



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA AUXINA QUE SE ACUMULA EN EL
POLEN Y EN EL TAPETUM EN LOS PROCESOS DE ELONGACIÓN DEL
ESTAMBRE Y LA DEHISCENCIA DE LA ANTERA EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al
Grado de **Magíster en Biotecnología**.

Director de Tesis

Dr. Gabriel León

Joselyn Pamela Peña Rojas

Santiago, Chile.

Abril, 2017.



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias Biológicas
Ingeniería en Biotecnología

“EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA AUXINA QUE SE ACUMULA EN EL POLEN Y EN EL TAPETUM DE LOS PROCESOS DE LA ELONGACIÓN DEL ESTAMBRE Y LA DEHISCENCIA DE LA ANTERA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*”

JOSELYN PAMELA PEÑA ROJAS

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Gabriel León, en el laboratorio de Reproducción Sexual de Plantas, Centro de Biotecnología Vegetal, Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dr. Gabriel León
Director de Tesis

Dra. Francisca Blanco
Comisión de Tesis

Dr. Pablo Figueroa
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE
2017

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Reproducción Sexual de Plantas del Centro de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello y fue financiada por el proyecto **FONDECYT** No 1120766.4

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo al Dr. Gabriel León por aceptarme en su laboratorio; asimismo, a todas las personas con las que compartí en este espacio. Agradezco también, muy especialmente, a Daniela Muñoz por su disposición a enseñar, paciencia y buena onda.

Lily y Migue: ustedes saben que por tener el corazón congelado y haber sido criada por lobos no soy muy buena expresando emociones, pero quiero que sepan que valoro profundamente el que hayan compartido esta experiencia conmigo, sobre todo por haber transformado los malos momentos en un *café and some shade*, los quiero.

Por último, a mi familia por el apoyo constante y, sobre todo, por demostrar interés en mis estudios y en lo que estos implican: a mi tía Juani por recibirme en su casa y en su familia; a mi papá, pues sin él nada de esto hubiera sido posible... gracias por el cariño, apoyo y paciencia.

ÍNDICE

Financiamiento	4
Agradecimientos	5
Resumen	8
Abstract	9
Abreviaciones	10
Introducción	11
1. Marco teórico	11
Angiospermas	11
Estambres	12
Polen y Tapetum	14
Auxina	16
Auxina y esterilidad masculina	17
2. Hipótesis	19
3. Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Materiales y métodos	20
1. Materiales	20
1.1 Material biológico	20
1.2 Medios de cultivo	21
1.3 Enzimas	22
1.4 Sistemas comerciales	22
1.5 Otros reactivos y materiales	22
1.6 Plásmidos	23
1.7 Oligonucleótidos	23

1.8 Programas computacionales	24
1.9 Sitios Web	24
2. Métodos	25
2.1 Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2 Condiciones de crecimiento bacteriano	26
2.3 Técnicas de biología molecular	27
2.4 Selección de promotores	34
2.5 Generación de construcciones para la evaluación de los promotores seleccionados mediante uso de un reportero	34
2.6 Generación de construcciones con fusión transcripcional entre los promotores seleccionados y el gen <i>iaaL</i>	35
2.7 Secuenciación de ADN	36
2.8 Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> por el método de inmersión floral	36
2.9 Ensayo cualitativo de la actividad enzimática de GUS	37
2.10 Análisis fenotípicos de las plantas transgénicas generadas	37
Resultados	40
Discusión	53
Conclusiones	71
Proyecciones	72
Bibliografía	73

RESUMEN

En las plantas con flores el órgano reproductor masculino corresponde al estambre. Esta estructura floral está formada por una antera —estructura donde se desarrolla el polen— y un filamento que la sostiene. En *Arabidopsis* el desarrollo del estambre involucra una fase temprana de morfogénesis y una fase tardía que consiste en tres procesos: la elongación del filamento, la maduración del polen y la dehiscencia de la antera, culminando en la liberación del polen maduro. Cualquier interrupción de estos procesos provoca esterilidad masculina y se trata de eventos extremadamente coordinados, en los que la hormona auxina tiene un rol preponderante. Por otro lado, evidencia reciente indica que la ablación específica del tapetum —un tejido que forma parte de la antera— se asocia a esterilidad masculina. La auxina se acumula en el polen, en el tapetum y en el filamento del estambre y la inhibición de su transporte a estas estructuras genera alteraciones en el desarrollo del estambre. Hasta el momento no se ha logrado atribuir ninguno de los procesos de la etapa tardía del desarrollo del estambre a la acumulación de auxina en un tejido en particular. Por esta razón en este trabajo de tesis, se propuso determinar el efecto de la auxina que se acumula en el tapetum en esta etapa. Para esto, se inactivó específicamente, la auxina en este tejido mediante la generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan el gen inactivador de auxina *iaaL* bajo el control de promotores específicos de tapetum. Las líneas transgénicas generadas no presentaron los fenotipos relacionados a problemas de síntesis o percepción de auxina previamente publicados en la literatura. La inactivación de auxina en el tapetum sólo afectó la viabilidad de los granos de polen y consecuentemente generó esterilidad masculina. Estos resultados sugieren que la auxina acumulada en el tapetum no estaría participando en la elongación de los filamentos o dehiscencia de las anteras, pero sí tendría un rol relevante para el desarrollo del polen.

ABSTRACT

In plant with flowers the masculine reproductive organ is the stamen. This structure is form by an anther, place where the pollen grains are developed; and a filament, structure similar to a stem. In *Arabidopsis* the stamen development is divided in two stages, an early stage of morphogenesis and a late stage that consists in three processes: filament elongation, pollen maturation and anther dehiscence, concluding in the release of the mature pollen grains. Interruption of any of these processes results in masculine sterility and they are extremely coordinated events, where auxin plays a preponderant role. On the other hand, recent evidence showed that specific ablation of tapetum —a tissue of the anther — is associated with male sterility. Auxin is accumulated in pollen, tapetum and filament of the stamen; and the inhibition of its transport generates alteration in stamen development. So far no one has been able to attribute any of the processes of the late stamen development to the accumulation of auxin in any particular tissue. For that reason this project aim was determining the effect of the auxin accumulated in tapetum in the late stage. For this auxin was specifically inactivated in this tissue. through the generation of transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* expressing the auxin inactivator gene *iaaL* under the control of tapetum specific promoters. The generated *Arabidopsis* plants didn't showed the same phenotypes to those observed on plants with problems in auxin synthesis or perception previously published. The inactivation of auxin in tapetum seems only to affect the pollen grain viability, and consequently male sterility. This results suggest that auxin accumulation in tapetum might not have a role on filament elongation of anther dehiscence, but it seems to play a relevant part on pollen development.

ABREVIACIONES

ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Col-0	Columbia - 0
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
D.O _{xx} nm	Densidad Óptica a una longitud de onda determinada
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
dNTP's	Desoxinucleótidos 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
IAA	Ácido 3-indol acético
iaaL	Ácido 3-indol acetico lisin sintasa
kb	Kilobases
LB	Luria-Bertani
MS	Murashige-Skoog
NPA	<i>N</i> -1-Naphthylphthalamic Acid
pb	Pares de bases
PBC	Polen Bicelular
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAIR	The Arabidopsis information resource
T-ADN	ADN de transferencia

INTRODUCCIÓN

1. MARCO TEÓRICO

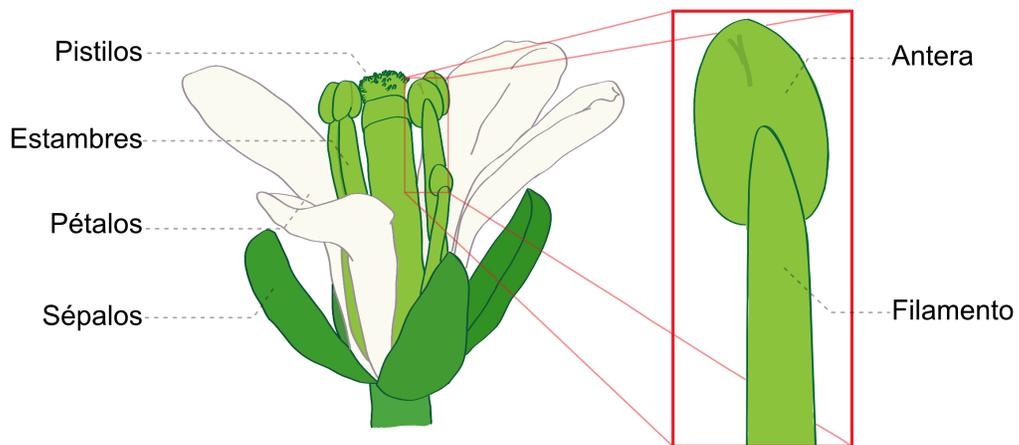
Angiospermas

Las angiospermas son las plantas con flores y comprenden una extraordinaria diversidad de especies, siendo las que dominan la vida terrestre actualmente entre los eucariontes multicelulares. En efecto, estas corresponden a un grupo de entre 250.000 y 400.000 especies diferentes (Scotland y Wortley 2003).

Al contrario de los animales, los que pueden iniciar líneas germinales tan temprano como durante la embriogénesis, las células reproductivas de las plantas se forman tarde durante su desarrollo (Feng y Dickinson, 2010). Las angiospermas se reproducen de manera sexual y los estambres y carpelos son identificados como los órganos reproductivos masculino y femenino respectivamente. Existen especies de Angiospermas completas (o hermafroditas), donde las flores presentan órganos masculinos y femeninos; y angiospermas incompletas en las que las flores sólo presentan órganos masculinos o femeninos. Durante la antesis las flores se abren, preparadas para la fertilización, y su desarrollo culmina con el crecimiento del fruto y su maduración (Smyth y cols., 1990).

Las flores se desarrollan a partir de un grupo de células indiferenciadas que crecen desde los extremos de los brotes del meristema apical (Bowman y cols., 1989). La estructura floral está organizada en órganos posicionados de manera concéntrica (Figura 1.A), consistiendo de sépalos, pétalos, estambres (androceo) y pistilo (gineceo), desde el órgano más externo al más interno. Estos órganos se desarrollan en sincronía dentro de los botones florales hasta la antesis, mediante mecanismos altamente coordinados que son esenciales para la fertilización efectiva y la producción de semillas viables (Robert y cols., 2015).

A



B

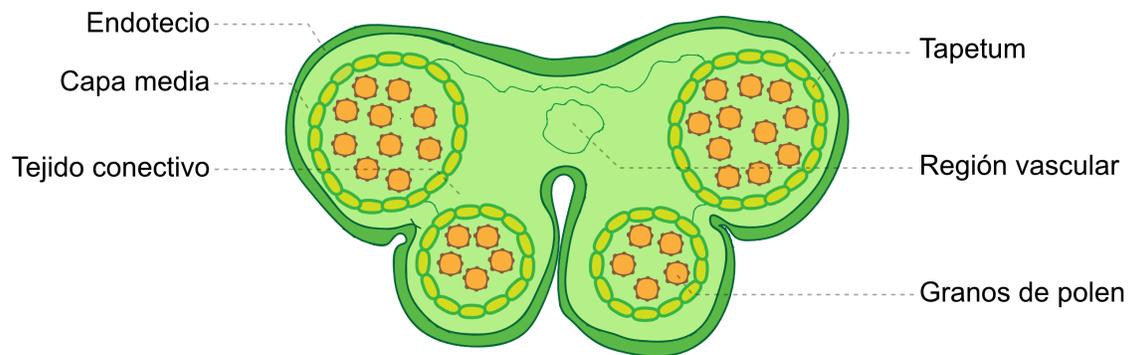


Figura 1: Esquema de la anatomía de una flor.

A. Esquema de una flor de *Arabidopsis thaliana*. B. Esquema de una sección transversal de una antera en etapa floral 10, cuando todos los tejidos son visibles. Etapa floral según Smyth y cols. (1990).

Estambres

Los estambres son la estructura reproductiva masculina (Figura 1.A) y su función es producir los granos de polen —los cuales contienen al gameto masculino— y liberarlos al momento en que la flor se abre para permitir que la planta se reproduzca (Cardarelli y Cecchetti, 2014). El desarrollo del estambre se divide en dos etapas, denominadas etapa temprana y etapa tardía, de las cuales es parte el desarrollo del gameto masculino.

La flor de *Arabidopsis* posee cuatro estambres largos y dos cortos, cada uno de los cuales consiste en dos partes morfológicamente distintas: el filamento y la antera (Figura 1.A). El filamento cumple principalmente dos funciones. Por un lado, sirve como un conducto para el agua y los nutrientes; y por otro lado brinda soporte estructural a la antera (Scott y cols., 2004). La antera contiene el tejido reproductivo y no reproductivo que contribuye a la maduración, protección y liberación de los granos de polen, de manera que el proceso de auto-polinización pueda ocurrir en la flor (Cardarelli y Cecchetti, 2014).

Una sección transversal de la antera madura presenta una forma simétrica bilateral con cuatro lóculos (figura 1.B). Los lóculos están unidos lateralmente a un envoltorio vascular mediante un tejido conectivo continuo a la vasculatura del filamento (Cardarelli y Cecchetti, 2014). Cada uno de los lóculos presenta una estructura compleja que consiste del microesporangio (donde los granos de polen completan su desarrollo), rodeado por cuatro capas de células somáticas: el tapetum, la capa media, el endotecio y la epidermis (Chang y cols., 2011, Chapman, 1987). Entre estos tejidos aquellos que se destacan por su importancia son el microesporocito y el tapetum (Paul y cols., 1992, Turgut y cols., 1994). El microesporocito pasa por meiosis para eventualmente formar los granos de polen.

