 9–20.
- Franks RG, Liu Z, Fischer RL. 2006. *SEUSS* and *LEUNIG* regulate cell proliferation, vascular development and organ polarity in *Arabidopsis* petals. *Planta* **224**, 801–811.
- Franks RG, Wang C, Levin JZ, Liu Z. 2002. *SEUSS*, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with *LEUNIG*. *Development* **129**, 253–263.
- Fridborg I, Kuusk S, Moritz T, Sundberg E. 1999. The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *The Plant Cell* **11**, 1019–1032.
- Fridborg I, Kuusk S, Robertson M, Sundberg E. 2001. The *Arabidopsis* protein *SHI* represses gibberellin responses in *Arabidopsis* and barley. *Plant Physiology* **127**, 937–948.
- Frugis G, Giannino D, Mele G, Nicolodi C, Chiappetta A, Bitonti MB, Innocenti AM, Dewitte W, Van Onckelen H, Mariotti D. 2001. Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins. *Plant Physiology* **126**, 1370–1380.
- Green KA, Prigge MJ, Katzman RB, Clark SE. 2005. *CORONA*, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in *Arabidopsis*, regulates stem cell specification and organogenesis. *The Plant Cell* **17**, 691–704.
- Grigg S, Canales C, Hay A, Tsiantis M. 2006. *SERRATE* coordinates shoot meristem function and leaf adaxial patterning in *Arabidopsis*. *Nature* **437**, 1022–1026.
- Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky MF, Martienssen R. 1998. The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**, 1509–1517.
- Ha CM, Kim GT, Kim BC, Jun JH, Soh MS, Ueno Y, Machida Y, Tsukaya H, Nam HG. 2003. The *BLADE-ON-PETIOLE 1* gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 161–172.
- Hake S, Smith HM, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J. 2004. The role of *knox* genes in plant development. *Annual Review of Cell Development Biology* **20**, 125–151.
- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M. 2002. The gibberellin pathway mediates *KNOTTED1*-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology* **12**, 1557–1565.
- Heisler M, Atkinson A, Bylstra Y, Walsh R, Smyth D. 2001. *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* **128**, 1089–1098.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM. 2005. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology* **15**, 1899–1911.
- Hepworth SR, Zhang Y, McKim S, Li X, Haughn GW. 2005. *BLADE-ON-PETIOLE*-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 1434–1448.
- Honma T, Goto K. 2001. Complexes of MADS box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**, 525–529.
- Ishida T, Aida M, Takada S, Tasaka M. 2000. Involvement of *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **41**, 60–67.
- Jack T. 2001. Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends in Plant Science* **6**, 310–316.
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M. 2005. *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by co-ordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology* **15**, 1560–1565.
- Kerstetter R, Bollman K, Taylor A, Bomblies K, Poethig S. 2001. *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* **411**, 706–709.
- Krizek BA, Fletcher JC. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Review Genetics* **6**, 688–698.
- Krizek BA, Prost V, Macias A. 2000. *AINTEGUMENTA* promotes petal identity and acts as a negative regulator of *AGAMOUS*. *The Plant Cell* **12**, 1357–1366.
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Long JA, Fridborg I, Sundberg E. 2002. *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development* **129**, 4707–4717.
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Magnus Eklund D, Sundberg E. 2006. Functionally redundant *SHI* family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. *The Plant Journal* **47**, 99–112.
- Lenhard M, Bohnert A, Jurgens G, Laux T. 2001. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by

12 of 13 Balanzá et al.

- interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**, 805–814.
- Liljegrén S, Ditta G, Eshed Y, Savidge B, Bowman J, Yanofsky M. 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 766–769.
- Liljegrén SJ, Roeder AH, Kempin SA, Gremski K, Ostergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF. 2004. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* **116**, 843–853.
- Liu Z, Franks RG, Klink VP. 2000. Regulation of gynoecium marginal tissue formation by *LEUNIG* and *AINTEGUMENTA*. *The Plant Cell* **12**, 1879–1892.
- Liu Z, Meyerowitz EM. 1995. *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development* **121**, 975–991.
- Lohmann JU, Hong RL, Hobe M, Busch MA, Parcy F, Simon R, Weigel D. 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793–803.
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK. 1996. A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66–69.
- Mandel MA, Yanofsky MF. 1997. The *Arabidopsis* *AGL9* MADS-box gene is expressed in young flower primordia. *Sexual Plant Reproduction* **11**, 22–28.
- McConnell JR, Barton MK. 1998. Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 2935–2942.
- Navarro C, Efremova N, Golz JF, Rubiera R, Kuckenberger M, Castillo R, Tietz O, Saedler H, Schwarz-Sommer Z. 2004. Molecular and genetic interactions between *STYLOSA* and *GRAMINIFOLIA* in the control of *Antirrhinum* vegetative and reproductive development. *Development* **131**, 3649–3659.
- Nemhauser J, Feldman L, Zambryski P. 2000. Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* **127**, 3877–3888.
- Nole-Wilson S, Krizek BA. 2006. *AINTEGUMENTA* contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with *YABBY* genes. *Plant Physiology* **141**, 977–987.
- Norberg M, Holmlund M, Nilsson O. 2005. The *BLADE ON PETIOLE* genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development* **132**, 2203–2213.
- Ohno CK, Reddy GV, Heisler MG, Meyerowitz EM. 2004. The *Arabidopsis* *JAGGED* gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development* **131**, 1111–1122.
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y. 1991. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *The Plant Cell* **3**, 677–684.
- Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL, Hake S. 2000. Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**, 5523–5532.
- Pautot V, Dockx J, Hamant O, Kronenberger J, Grandjean O, Jublot D, Traas J. 2001. *KNAT2*: evidence for a link between knotted-like genes and carpel development. *The Plant Cell* **13**, 1719–1734.
- Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y. 2005. Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of *KANADI* activity. *The Plant Cell* **17**, 2899–2910.
- Pelaz S, Ditta GS, Bauman E, Wisman E, Yanofsky MF. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**, 200–203.
- Pelaz S, Tapia-Lopez R, Alvarez-Buylla ER, Yanofsky MF. 2001. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology* **11**, 182–184.
- Penfield S, Josse EM, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA. 2005. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor *SPATULA*. *Current Biology* **15**, 1998–2006.
- Pfluger J, Zambryski P. 2004. The role of *SEUSS* in auxin response and floral organ patterning. *Development* **131**, 4697–4707.
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegrén SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**, 85–88.
- Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, Ecker JR, Drews GN, Clark SE. 2005. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell* **17**, 61–76.
- Rajani S, Sundaresan V. 2001. The *Arabidopsis* *myc/bHLH* gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* **11**, 1914–1922.
- Reinhardt D. 2005. Phyllotaxis: a new chapter in an old tale about beauty and magic numbers. *Curr Opinions in Plant Biology* **8**, 487–493.
- Reinhardt D, Frenz M, Mandel T, Kuhlemeier C. 2005. Microsurgical and laser ablation analysis of leaf positioning and dorsoventral patterning in tomato. *Development* **132**, 15–26.
- Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C. 2000. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *The Plant Cell* **12**, 507–518.
- Reinhardt D, Pesce E-R, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C. 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255–260.
- Roeder AH, Ferrandiz C, Yanofsky MF. 2003. The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Current Biology* **13**, 1630–1635.
- Roeder AHK, Yanofsky MF. 2005. Fruit development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **52**, 1–50.
- Savidge B, Rounsley SD, Yanofsky MF. 1995. Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *The Plant Cell* **7**, 721–733.
- Sawa S, Watanabe K, Goto K, Liu YG, Shibata D, Kanaya E, Morita EH, Okada K. 1999. *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes and Development* **13**, 1079–1088.
- Scutt CP, Vinauger-Douard M, Fourquin C, Finet C, Dumas C. 2006. An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2143–2152.
- Sessions A, Nemhauser J, McColl A, Roe J, Feldmann K, Zambryski P. 1997. *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**, 4481–4491.
- Sessions RA, Zambryski PC. 1995. *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild type and in *ettin* mutants. *Development* **121**, 1519–1532.
- Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman JL. 1999. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* **126**, 4117–4128.
- Smith HMS, Hake S. 2003. The interaction of two homeobox genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *The Plant Cell* **15**, 1717–1727.
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM. 1990. Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **2**, 755–767.
- Sohlberg JJ, Myrenas M, Kuusk S, Lagercrantz U, Kowalczyk M, Sandberg G, Sundberg E. 2006. *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *The Plant Journal* **47**, 112–123.
- Sridhar VV, Surendrarao A, Gonzalez D, Conlan RS, Liu Z. 2004. Transcriptional repression of target genes by *LEUNIG* and *SEUSS*, two interacting regulatory proteins for *Arabidopsis* flower

- development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**, 11494–11499.
- Tsukaya H.** 2003. Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 57–62.
- Tsukaya H.** 2006. Mechanism of leaf shape determination. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 477–496.
- Waites R, Hudson A.** 1995. *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* **121**, 2143–2154.
- Williams L, Fletcher JC.** 2005. Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 582–586.
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N.** 2005. *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current Biology* **15**, 1566–1571.
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM.** 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35–39.
- Zgurski JM, Sharma R, Bolokoski DA, Schultz EA.** 2005. Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of *asymmetric leaf1* and *asymmetric leaf2* *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell* **17**, 77–91.