Polen y Tapetum

Las células que rodean inmediatamente a la microespora (Figura 1.B) —llamadas en su conjunto tapetum— principalmente proveen de nutrientes y componentes estructurales al desarrollo de la microespora (Turgut y cols., 1994). Durante el desarrollo del gametofito masculino los granos de polen son formados luego de dos divisiones mitóticas, consistiendo en las células del tubo vegetativo rodeando dos células espermáticas en especies que generan polen tricelular (McCormik, 2004).

Las etapas del desarrollo del estambre y el gameto masculino se encuentran altamente coordinados. En efecto, el proceso de iniciación y especificación de la antera termina en el mismo momento en que finaliza la meiosis de las microesporas diploides, formando las tétradas de microesporas (Feng y cols., 2006). Durante la fase de maduración del estambre las microesporas son liberadas en los lóculos de la antera (Figura 2), mediante la degradación de la callosa —debido a la secreción de enzimas por el tapetum—, dando paso a la elongación y división celular de los granos de polen en desarrollo (Scott y cols., 2004; Quilichini y cols., 2014).

Durante la dehiscencia de la antera, algunos tejidos específicos —incluyendo el tapetum, el tejido conectivo y el grupo circular de células— son degradados liberando los granos de polen maduros desde el saco de la antera (Figura 2) (Feng y cols., 2006). El tapetum actúa como un tejido secretor y pasa por un proceso de muerte celular programada que comienza cuando el microesporocito se encuentra en el estado de tétrada. De esta forma, el tapetum aporta en la formación de la exina de los granos maduros de polen, degradándose por completo antes de que los granos de polen se encuentran en etapa tricelular. Finalmente, el endotecio se expande y lignifica, mientras el estomio se diferencia y rompe como el evento final de la dehiscencia de la antera (Feng y Dickinson, 2007; Parrish y Li, 2010).

Debido a que la relación entre el tapetum y el tejido esporofítico es directa y coordinada, problemas en su desarrollo, ausencia del tejido mediante ablación específica o problemas con la muerte celular programada, generalmente afectan el

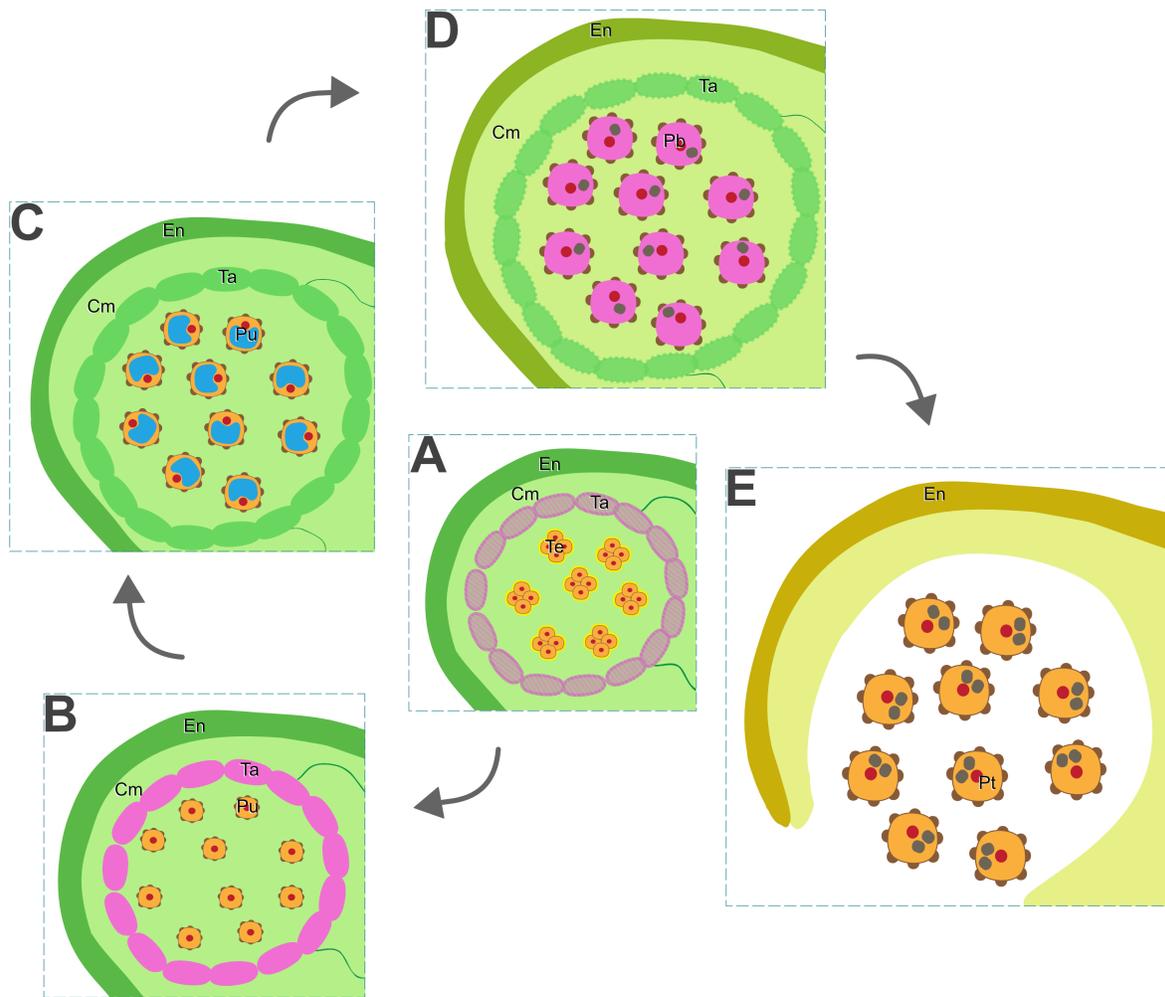


Figura 2: Esquema de los hitos que ocurren durante el desarrollo de la antera. En fucsia se muestra la acumulación de auxina en la antera durante el desarrollo del estambre. A. Las microesporas se encuentra en forma de tetrada. La auxina activa comienza a acumularse principalmente en el tapetum. B. El polen se encuentra en etapa unicelular. Este es momento del pico más alto de auxina activa en la antera. C. El polen se vacuoliza. No es posible detectar grandes cantidades de auxina en ninguno de los tejidos. D. El polen se encuentra en etapa bicelular. Esta es la última etapa donde se puede observar células tapetales. E. Ocurre la dehiscencia, ya no es posible observar celular tapetales, los granos de polen tricolpares son liberados. En, Endotecio; Cm, Capa media; Ta: Tapetum; Te, Tetrada; PU, Polen unicelular; PB, Polen bicelular; PT, Polen tricolpares.

desarrollo del polen y provocan esterilidad masculina (Chapman 1987; Feng y cols., 2006; Turgut, y cols., 1994; Elorriaga y cols., 2014).

Como fue mencionado anteriormente, las etapas del desarrollo del estambre — entre ellas la elongación del filamento y el desarrollo del tejido esporofítico/gametofítico— en conjunto con la muerte celular programada, son eventos muy coordinados donde la hormona auxina es un actor principal (Cecchetti y cols., 2008; Dresselhaus y Schneitz, 2014). Se sabe que la auxina actúa como un regulador del proceso de lignificación, el cual es necesario para que ocurra la dehiscencia y se ha descrito que la aplicación exógena de NPA — que inhibe el transporte polar de la auxina— inhibe la dehiscencia en las anteras en *Arabidopsis* (Cecchetti y cols., 2008).

Auxina

La auxina es una fitohormona predominantemente representada por el ácido indolacético (IAA por sus siglas en inglés) y contribuye a todos los aspectos del desarrollo de las plantas, principalmente mediante su distribución diferenciada en los tejidos. La concentración de auxina controla la expresión de cientos de genes mediante vías mediadas por ubiquitina, basadas en la interacción de dos clases de proteínas: ARFs y Aux/IAA (Cardarelli y Cecchetti, 2014).

La actividad de la hormona está definida clásicamente por su capacidad de estimular la elongación del tallo y también regular el desarrollo de la raíz. Sin embargo, las auxinas también han mostrado ser esenciales para el desarrollo de las plantas mediante diversas respuestas, como la del control de la senescencia, respuesta a patógenos y estrés abiótico. Esta hormona también regula la formación del fruto y abscisión foliar (Sauer y cols., 2013).

Aunque se ha logrado un gran progreso en definir las vías de señalización de IAA, las vías de biosíntesis y regulación de IAA por el ambiente y el desarrollo son poco entendidas. La biosíntesis de auxina en plantas es compleja y se han postulado múltiples vías que contribuyen a ella; sin embargo diferentes especies de plantas

podrían tener estrategias propias para optimizar sus vías metabólicas (Mano y Nemoto, 2012). Los patrones de distribución de auxina en el tejido floral en *Arabidopsis* han sido previamente estudiados con el objetivo de dilucidar su rol en la morfogénesis de la flor (Aloni y cols., 2006).

La distribución diferencial de auxinas sintetizadas es principalmente lograda mediante el sistema de transporte polar de célula a célula (Cardarelli y Cecchetti, 2014), y se ha determinado que las proteínas de la familia PIN son el grupo principal de transportadores de afluencia con una distribución celular polar (Feng y cols., 2006).

En la mayoría de los tejidos las respuestas a auxinas son dependientes de su concentración y distintos tejidos responden de manera diferente a la variación de auxinas exógenas. Altas concentraciones de auxinas podrían ser generalmente inhibitorias. Por esto los niveles endógenos óptimos deben ser controlados de manera muy precisa. Para la regulación de homeostasis de auxinas existen varios mecanismos, como la biosíntesis, degradación, transporte y la formación de conjugados (Ludwig-Müller, 2011).

Auxina y esterilidad masculina

Aloni y cols. (2006) generaron plantas transgénicas que expresaban el gen reportero *uidA* (GUS) bajo el control del promotor sintético DR5 (Ulmasov y cols., 1997), lo que les permitió registrar los sitios donde se concentra la auxina endógena activa en la flor durante su desarrollo. Los niveles más altos de auxina fueron encontrados en los estambres en desarrollo.

La auxina juega un rol crítico en el desarrollo floral de las plantas. En efecto, estudios previos relacionan a la hormona con importantes procesos y se confirma que el transporte polar y la señalización de la auxina participa en la formación y diferenciación de la flor, incluyendo el desarrollo de la antera (Cecchetti y cols., 2008; Dresselhaus y Schneitz, 2014; Aloni y cols., 2006).

Esta hormona se acumula principalmente en las etapas 10-12 del desarrollo floral (Aloni y cols., 2006), —etapas florales según Smyth y cols. (1990)— y se concentra principalmente en el tapetum y en los granos de polen (Figura 2). En algunos estudios se han utilizado promotores tejido-específicos en plantas transgénicas para disminuir la auxina libre en algunos tejidos florales, y se han observado interesantes efectos en el desarrollo de estos (Booker y cols., 2003; Yang y cols., 1997; Zhao y cols., 2001). En efecto, el gen bacteriano *iaaL* codifica para una ácido-indolacético lisina sintasa que conjuga IAA con lisina, inactivando a la hormona. Al posicionar este gen bajo el control de un promotor cuyo patrón de expresión se limita al cilindro vascular del filamento del estambre se obtuvieron líneas transgénicas con filamentos cortos, fenotipo observado tanto en *Arabidopsis thaliana* como en tabaco (Feng y cols., 2006). Adicionalmente, líneas mutantes en genes de percepción de auxina presentan alteraciones en el proceso de dehiscencia (Cecchetti y cols., 2013).

Aún cuando se conocen los patrones de acumulación y posibles patrones de síntesis de auxina, hasta el momento no se ha logrado determinar el rol particular de cada tejido del estambre donde se acumula auxina activa —granos de polen, tapetum y filamento— en los procesos de la etapa tardía del desarrollo del estambre. En el presente trabajo se estudió el efecto de la acumulación de auxina en el tapetum con el propósito de obtener evidencia que ayude a dilucidar la comunicación que existe desde el polen y el tapetum al resto de los tejidos vegetativos. Este trabajo de tesis propone determinar el efecto de reducir la acumulación de auxina en el tapetum en la etapa tardía del desarrollo del estambre de *Arabidopsis thaliana* mediante su desactivación tejido-específica.

2. HIPÓTESIS

La auxina que se acumula en el tapetum y/o polen participa en el desarrollo tardío del estambre.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto sobre el desarrollo del estambre que provoca la inactivación de las auxinas específicamente en el polen y en el tapetum.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Seleccionar promotores específicos de tapetum y polen, y comprobar el patrón de expresión que generan mediante su fusión al gen reportero GUS en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivo 2: Inactivar la auxina en el tapetum y polen de manera específica e identificar posibles alteraciones en los patrones normales de distribución de auxinas en el tejido floral en las plantas que expresan *iaaL* en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivo 3: Identificar posibles alteraciones fenotípicas en la anatomía del tejido floral mediante análisis de microscopía.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Material biológico

1.1.1 Material vegetal

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0, obtenidas desde el *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Ohio State University, Ohio, USA) y *Arabidopsis thaliana* con el fondo genético DR5:GUS.

1.1.2 Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* TOP10: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*, de Invitrogen™.
- *Escherichia coli* DB3.1: *F-, gyrA462, endA1, Δ(sr1-recA), mcrB, mrr, hsdS20(rB-, mB-), supE44, ara14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Smr), xyl5, Δleu mtl1*. Obtenidas del cepario de nuestro laboratorio.
- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90), que forman parte del cepario de nuestro laboratorio.

1.2 Medios de cultivo

1.2.1 Medios de cultivo para plantas

Se utilizaron dos medios para crecer plantas *in vitro* o en medio hidropónico:

1.2.1.1 Medio basal Murashige-Skoog (MS)

El medio de cultivo empleado para crecimiento de plantas *in vitro* se compone de una mezcla comercial de sales (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas y una fuente de carbono. El medio sólido utilizado contenía 4,43 g/L de sales MS, 1% (p/v) de sacarosa y 0,8% (p/v) de agar-agar. Una vez disueltas las sales de MS y la sacarosa, se ajustaba a pH 5,5 – 5,7 con una solución de KOH 1 M. Posteriormente se agregaba el agar-agar para esterilizar en autoclave.

En el caso de los medios de selección, se agregaba Kanamicina con una concentración final de 50 µg/mL o Basta® (glufosinato de amonio) a una concentración final de 30 µg/mL.

1.2.1.2 Medio hidropónico.

Para el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* en cultivo hidropónico, se preparaba inicialmente una solución 100X a pH 5,0 que contenía KNO₃ 125 mM, Ca(NO₃)₂ 150 mM, MgSO₄ 75 mM, KH₂PO₄ 50 mM, KCl 5 mM, H₃BO₃ 5 mM, MnSO₄ 1 mM, ZnSO₄ 200 µM, CuSO₄ 150 µM, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 7,5 µM, Na₂SiO₃ 10 mM, Sprint 330 7,2 mM (Fe quelado en DTPA). Para preparar 1 L de esta solución se disolvían en aproximadamente 0,5 L de agua destilada, con agitación constante y en forma secuencial, todos los componentes del medio, con excepción del Ca(NO₃)₂ y del Na₂SiO₃. El Ca(NO₃)₂ era disuelto por separado en 0,3 L de agua destilada y agregado lentamente a la solución. Se llevaba luego a un volumen aproximado de 0,9 L, se ajustaba a pH 5,0 con KOH 10 M, se agregaba el Na₂SiO₃ y se ajustaba el volumen a 1 L. Para preparar el medio de cultivo hidropónico 1X se agitaba la solución 100X y se diluía con agua destilada, debiendo ser el pH final de 6,0.

1.2.2 Medio de cultivo bacteriano

1.2.2.1 Medio Luria-Bertani (LB)

Medio de cultivo para crecimiento bacteriano. El medio líquido de crecimiento contenía 1% (p/v) de triptona, 0,5% (p/v) de extracto de levadura y 1% (p/v) de cloruro de sodio. En caso de medio sólido, se agregaba 1,5% (p/v) de agar-agar. Luego el medio era esterilizado en autoclave. Para la preparación de medios de selección se agregaba los antibióticos correspondientes a una concentración final de 100 µg/mL para Espectinomicina, 50 µg/mL para Kanamicina, 50 µg/mL para Rifampicina y 100 µg/mL para Gentamicina.

1.3 Enzimas

Las endonucleasas de restricción utilizadas fueron EcoRI, EcoRV, PstI y NotI de Invitrogen™. Además se utilizaron las enzimas Taq DNA polimerasa y DNase I Amplification Grade, de Invitrogen™, PfuUltra® II fusión HS DNA polimerasa de Stratagene y RNasa A libre de DNasa de Fermentas.

1.4 Sistemas comerciales

Se utilizaron los siguientes sistemas comerciales: E.Z.N.A.™ gel Extraction Kit y E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep Kit II de Omega, SUPERSRIPT™ First-Strand synthesis, Gateway® LR Clonase® Enzyme mix de Invitrogen™.

1.5 Otros reactivos y materiales

La agarosa y la solución de carga para DNA 6X se obtuvieron de Winkler. De Invitrogen™ se obtuvieron los set de dNTPs 100 mM, los antibióticos Kanamicina, Espectinomicina, Rifampicina y Gentamicina y los reactivos cloruro de sodio, ácido etildiaminotetracético (EDTA), TRizol y glicerol. Se obtuvieron de Merck los reactivos de medio hidropónico KNO₃, Ca(NO₃)₂, MgSO₄, KH₂PO₄, KCl, H₃BO₃, MnSO₄, CuSO₄, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, Na₂SiO₃ y Sprint 330 (Fe quelado en DTPA), tinciones (verde

de malaquita, fucsina ácida, anaranjado G e hidrato cloral) y los reactivos dodecil sulfato de sodio (SDS), Tris base, cloroformo, etanol y sacarosa. Se obtuvo de Biotium el GelRed nucleic gel stain. Se obtuvieron de New England Biolabs® el marcador de tamaño molecular para DNA de 100 pb y el marcador de tamaño molecular para DNA de 1 kb. Se obtuvieron de MoBiolos reactivos triptona y extracto de levadura. Se obtuvieron de Plant Phytotechnology el Medio basal MS y el agar-agar para plantas. Se obtuvo además la lana de roca de Grodan, Holanda.

1.6 Plásmidos

Los plásmidos utilizados fueron los siguientes: pENTR/D-TOPO® Cloning Kit, y pENTR5'- TOPO® TA Cloning Kit de Invitrogen™ y los plásmidos binarios pKGWFS7 y pB7m24GW,3, vectores de destino del sistema Gateway® desarrollados por el Instituto VIB, Gent, Bélgica.

1.7 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies (IDT).

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)
iaaL_F	CACCATGACTGCCTACGATATGGA	58,3
iaaL_R	TCAGTTTCGGCGGTCGAT	56,7
promA6_F	TCTAACTCTCATTCCCAGTGAA	52,9
promA6_R	GTCTTTGTGTTTGTGTCTGGTTTG	55,1
promXTH3_F	TAAGGGATTTCCGGTTAGGC	51,8
promXTH3_R	GATTTAATTTTTGTTGTAAGGTAC	46,7
promMPS2-F	ATGTCCTACGATCAGAAGG	50,9
MPS2-R	GGGATTTCTCTAACATGTGATA	49,6
MPS2-F2	CACCATGTCCTACGATCAGAAGG	58,7
A9_R	CTATATTGTTTGTACTTCTG	43,1

A9_F	GTGTAGACATTGTAGGTTGG	50,4
A9_F2	CACCGTGTAGACATTGTAGGTTGG	57,4
promXTH3_F2	CACCTAAGGGATTTTCGGTTAGGC	57,5
promA6_F2	CACCTCTAACTCTCATTCCCAGTG	56,7

1.8 Programas computacionales

Para el análisis de secuencias y construcciones se utilizó Serial Cloner 2.6.1 y Vector NTI Advance 10, de Invitrogen™. Para el procesamiento de datos se utilizó Microsoft Excel® 2011. Para los análisis estadísticos y generación de gráficos se utilizó GraphPad Prism 5.0. Para el procesamiento de fotografías se utilizó Affinity Photo 1.4.2. Para el ensamble de figuras y generación de esquemas se utilizó Affinity Designer 1.3.6.

1.9 Sitios Web

Arabidopsis eFP Browser

<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

Macrogene

<http://dna.macrogen.com/english/main/main.jsp>

TAIR, The Arabidopsis information Resource

<http://www.arabidopsis.org/>

NCBI, National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Plant Systems Biology Gateway Vectors

<http://gateway.psb.ugent.be/search>

2. MÉTODOS

2.1 Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*

2.1.1 Crecimiento *in vitro* de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se esterilizaba la superficie de las semillas de *Arabidopsis* en una campana de flujo laminar, lavando aproximadamente 200 μ L de semillas con 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio (25 g de cloro activo por litro) durante 6 minutos, con agitación por vórtex constante. Las semillas se dejaban decantar, se eliminaba la solución de hipoclorito de sodio por aspiración y se lavaban 5 veces con 1 mL de agua estéril por un minuto cada vez. Una vez esterilizadas, las semillas se sembraban en placas de Petri con medio MS sólido, sin antibiótico en el caso de las plantas silvestres Col-0, o suplementado con el antibiótico Kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL o glufosinato de amonio (BASTA) a una concentración final de 30 μ g/mL en el caso de las plantas transgénicas. Las placas sembradas se ubicaban en una cámara de crecimiento con temperatura controlada de 22 – 23 °C y un fotoperíodo controlado de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad durante dos semanas. Posteriormente, las plántulas crecidas *in vitro* eran transferidas al sistema de cultivo hidropónico o tierra.

2.1.2 Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* en medio hidropónico

Para el cultivo hidropónico se utilizaban recipientes plásticos con capacidad de 5 litros pintados de negro por fuera, incluyendo las tapas, a las cuales se les realizaron perforaciones de 3 cm de diámetro dispuestas en 3 columnas de 3 agujeros cada una. En cada uno de ellos se ubicaba un buje de reducción de PVC de 1,8 cm de diámetro interno, que en su interior contenía un cilindro de lana de roca de 2 cm de diámetro y 6 cm de largo. Posteriormente se llenaba cada recipiente con 4,5 L de

medio hidropónico 1X, procurando que cada cilindro de lana de roca quedara en contacto con el medio.

Para el traspaso de cada plántula de *Arabidopsis thaliana*, los cilindros de lana de roca humedecidos con agua destilada se cortaban longitudinalmente por el centro, separando ambas mitades. En el centro de una de las mitades se ubicaba una o dos plántulas de forma que las raíces quedaran estiradas sobre la lana de roca, y los hypocótilos hacia la superficie.

Finalmente, las raíces de la plántula se cubrían con la otra mitad del cilindro de lana de roca, y se disponían al interior del buje de reducción. Los recipientes de cultivo hidropónico se ubicaban en una cámara de crecimiento a 22 – 23 °C con un fotoperíodo controlado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, por aproximadamente 2 meses.

2.1.3 Crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* en tierra

Para el crecimiento en tierra de plantas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaban recipientes plásticos con capacidad de 250 mL blancos. Eran llenados con sustrato comercial Terracult® blue TC10 humedecido, dejando aproximadamente 5 mm sin tierra. Se hacía un agujero en el centro de la tierra y en cada recipiente se transplantaba una plántula dejando las raíces bajo tierra y los hypocótilos en la superficie.

Los recipientes de cultivo en tierra se ubicaban en una cámara de crecimiento a 22 – 23 °C con un fotoperíodo controlado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, por aproximadamente 2 meses. Las plantas eran regadas cada 48 horas.

2.2 Condiciones de crecimiento bacteriano

Las cepas de *E. coli* TOP10 se crecían a 37 °C con agitación constante a 200 rpm por 16 horas en medio LB líquido, o a 37 °C sin agitación durante 16 horas, en

medio LB-agar. En ambos casos en presencia de los antibióticos de selección correspondientes.

La cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) se crecía a 28 °C con agitación constante a 200 rpm por 48 horas en medio LB líquido o a 28 °C sin agitación en medio LB-agar por 48 horas, en presencia de los antibióticos Rifampicina (50 µg/mL, resistencia codificada en el genoma de la bacteria), Gentamicina (100 µg/mL resistencia codificada en el plásmido Ti) y los respectivos antibióticos de selección.

2.3 Técnicas de biología molecular

2.3.1 Preparación de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* (TNE/SDS)

Un cotiledón de cada plántula a analizar se homogenizaba en presencia de 100 µL de solución de extracción TNE/SDS (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; NaCl 250 mM, EDTA 20 mM y SDS 0,5% [p/v]), utilizando un vástago metálico adaptado a un taladro portátil Dremel™ modelo Minimate 762, por 5 segundos a velocidad alta (12.000 rpm).

El homogenizado obtenido se centrifugaba a 10.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminaba el sobrenadante. El ADN se precipitaba con 100 µL de isopropanol y era centrifugado nuevamente a 10.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminaba el sobrenadante. El sedimento se lavaba con 500 µL de etanol 70% (v/v) y luego se centrifugaba a 10.000 g por 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez seco el sedimento, se resuspendía el ADN en 20 µL de agua libre de nucleasas y se guardaba a -20 °C hasta su utilización.

2.3.2 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

Para la amplificación de fragmentos de ADN se emplearon las siguientes enzimas: *Taq* ADN polimerasa, de Invitrogen™ para controles de clonación y la enzima PfuUltra® II fusión HS DNA polimerasa, de Stratagene, para la obtención de

fragmentos de ADN correspondientes a los promotores. Para todos los casos se seguían las indicaciones del fabricante.

Las reacciones de PCR de colonias se realizaban en un volumen final de 12 μ L con la enzima *Taq* DNA polimerasa de Invitrogen™, modificando los parámetros especificados por el fabricante y utilizando como molde una pequeña parte de cada colonia que se picaba con una punta blanca estéril y era resuspendida en un tubo de PCR que contenía la mezcla de reacción.

Los programas de PCR consistían en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 – 98 °C, seguido de 25-40 ciclos con una etapa inicial de desnaturalización de 30 segundos a 94 – 98°C, una etapa de hibridación de 5 – 30 segundos a 48 – 65 °C, y una etapa de extensión de 30 – 180 segundos a 68 o 72 °C (dependiendo de la enzima a utilizar). Posteriormente se realizaba una etapa de extensión final durante 10 minutos a 68 o 72 °C y las muestras se mantenían a 4 °C hasta su utilización. Posteriormente los productos de PCR obtenidos se analizaban en geles de agarosa.

2.3.3 Purificación de ADN plasmidial a partir de cultivos bacterianos

Se crecían las cepas de *E. coli* en 5 mL de medio LB líquido en presencia de los antibióticos correspondientes (Kanamicina 50 μ g/mL o Espectinomicina 100 μ g/mL), a 37 °C con agitación constante. La extracción del ADN se realizaba utilizando el sistema comercial E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit II de Omega, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se guardaba a -20 °C hasta su utilización.

2.3.4 Digestión de ADN plasmidial con enzimas de restricción

Los análisis de restricción se realizaban con 0,5 – 1 μ g de DNA y 5 – 20 U de enzima por reacción, a 37 °C durante 1 – 4 horas, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.3.5 Electroforesis de ADN geles de agarosa

Se prepararon los geles de agarosa 1 - 2% (p/v) en solución TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) y se agregaba 5 µl de GelRed 10.000X por cada 100 ml de gel. La electroforesis se realizaba a un voltaje constante de 100 V (50 mA) por 45 - 60 minutos en presencia de TAE 1X, utilizando los marcadores de tamaño molecular 100 pb ó 1 kb de New England Biolabs®. Finalmente, los fragmentos de ADN, se visualizaban en un transiluminador UV.

2.3.6 Purificación de productos de PCR desde geles de agarosa

La purificación del producto de PCR desde geles de agarosa se realizaba con el sistema comercial E.Z.N.A® Gel Extraction Kit, de Omega, según las recomendaciones del proveedor, que permite obtener hasta un 80% de rendimiento.

2.3.7 Ligación de productos obtenidos por PCR en los vectores pENTR™/D-TOPO® y pENTR™ 5'/ TOPO®

La reacción de ligación en los vectores pENTR™/D-TOPO®, o pENTR™ 5'/ TOPO® se realizaba en base a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se incubaba el producto de PCR con el vector comercial, en una razón molar de 1:1 en solución salina y a temperatura ambiente. La incubación se realizaba durante 10 – 30 minutos, dependiendo del tamaño del producto, en un volumen final de 6 µL (Figuras 3 y 4).

2.3.8 Reacción de recombinación LR del sistema Gateway™

En el caso de las recombinaciones simples, se incubaban 100 ng del vector de entrada (pENTR™/D-TOPO®/promotor y 150 ng del vector de destino (pKGWFS7), por 1 - 8 horas a temperatura ambiente, en solución TE pH 8,0. La recombinación se realizaba utilizando el kit “LR Clonase™ II enzyme mix”, de Invitrogen™ y la reacción

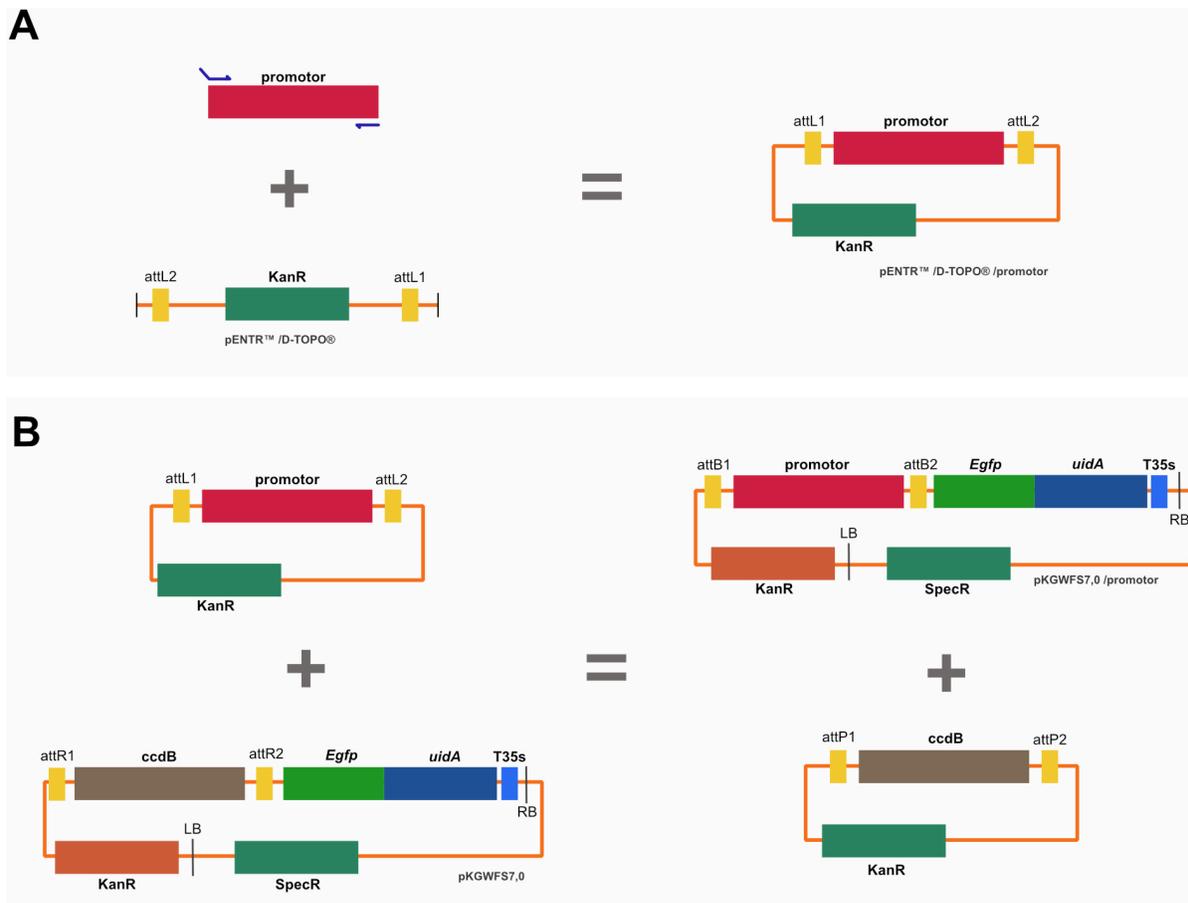


Figura 3: Esquema de la generación de construcciones con fusión transcripcional de los promotores con genes reporteros, mediante el sistema Gateway®.

A. Generación del vector de entrada con el producto de PCR de los promotores amplificado con oligonucleótidos específicos. El oligonucleótido sentido contiene la secuencia CACC en su extremo 5', complementaria a la secuencia GGTG del vector lineal pENTR™/D-TOPO®. Se genera la construcción pENTR™/D-TOPO®/promotor. B. Recombinación entre los sitios attL1 y attL2 presentes en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®/Promotor y los sitios attR1 y attR2 presentes en el vector de destino pKGWFS7; permitiendo la generación del vector de destino pKGWFS7/promotor. Kan(R), gen que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II que otorga resistencia al antibiótico Kanamicina. *Egfp*, gen que codifica para la proteína fluorescente verde. *ccdB*, gen que codifica para una proteína que se une de manera selectiva a la ADN girasa, impidiendo la replicación del ADN. *uidA*, gen que codifica para la enzima β-Glucuronidasa. T35S, terminador 35S. Sp/Sm (R), corresponde al gen *aadA*, que otorga resistencia a Espectinomicina y estreptomicina. Cm (R), gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa y que otorga resistencia al antibiótico cloranfenicol. LB y RB "left border" y "right border" del T-DNA, respectivamente.

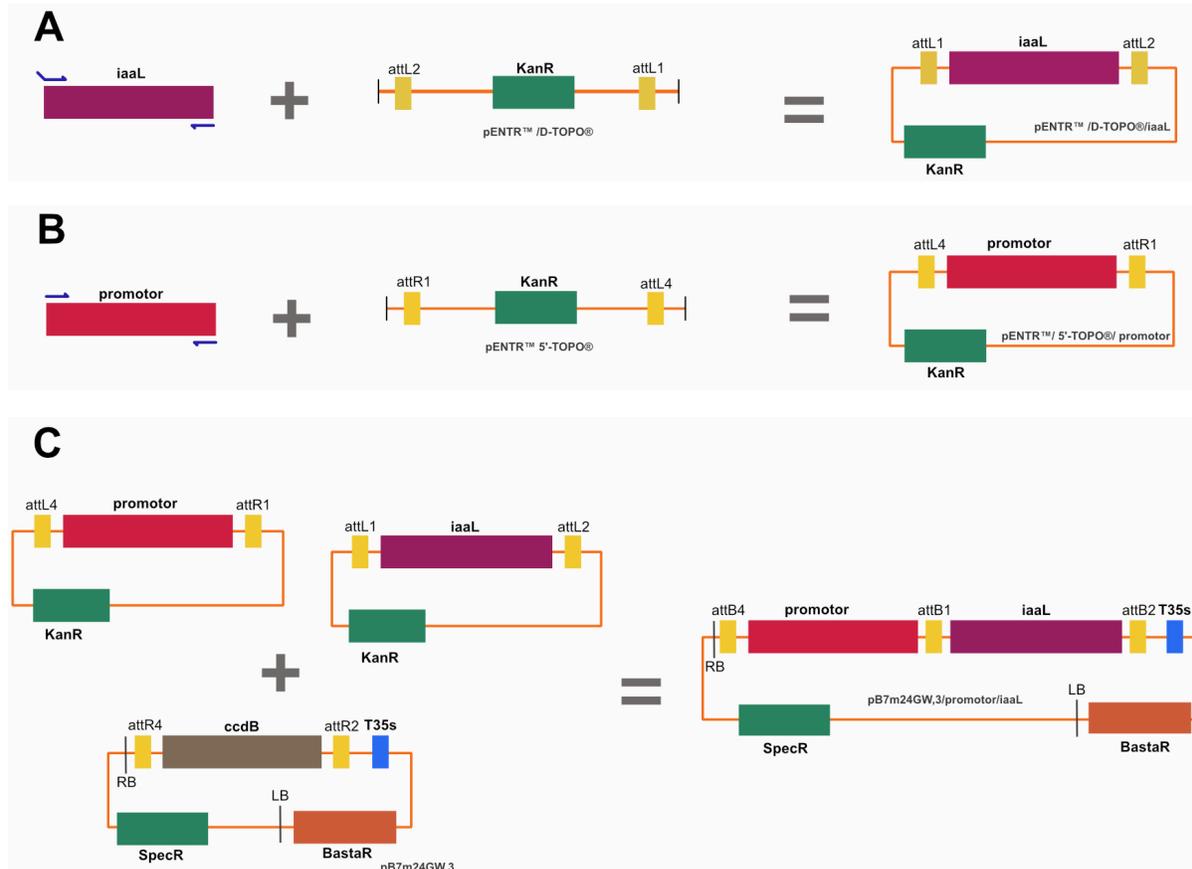


Figura 4: Esquema de la generación de construcciones con fusión transcripcional de promotores con el gen *iaaL*, mediante el sistema Gateway®.

A-B. Generación de los vectores de entrada. A. El producto de PCR de la región codificante del gen *iaaL* fue ligado al vector pENTR™/D-TOPO®. B. El producto de PCR de los promotores amplificado con oligonucleótidos específicos fue ligado al vector pENTR™ 5'/TOPO®. C. Recombinación entre los sitios attR1 y attL4 presentes en el vector de entrada pENTR™ 5'/TOPO®/ promotor, los sitios attL1 y attL2 presentes en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®/*iaaL* y los sitios attR2 y attR4 del vector de destino pB7m24GW,3; permitiendo la generación del vector de destino pK7/promotor/*iaaL*. Kan (R), gen que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II que otorga resistencia al antibiótico Kanamicina. *ccdB*, gen que codifica para una proteína que se une de manera selectiva a la ADN girasa, impidiendo la replicación del ADN. T35S, terminador 35S. Sp/Sm(R), corresponde al gen *aadA*, que otorga resistencia a Espectinomicina y estreptomicina. Cm(R), gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa y que otorga resistencia al antibiótico cloranfenicol. LB y RB “left border” y “right border” del T-ADN, respectivamente.

de finalizaba incubando con 2 μ L de Proteinasa K, de Invitrogen™, durante 10 minutos a 37 °C (Figura 3).

En el caso de las recombinaciones múltiples, se incubaban 100 ng de cada vector de entrada (pENTR™ 5'/TOPO®/promotores y pENTR™/D-TOPO®/iaaL) y 150 ng del vector de destino (pB7m24GW,3) por 16 horas a temperatura ambiente. La recombinación se realizaba utilizando el kit LR Clonase™ II Plus enzyme mix, de Invitrogen™, y la reacción se finalizaba incubando con 2 μ L de Proteinasa K, de Invitrogen™, durante 10 minutos a 37 °C (Figura 4).

Posteriormente se utilizaban 3 μ L de las reacciones de recombinación para transformar 100 μ L de células de *E. coli* competentes.

2.3.9 Preparación y transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Se realizaba un pre-inóculo de 5 mL de LB con 10 μ L del stock de glicerol de células competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen™) (comerciales o propagadas), que se dejaba crecer a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, se inoculaban 100 mL de medio LB con 1 mL del pre-cultivo y se dejaba crecer a 37 °C hasta obtener una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0,4 – 0,6. Una vez alcanzada la D.O. necesaria, se incubaba el cultivo en hielo por 10 minutos, para posteriormente recolectar las bacterias por centrifugación durante 10 minutos a 4 °C a una velocidad de 1.000 g. El sedimento se resuspendía en 25 ml de una solución de MgCl₂ 0,1 M estéril y fría y se incubaba en hielo nuevamente por 5 minutos.

Se centrifugaba nuevamente a 2.000 g por 10 minutos a 4 °C y se resuspendía el sedimento en 2 ml de una solución 85% (v/v) CaCl₂ 0,1 M, 15% glicerol. Las bacterias se guardaban a -80 °C en alícuotas de 100 μ l cada una.

La transformación se realizaba por el método de golpe de calor, incubando 2 – 5 μ L de la reacción de ligación con 100 μ L de células competentes en hielo durante 25 minutos y posteriormente a 42 °C por 30 segundos. Las bacterias crecían en 1 mL de

medio LB sin antibióticos a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se recolectaban las células por centrifugación a 2.000 g por 5 minutos, y se sembraba en medio LB-agar con los antibióticos correspondientes. Las colonias resistentes al antibiótico se analizaban por PCR.

2.3.10 Preparación y transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Se inoculaba un pre-cultivo de 2 mL de medio LB suplementado con Rifampicina 50 (µg/ml) y Gentamicina (100 µg/ml), 5 µL de un stock de glicerol almacenado a -80 °C de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90). El cultivo se dejaba crecer a 28 °C con agitación constante durante 18 horas. Posteriormente, se inoculaban 50 ml de medio LB suplementado con Rifampicina (50 µg/ml) y Gentamicina (100 µg/ml) con 2 ml del precultivo y se dejaba crecer hasta obtener una D.O₆₀₀ de 0,5 – 1,0 (durante 3 o 4 horas, aproximadamente). Se dejaba enfriar el cultivo en hielo por 5 minutos y se recolectaban las bacterias por centrifugación a 3.000 g por 5 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante. El sedimento se resuspendía nuevamente en 10 ml de una solución de CaCl₂ 20 mM estéril y fría, y se centrifugaba nuevamente. Finalmente, el sedimento se resuspendía en 1 mL de la misma solución y se alicuotaban las células en fracciones de 100 µL. Las bacterias se congelaron en N₂ líquido para luego ser guardadas a -80 °C hasta su utilización.

La transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* se realizaba mezclando 100 µL de células competentes (sin descongelar), con 1 µg de DNA plasmidial. Esta mezcla se congelaba en N₂ líquido y se dejaba descongelar a 37 °C por 5 minutos en un baño termorregulado. Posteriormente, la mezcla de transformación era crecida en 1 mL de medio LB, a 28 °C con agitación constante, por 2 – 4 horas. Posteriormente se recolectaban las células por centrifugación a 2.000 g por 5 minutos y se sembraba en medio LB-agar con los antibióticos correspondientes para la selección de transformantes.

2.4 Selección de promotores

Para la selección de los promotores utilizados se realizó una búsqueda en publicaciones previas donde describieran o utilizaran promotores que cumplieran tres criterios mínimos: que sea un promotor de *Arabidopsis thaliana*; que su actividad haya sido caracterizada en la misma especie; y patrón de expresión exclusivo de tapetum o de tapetum y polen. La Región promotora a clonar fue también extraída de dichas publicaciones.

2.5 Generación de construcciones para la evaluación de los promotores seleccionados mediante uso de un reportero

El gen *uidA* que codifica la enzima β -glucuronidasa es un reportero ampliamente utilizado en el seguimiento de la expresión génica, particularmente en el estudio de promotores. Además no exhibe actividad endógenas en las plantas (Porto y cols., 2014), por estas razones se utilizó para la verificación de la tejido-especificidad de los promotores seleccionados mediante la fusión del gen reportero *uidA* (GUS) a estas secuencias. El vector del sistema Gateway® pKGWFS7 fue utilizado como vector de destino ya que contiene las secuencias que codifican para el reportero GUS (Karimi y cols., 2005).

Para generar las construcciones necesarias, los promotores seleccionados fueron amplificados mediante PCR a partir de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* extraído utilizando el método CTAB (Chen y Ronald, 1999) utilizando oligonucleotidos diseñados según la información bibliográfica y sintetizados en Integrated DNA Technologies (IDT). Las secuencias amplificadas fueron purificadas desde el gel de agarosa y ligados al vector pENTR™/D-TOPO®. Finalmente se realizó la reacción de recombinación simple del Sistema Gateway® según las indicaciones del fabricante utilizando pKGWFS7 como vector de destino y se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10, seleccionando en medio con Kanamicina (Figura 3). Las colonias seleccionadas eran comprobadas por PCR amplificando una región correspondiente

al inserto y al vector. Los clones positivos eran inoculados en medio LB líquido suplementado con Kanamicina para posterior extracción de ADN plasmidial. Luego, utilizando el ADN plasmidial puro, eran verificados por ensayos de digestión enzimática utilizando diferentes enzimas de restricción. Posteriormente los clones positivos se enviaban a secuenciar. Las construcciones realizadas, se denominaron de manera generica pKGWFS7/promotor.

2.6 Generación de construcciones con fusión transcripcional entre los promotores seleccionados y el gen *iaaL*

Para generar las construcciones en las que el gen *iaaL* se encuentre bajo el control de los promotores seleccionados se utilizó el sistema Gateway® *multisite*. Las secuencias promotoras fueron ligadas en el vector pENTR™ 5'-TOPO® y se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 en medio LB suplementado con Kanamicina, las colonias resistentes eran comprobadas mediante PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean el sitio de múltiple clonamiento. Luego de ser purificados, estos vectores fueron confirmados mediante PCR, digestión y posterior secuenciación para descartar la presencia de mutaciones.

Aquellos clones positivos por secuenciación (sin mutaciones y clonados de manera direccional) fueron utilizados para los ensayos de recombinación. Por otro lado, se utilizó como segundo vector de entrada los vectores pENTR/D-TOPO/*iaaL* generados de la misma manera.

La recombinación *multisite* (Figura 4) fue realizada utilizando el vector de destino pB7m24GW,3 junto con los vectores de entrada generados pENTR™ 5'/TOPO®/promotor y pENTR™/D-TOPO®/*iaaL*. Una vez realizada la recombinación, se transformaban células competentes de *E. coli* TOP10 seleccionando en medios con Espectinomicina. Las colonias seleccionadas eran comprobadas por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la región recombinada y por ensayos de digestión enzimática utilizando enzimas de restricción. Las construcciones realizadas se denominaron pB7m24GW,3/promotor/*iaaL*.

2.7 Secuenciación de ADN

Las construcciones generadas fueron secuenciadas en el centro de secuenciación *Macrogen Online Sequencing System*, Corea.

2.8 Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión floral

Las construcciones realizadas para el análisis de expresión mediante uso de un reportero de los promotores seleccionados y para generar la fusión transcripcional de los promotores con el gen *iaaL* se utilizaron para transformar células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Las colonias obtenidas luego de la transformación eran comprobadas por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar regiones de los vectores de expresión que incluyeran el promotor seleccionado o el gen *iaaL*.

Para la transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998), las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con los vectores de silenciamiento generados que dieron positivas a PCR, fueron inoculadas en 2 mL de medio de cultivo LB suplementado con Rifampicina (50 µg/mL), Gentamicina (100 µg/mL) y Espectinomicina (100 µg/mL).

Los cultivos se crecieron a 28 °C con agitación constante por 48 horas. Utilizando 1 mL de los cultivos saturados, se inoculaban 200 mL de medio de cultivo LB suplementado con los antibióticos correspondientes y se dejaban crecer a 28 °C con agitación constante durante 24 horas. Las bacterias se recolectaban por centrifugación a 5.000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente, y el sedimento se resuspendía en 300 mL de medio de transformación (sacarosa 5% [p/v], Silwet-L77 0,05% [v/v]) a una D.O.₆₀₀ aproximada de 0,8. Los 300 mL de suspensión se traspararon a un frasco de boca ancha con un agitador magnético en el fondo del frasco, para asegurar la homogeneidad de la solución.

Previo a la transformación, plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 de dos meses de edad crecidas en medio hidropónico, se le cortaban todas las flores abiertas y silicuas. Posteriormente se sumergían en la suspensión bacteriana hasta la roseta durante 15 – 45 segundos con agitación constante. Las plantas de *Arabidopsis* transformadas se dejaban crecer en medio hidropónico y se recolectaron las semillas correspondientes a la generación T₁.

2.9 Ensayo cualitativo de la actividad enzimática de GUS.

Los tejidos a analizar se incubaban en 0,5 - 1 mL de solución X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucurónico 2,5 mM, fosfato de sodio 100 mM, ferricianuro de potasio 0,5 mM, ferrocianuro de potasio 0,5 mM, EDTA 10 mM, Tritón X-100 0,3% [v/v], metanol 10% [v/v]) a 37 °C durante 16 horas. Posteriormente los tejidos eran incubados con etanol al 70% hasta extraer completamente la clorofila para luego ser observados en la lupa estereoscópica Olympus SZX7.

2.10 Análisis fenotípicos de las plantas transgénicas generadas

2.10.1 Análisis macroscópico de las plantas y flores transgénicas promotor

Se compararon las plantas transgénicas generadas con plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 con el fondo genético DR5:GUS utilizadas como control y se tomaron fotografías tanto de las plantas completas como de las flores con una cámara Canon EOS Rebel SL1 lente 18-55 mm IS STM.

2.10.2 Análisis de viabilidad del polen en plantas transgénicas promotor:*iaaL* de *Arabidopsis thaliana*

La viabilidad del polen maduro de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se analizó utilizando la tinción de Alexander (Alexander, 1969), la cual

contiene 1 mL de etanol 95% (v/v); 500 µL de una solución al 1% (p/v) de verde malaquita en etanol 95% (v/v); 500 µL de una solución al 1% (p/v) de fucsina ácida en agua destilada; 50 µL de una solución al 1% (p/v) de anaranjado G en agua destilada; 500 µg de fenol sólido; 200 µL de ácido acético glacial; 2,5 mL de glicerol y 5 mL de agua destilada.

Para preparar las muestras de polen, se extraían cuidadosamente las anteras de las flores sobre un portaobjetos. Para esto se usaba una lupa estereoscópica Olympus SZX7 y dos pinzas punta fina. Sobre las anteras se agregaban 20 µL de una dilución 1:20 de la tinción de Alexander en agua, se cubría la preparación con un cubreobjetos y se incubaba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se analizaba la muestra en campo claro utilizando un microscopio óptico Leica DM500 y se fotografiaban utilizando una cámara Canon EOS Rebel SL1 lente 18-55 mm IS STM.

La tinción de Alexander tiñe el citoplasma del polen viable de color rosado y la cubierta compuesta por exina de color verde. Los granos de polen muertos no presentan citoplasma, por lo que solo se ven de color verde.

2.10.3 Análisis del número de anteras por flor en plantas transgénicas promotor:*iaaL* de *Arabidopsis thaliana*

Para preparar las flores completas, se fijaban las flores utilizando 200 µL de una solución de etanol-ácido acético (3:1) por un tiempo mínimo de 48 horas. Las flores fijadas eran luego posicionadas en un portaobjetos. Sobre las flores se agregaban 40 µL de una dilución 1:20 de la tinción de Alexander en agua, se cubría la preparación con un cubreobjetos y se incubaba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se analizaba la muestra utilizando una lupa estereoscópica Olympus SZX7 y se fotografiaban utilizando una cámara Canon EOS Rebel SL1 lente 18-55 mm IS STM. Ya que la tinción de Alexander tiñe solo los granos de polen nos permite ver las anteras de la flor aún sin abrirla.

2.10.4 Análisis de los frutos y de la producción de semillas de las plantas transgénicas

Para el análisis de producción de semillas, al menos diez frutos consecutivos y maduros fueron recolectados de las plantas transgénicas para ser desteñidos en una solución de etanol 70% (v/v). Las plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 con el fondo genético DR5:GUS fueron utilizadas como control. Fotografías de frutos representativos de cada línea fueron tomadas, las semillas contenidas en cada fruto fueron contados bajo una lupa estereoscópica y los gráficos junto con el análisis estadístico fue realizado con el programa Graphpad Prism® Versión 5.0a.

RESULTADOS

Selección de promotores específicos de tapetum y polen y comprobación del patrón de expresión mediante su fusión al gen reportero GUS

Para seleccionar los promotores —y debido a que no existen bases de datos transcriptómicos de tapetum de *Arabidopsis* — se realizó una búsqueda en publicaciones de promotores que cumplieran los tres criterios de selección establecidos previamente. Estos criterios fueron: que su actividad se encuentre previamente caracterizada en *Arabidopsis thaliana*; que su expresión sea exclusiva del tejido en estudio; y que el promotor sea originalmente de *Arabidopsis thaliana*.

Se seleccionaron cuatro promotores que cumplen con los criterios establecidos. De estos, tres promotores son específicos de tapetum —promA6, promA9 y promXTH3— y un promotor es específico de polen y tapetum, promMPS2 (Figura 5).

El promotor promA6 tiene un tamaño de 900 pb y en *Arabidopsis thaliana* regula la expresión del gen At4g14080. El promotor promA9 tiene un tamaño de 954 pb y en *Arabidopsis thaliana* regula la expresión del gen At5g07230. Ambos son promotores exclusivos de tapetum y presentan un patrón de expresión similar (Figura 6). El promotor promXTH3 tiene un tamaño de 424 pb y en *Arabidopsis thaliana* regula la expresión del gen AT3G25050, siendo también exclusivo de tapetum. El promotor promMPS2 tiene un tamaño de 1.011 pb y en *Arabidopsis thaliana* regula la expresión del gen At5g46795. Este último a diferencia de los otros tres promotores, presenta actividad en polen y tapetum.

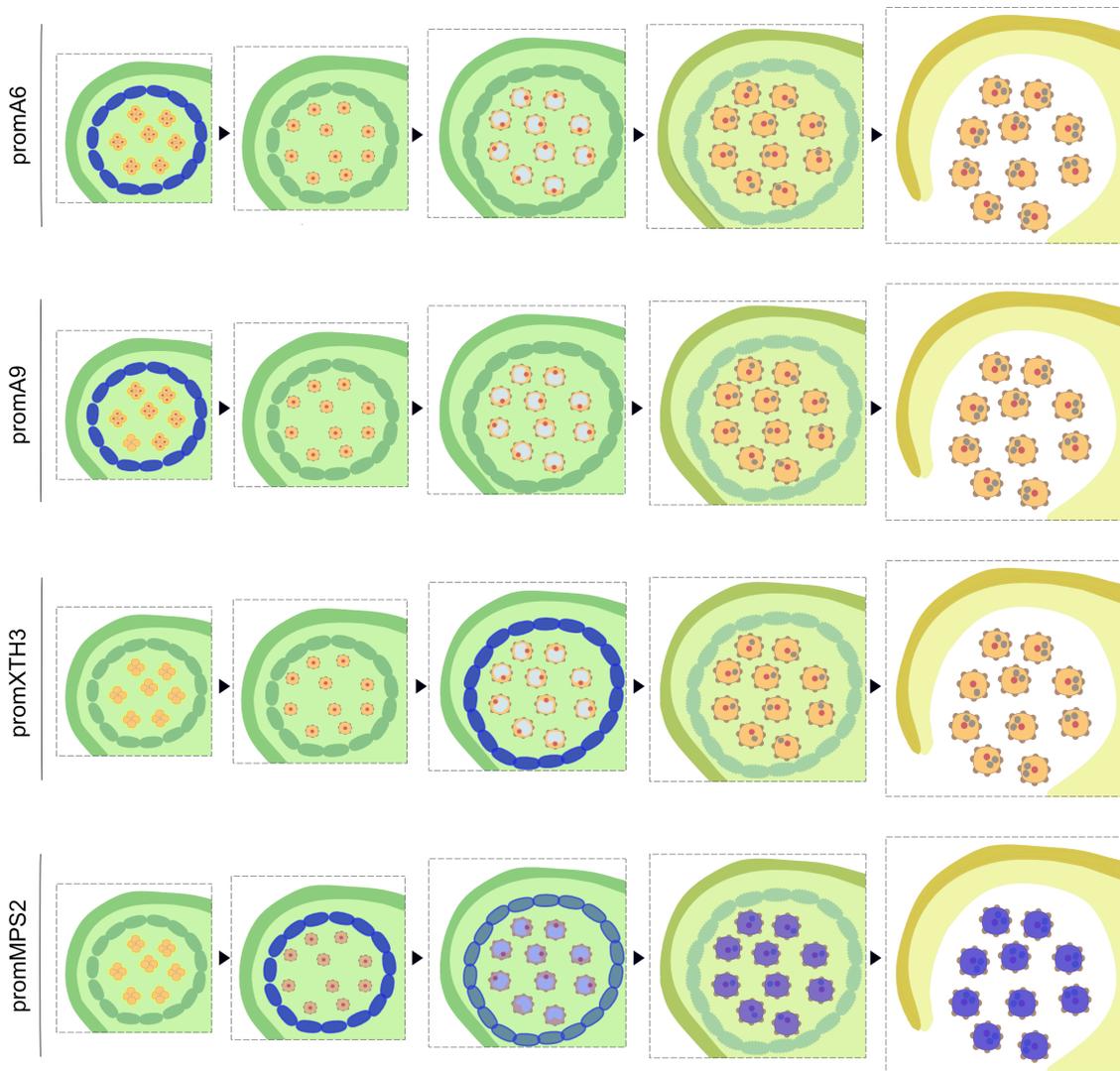


Figura 5: Esquema de patrones de actividad promotora.

Patrones de actividad promotora durante el desarrollo tardío del estambre en uno de los loculos de antera. En azul se presentan los patrones de tinción GUS en líneas transgénicas de los promotores sobre el control del gen *uidA* de acuerdo a publicaciones previas. Fuentes: Hird y cols., 1993, Scott y cols., 1991, Ariizumi y cols., 2002, Honys y cols., 2006, Konagaya y cols., 2008.

Utilizando las bases de datos del Arabidopsis eFP Browser se confirmó que la actividad de los promotores se limita a la antera entre las etapas florales 9 y 12, y solo promMPS2 parece encontrarse activo en el polen, principalmente en la microespora uninucleada (Figura 6). Lamentablemente al momento de esta investigación no se encontró una base de datos que contara con información transcriptómica de tapetum que permitiera confirmar que la actividad de los promotores es específica de tapetum.

Los vectores de entrada de cada promotor se generaron mediante la extracción de ADN de *Arabidopsis thaliana*, reacción de PCR y posterior purificación del producto obtenido (Figura 7.A), luego se realizó la ligación con el vector pENTR™ /D-TOPO® y transformación de bacterias *Escherichia coli* competentes con el vector de entrada generado, la transformación fue confirmada mediante PCR a la secuencia promotora (Figura 7.B). De las colonias positivas se seleccionó una a la cual se le realizó una extracción plasmidial y se digirió con enzima de restricción (Figura 7.C), las digestiones confirmadas con el patrón predicho por el programa SerialCloner 2.6.1® fueron enviadas a secuenciar. Los vectores cuyos promotores fueron clonados en la dirección correcta y sin mutaciones se utilizaron como vectores de entrada pENTR™/D-TOPO®/promA6, pENTR™/D-TOPO®/promA9, pENTR™/D-TOPO®/XTH3 y pENTR™/D-TOPO®/MPS2.

Para la confirmación de la recombinación cada vector de entrada con el vector de destino pKGWFS7,0 se realizó un PCR a las colonias obtenidas (Figura 8.A). De las colonias positivas se seleccionó una a la cual se le realizó una extracción plasmidial y se digirió con enzima de restricción (Figura 8.B), las digestiones confirmadas con el patrón predicho por el programa SerialCloner 2.6.1® fueron utilizadas para transformar células de *Agrobacterium* competentes. Las colonias de *Agrobacterium* obtenidas fueron confirmadas mediante PCR de colonia (Figura 8.C).

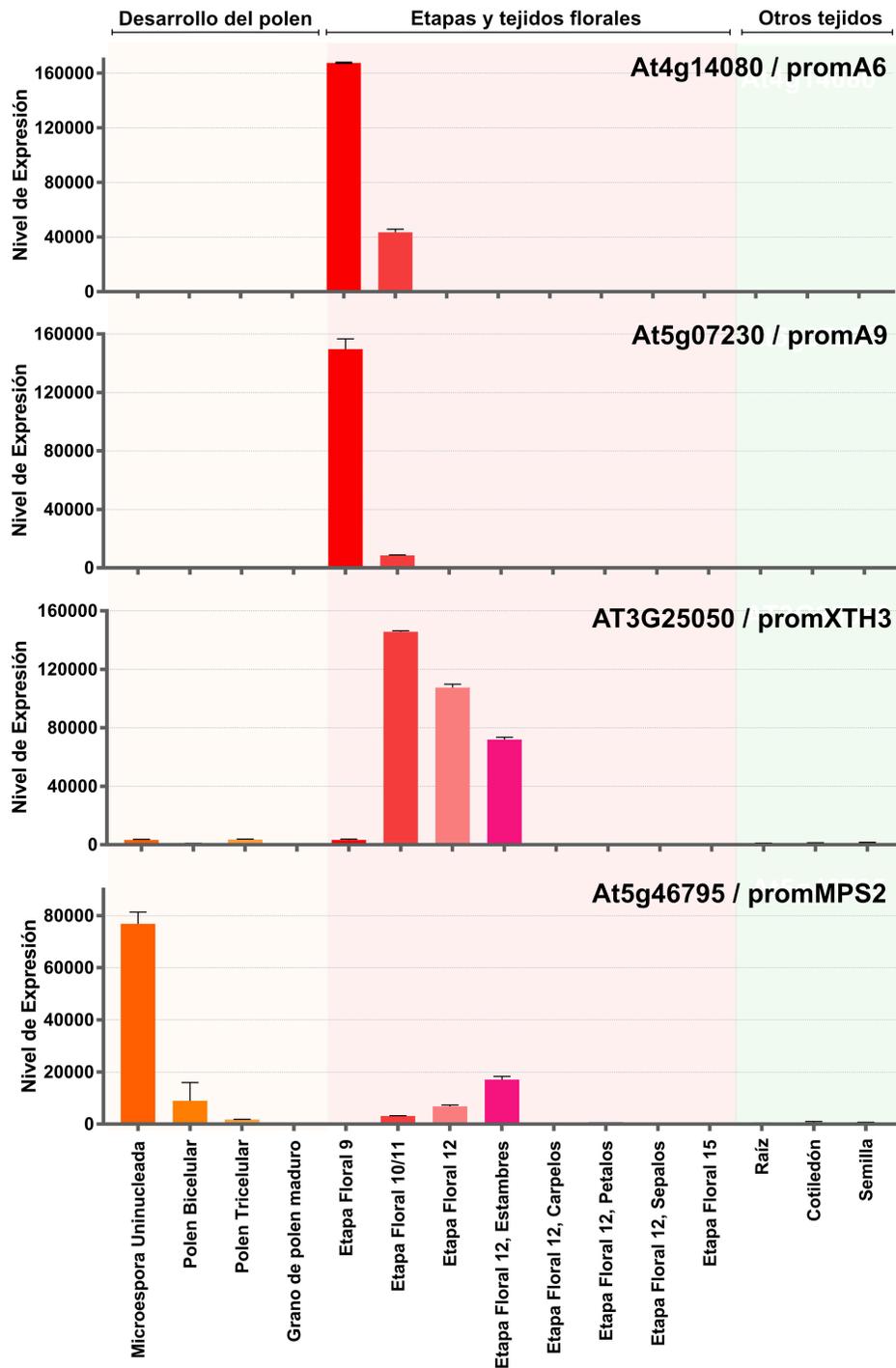


Figura 6: Análisis *in silico* de niveles y temporalidad de expresión.

Temporalidad de expresión de los genes bajo el control promotores seleccionados en el desarrollo del grano de polen (fondo color Damasco), desarrollo de flor (fondo rosado) y otros tejidos (fondo verde). Se utilizó la herramienta bioinformática *online* eFP Browser <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.

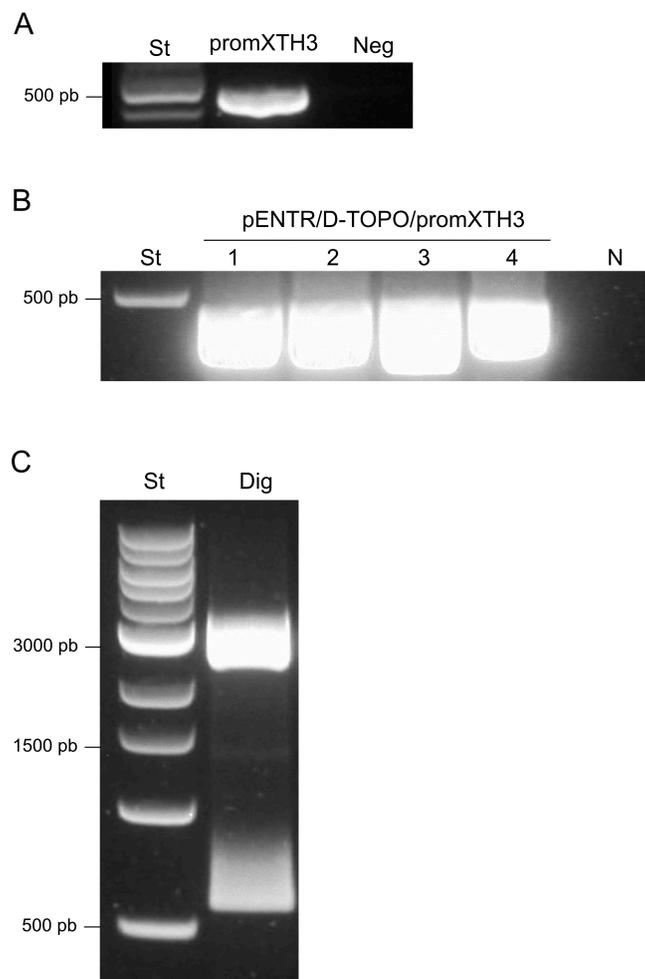


Figura 7: Generación del vector de entrada para Gateway® simple.

A. Purificación de promotores amplificados. B. PCR de colonias de *E. coli* transformadas con el vector de entrada. C. Digestión enzimática de los vectores de entrada con las enzimas de restricción EcoRV y NotI. Gel de agarosa al 1%, st. estándar de tamaño molecular de 1 kb New England Biolabs®.

Se seleccionó una colonia positiva de cada transformación y se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 mediante el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Al momento de la generación de este documento no se obtuvieron líneas transgénicas debido a que durante el proceso de selección de semillas transgénicas en medio MS se produjo una recurrente contaminación de las placas.

Inactivación de la auxina en el tapetum de manera específica e identificación de posibles alteraciones en los patrones normales de distribución de auxinas en el tejido floral en las plantas que expresan *iaaL*.

Para generar el vector de entrada con *iaaL* se realizó una reacción PCR a partir de un vector que contenía la secuencia del gen *iaaL*, se purificó y ligó el producto al vector de entrada pENTR™/D-TOPO®. El vector de entrada generado se utilizó para transformar *E. coli*. Las colonias transformadas fueron confirmadas mediante PCR (Figura 9.A). De las colonias positivas se seleccionó una a la cual se le realizó una extracción plasmidial, la que se digirió con enzima de restricción (Figura 9.B), la digestión confirmada con el patrón predicho por el programa SerialCloner 2.6.1® fue enviada a secuenciar, el vector de entrada con *iaaL* clonado en la dirección correcta y sin mutaciones se utilizó como vector de entrada pENTR™/D-TOPO®/*iaaL*.

De similar manera a la generación de los vectores de entrada de cada promotor para la recombinación simple en el objetivo 1, se realizó mediante la extracción de ADN de *Arabidopsis thaliana*, reacción de PCR, purificación y ligación del producto con el vector pENTR™5'-TOPO® y transformación de bacterias *Escherichia coli* competentes con el vector de entrada generado. La transformación fue confirmada mediante PCR a la secuencia promotora de las colonias positivas (Figura 10.A). De estas, se seleccionó una a la cual se le realizó una extracción plasmidial y se digirió con enzima de restricción (Figura 10.B). Las digestiones fueron confirmadas con el p

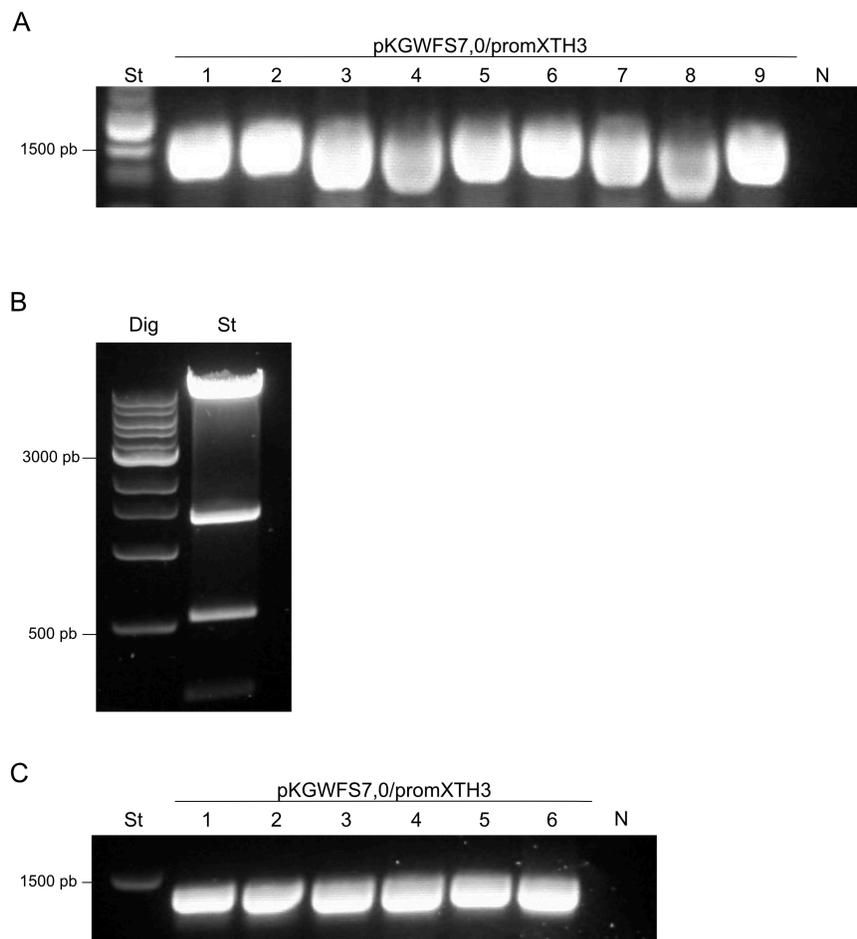


Figura 8: Recombinación del vector de entrada con el vector de destino.

A. PCR de colonias con el vector recombinado. B. Digestión enzimática del vector de expresión generado con la enzimas de restricción EcoRV. C. PCR de colonias de *Agrobacterium* transformado. Gel de agarosa al 1%. MiniP. ADN purificado mediante miniprep. Dig, vector digerido. St corresponde al estándar de tamaño molecular de 1 kb New England Biolabs®.

atrón predicho por el programa SerialCloner 2.6.1® y se envió a secuenciar el clon respectivo. Los vectores cuyos promotores fueron clonados en la dirección correcta y sin mutaciones se utilizaron como vectores de entrada (pENTR™ 5'-TOPO®/promotor) para la generación de los vectores de expresión.

La confirmación de la recombinación doble mediante el sistema Gateway® de los vectores de entrada que contienen los promotores con el vector de entrada que contiene *iaaL* y el vector de destino pB7m24GW,3 se realizó mediante PCR a las colonias obtenidas (Figura 11.A). De las colonias positivas se seleccionó una a la cual se le realizó una extracción plasmidial y se digirió con enzima de restricción (Figura 11.B). Los clones confirmados por digestión fueron utilizados para transformar celular competente de *Agrobacterium*. Las colonias de *Agrobacterium* transformadas fueron confirmadas mediante PCR de colonia (Figura 11.C) y las colonias positivas se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* del fondo genético DR5:GUS mediante el método de inmersión floral.

Se confirmaron y analizaron 6 líneas transgénicas T₁ de Col-0 DR5:GUS promA6:*iaaL*; 9 líneas transgénicas T₁ de Col-0 DR5:GUS promA9:*iaaL* y 9 líneas transgénicas T₁ de Col-0 DR5:GUS promMPS2:*iaaL*, previamente confirmadas mediante PCR a *iaaL* (Figura 12). No se lograron confirmar líneas transgénicas de Col-0 DR5:GUS promXTH3:*iaaL*.

Las líneas promA6:*iaaL* en fondo DR5:GUS presentaron una disminución en la tinción GUS en comparación a la línea DR5:GUS utilizada como control positivo (Figura 13). La línea promA6:*iaaL*-5 presenta un patrón de coloración similar al control positivo pero levemente más tenue. En contraste la línea promA6:*iaaL*-3 no presentó coloración, resultado comparable al control negativo (Col-0). Este ensayo fue realizado a inflorescencias de líneas transgénicas promA9:*iaaL* y promMPS2:*iaaL*, sin embargo no se obtuvieron resultados confiables debido a tinciones inespecíficas en los controles (positivo y negativo).

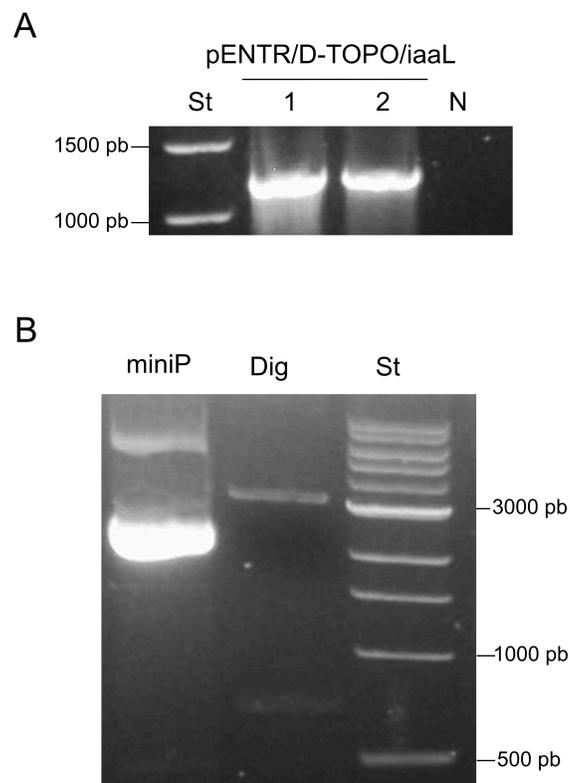


Figura 9: Generación del vector de entrada pENTR™/D-TOPO®/*iaaL*

A. PCR de colonias vector de entrada generado. B. Digestión enzimática del vector de entrada con la enzima de restricción EcoNI. Gel de agarosa al 1%, St. Estándar. MiniP. ADN purificado mediante miniprep. Dig, vector digerido. st corresponde al estándar de tamaño molecular de 1 kb New England Biolabs®.

Identificación de posibles alteraciones fenotípicas en la anatomía del tejido floral mediante análisis de microscopía

En las líneas generadas no se observaron alteraciones en tamaño de las plantas, el tiempo de germinación o en su morfología. Sin embargo, esta apreciación es solo a simple vista y estas características no fueron analizadas de manera cuantitativa. Se presenta la línea transgénica *promA6:iaaL-1* como línea representativa (Figura 14).

Las flores no presentaron alteraciones morfológicas aparentes en comparación a las líneas control (Figura 15), comparado elongación de sépalos, pétalos, estambres y pistilo. Particularmente en los estambres no se observaron alteraciones en la elongación del filamento, como tampoco en el proceso de dehiscencia de la antera. Sin embargo, algunas líneas presentaron flores con menos de 6 estambres (Figura 15). En efecto, este fenotipo fue detectado de manera recurrente en las líneas transgénicas, llegando a afectar a más del 50% de las flores en algunas líneas (Figura 16).

Mediante el análisis de la viabilidad del polen por tinción de Alexander (Figura 17) se obtuvo que el 67% de las líneas de *promA6:iaaL* presentaron polen muerto, en mayor cantidad las líneas 3 y 6. El 22% de las líneas del promotor *promA9:iaaL* y el 55% de las líneas del promotor *promMPS2:iaaL* presentaron granos de polen muerto. Las líneas control no presentaron granos de polen muerto en ninguna de las repeticiones del ensayo. Los niveles de polen muerto por flor no fueron cuantificados, estos resultados son sólo una apreciación cualitativa.

Para analizar la capacidad reproductiva de estas plantas se cuantificó la producción de semillas de al menos 5 frutos por línea transgénica (Figura 19) y se observó que los frutos de algunas de las líneas presentaban menos semillas que los frutos de las líneas controles (Figuras 18 y 19). De la transformación *promA6:iaaL*, el 50% de las líneas presentaron diferencias significativas, donde las líneas 3 y 6 presentaron una importante disminución de semillas por fruto, siendo consideradas

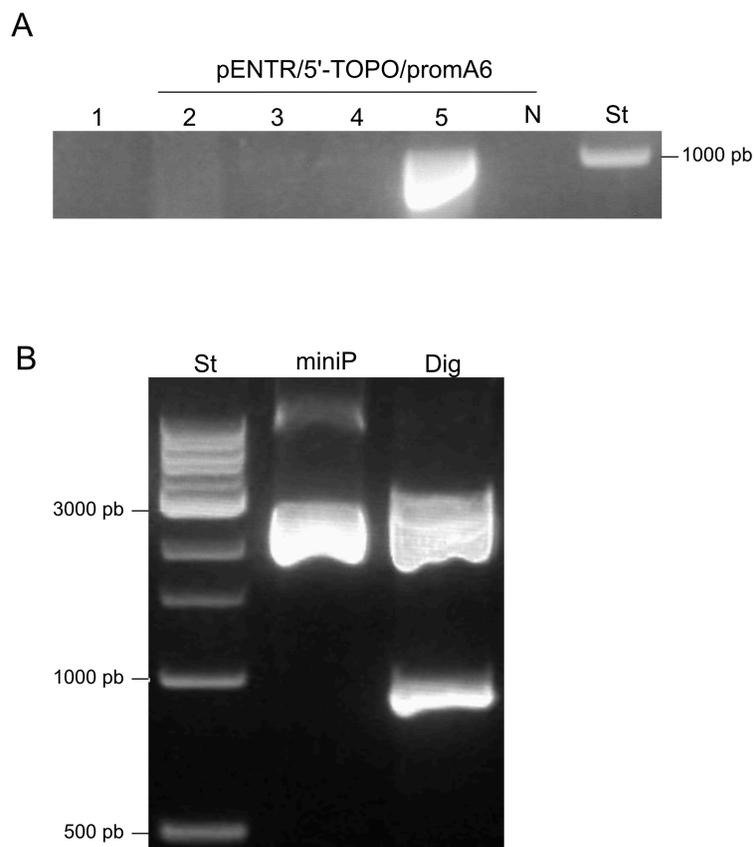


Figura 10: Generación del vector de entrada pENTR™ 5'/TOPO®/promA6

A. PCR de colonias transformadas con el vector de entrada. B. Digestión enzimática del vector de entrada con la enzima de restricción EcoNI. Gel de agarosa al 1%. MiniP, ADN purificado mediante miniprep. Dig, vector digerido. st corresponde al estándar de tamaño molecular de 1 kb New England Biolabs®.

estériles. De la transformación *promA9:iaaL*, el 56% de las líneas presentaron diferencias significativas y las líneas 7 y 8 presentaban entre 14 y 20 semillas por silicua. De similar manera, de la transformación *promMPS2:iaaL*, el 56% de las líneas transgénicas presentaron diferencias significativas, donde la línea 5 es estéril y la línea 2 presentaba entre 23 y 32 semillas por fruto.

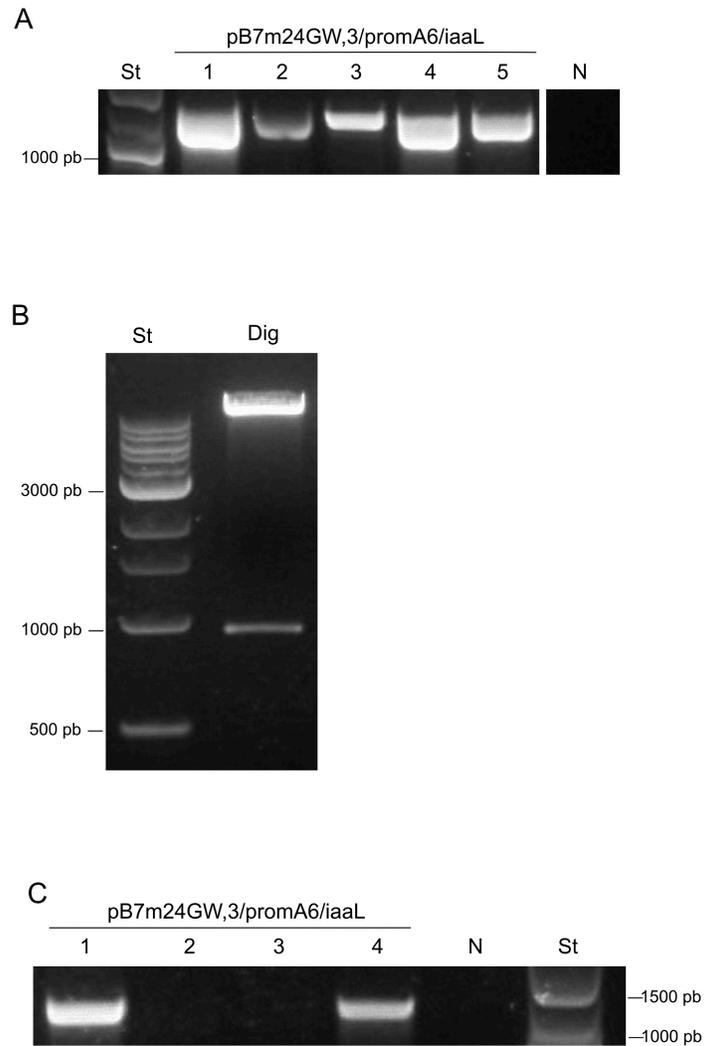


Figura 11: Recombinación del vector de entrada con el vector de destino.
 A. PCR de colonia amplificando el promotor B. Digestión del vector de expresión generado con la enzima EcoRI. MiniP, ADN purificado mediante miniprep. Dig, vector digerido. St corresponde al estándar de tamaño molecular de 1 kb New England Biolabs®.

DISCUSIÓN

El rol de auxina en la formación de los tejidos florales ha sido ampliamente estudiado. Se ha establecido previamente que la auxina participa en los procesos de formación del tejido floral, diferenciación de sus órganos y controla la fase tardía del desarrollo del estambre, afectando así la viabilidad de los granos de polen (Cheng y Zhao, 2007; Cecchetti y cols., 2008). Toda la evidencia reunida hasta el momento apunta a que durante el proceso de morfogénesis la síntesis de auxina ocurre en el tapetum, la capa media, el procambio y la microespora, debido a que se ha confirmado la expresión de los genes de biosíntesis YUC2 y YUC6 en estos tejidos (Cheng y cols., 2006; Cecchetti y cols., 2008). Por otro lado, se sabe que en la antera se acumula auxina activa —particularmente en los granos de polen, tapetum y en el filamento— en distintas etapas del desarrollo. La concentración de IAA libre en las anteras tiene su máximo al comienzo de la fase tardía y disminuye con la degeneración del tapetum (Cecchetti y cols., 2013).

Selección de promotores específicos de tapetum y polen, y comprobación del patrón de expresión que generan mediante su fusión al gen reportero GUS.

El promotor del gen A6 fue inicialmente caracterizado mediante fusión al reportero GUS en tabaco y *Brassica napus* (Hird y cols., 1993) y posteriormente fue caracterizado en *Arabidopsis* (Konagaya y cols., 2008). Este promotor ha sido utilizado como un promotor específico de tapetum en diversos estudios (Hong y cols., 2002; Hongye y cols., 1999). El promotor A9 fue inicialmente aislado de *B. napus* (Paul y cols., 1992) y posteriormente en *Arabidopsis thaliana* y tabaco, en donde el promotor fue fusionado a GUS (Konagaya y cols., 2008; Scott y cols., 1991). El promotor A9 ha sido ampliamente utilizado como un promotor específico de tapetum

en diversos estudios (Bisht y cols., 2004; Guerineau y cols., 2002; Kavita y Burma, 2008; Matsuda y cols., 1996; Zhang y cols., 2008).

Los promotores *promXTH3* y *promMPS2* fueron inicialmente caracterizados mediante su fusión al gen reportero GUS en *Arabidopsis thaliana* (Ariizumi y cols., 2002; Honys y cols., 2006). No se encontró ningún estudio donde se utilizaran estos promotores, probablemente debido a que ya existían promotores específicos de tapetum cuando estos fueron caracterizados (como *promA6* y *promA9*).

La tinción GUS es un método de marcaje ampliamente utilizado para determinar patrones de expresión en planta para el gen reportero *uidA* (Jefferson y cols., 1987). La intención original era fusionar los promotores seleccionados al gen *uidA* con el propósito de confirmar los patrones de expresión descritos en la literatura, y realizar cortes transversales de anteras en diferentes etapas del desarrollo, para determinar de manera más específica los patrones de expresión de los promotores. Lamentablemente al momento de la generación de este documento no se lograron obtener plantas transgénicas positivas de ninguno de los promotores, esto debido a reiteradas contaminaciones en las placas de MS donde se germinaban las semillas.

La germinación de semillas (T_1) provenientes de plantas transformadas se realiza *in vitro*, en placas Petri en un medio suplementado con antibiótico. Este método permite la germinación selectiva de las semillas que presentan el transgén integrado en su genoma. En el caso de la resistencia a Kanamicina las semillas germinan normalmente, pero aproximadamente a los dos días de germinación los cotiledones sin el transgén que le otorgue la resistencia al antibiótico comienzan a clorarse, sin desarrollar hojas primarias (Feldmann y Marks, 1987). Las semillas transgénicas germinan y las plántulas se desarrollan de manera normal. Este mecanismo de cultivo presenta ventajas obvias como el ahorro de espacio tiempo y recursos en líneas negativas. Sin embargo, también presentan algunas desventajas en comparación a la germinación directa en tierra, entre ellas el estrés en las plantas ocasionado por el cambio de medio y los riesgos de contaminación de los medios de cultivo.

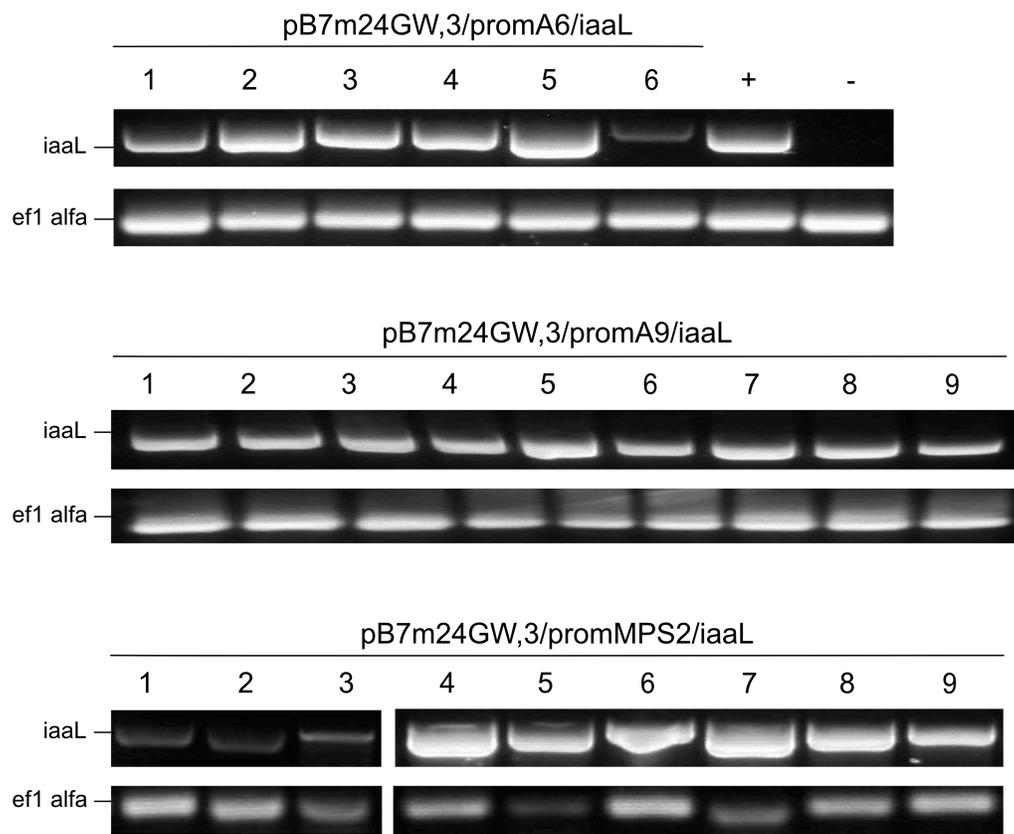


Figura 12: Confirmación de líneas transgénicas mediante PCR.

Amplificación del gen *iaaL* y el gen *EF1alfa*. “-”, gDNA de plantas DR5:GUS fue utilizado como control de ADN. “+”, gDNA de planta transgénicas de *Arabidopsis* transformada con el gen *iaaL* fue utilizado como control positivo.

Aunque el medio MS se encuentran suplementado (en este caso) con un antibiótico —y se mantienen en cámaras de cultivo donde se intenta mantener condiciones de asepsia— el crecimiento de microorganismos es inevitable. Los medios de cultivo son ricos en nutrientes, y las condiciones de humedad y temperatura que resultan ideales para la germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* también lo son para el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes.

Sin embargo, ya que esta contaminación tan agresiva no se presentó en todas las placas, también existe la posibilidad la esterilización externa de las semillas previa al cultivo sea ineficiente o las semillas se hayan contaminado con algún microorganismo durante su almacenamiento. Considerando esta posibilidad se aumentó la concentración de cloro utilizado para la esterilización (de un 50% a un 70%). Lamentablemente esta estrategia tampoco evitó la contaminación. Finalmente al momento de la generación de este documento no fue posible replicar los experimentos realizados por los grupos antes mencionados para confirmar los patrones de expresión del gen *uidA* bajo el control de los promotores de manera empírica. Sin embargo, debido a que esto se quiso realizar solo como confirmación no impidió el desarrollo de los objetivos 2 y 3.

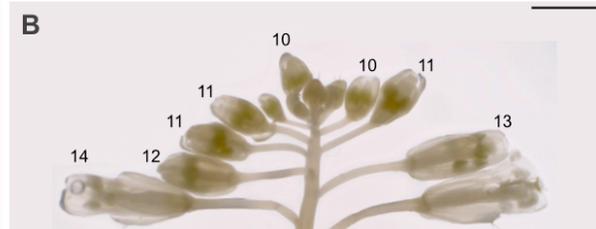
Inactivación la auxina en el tapetum de manera específica e identificación de posibles alteraciones en los patrones normales de distribución de auxina en el tejido floral de las plantas que expresan *iaaL*.

La enzima ácido indolacético-lisina sintasa (o IAA-lisina sintasa) codificada por el gen *iaaL* proviene del fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Esta enzima es responsable de la síntesis de IAA-lisina, mediante una reacción que genera un enlace entre el grupo carboxil de IAA y el grupo amino épsilon de lisina (Hutzinger y Kosuge, 1968). La conjugación de IAA con aspartato o glutamato parece tener un rol crucial en la inactivación y almacenaje de IAA en plantas (Cohen y Bialek,

DR5:GUS



Col-0



DR5:GUS promA6:*iaaL* 5



DR5:GUS promA6:*iaaL* 3



Figura 13: Evaluación de los promotores mediante actividad GUS.

Tinción GUS a inflorescencias de plantas transgénicas. A. Planta DR5:GUS Col-0. B. Planta WT Col-0. C y D. plantas transgénicas promA6:*iaaL* T1, Líneas 5 y 3, respectivamente. Barra = 3 mm.

1984), y ya que IAA-Lisina no se encuentra normalmente en plantas, se cree que las enzimas endógenas de las plantas no son capaces de revertir el enlace de IAA con lisina (Cohen y Bandurski, 1982).

El gen *iaaL* fue clonado en *E. coli* por primera vez por Glass y Kosuge en 1986, donde su actividad enzimática fue evaluada *in vitro*. El efecto de este gen en plantas fue inicialmente demostrado en líneas transgénicas de tabaco, con el transgén bajo el control de un promotor constitutivo. En ese caso se observó una disminución de hasta un 95% para el IAA libre en algunas líneas. Plantas de tabaco que expresan el gen *iaaL* presentan una reducida dominancia apical, raíces más cortas y una inhibición en la diferenciación vascular, indicando que *iaaL* actúa como un gen "anti-auxina" (Romano y cols., 1991). Más recientemente se han generado líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con el gen *iaaL* bajo el control de diversos promotores, todos con el objetivo de disminuir la concentración de auxina libre en tejidos vegetales y estudiar su rol (Booker y cols., 2003; Weijers y cols., 2005; Yang y cols., 1997; Zhao y cols., 2001)

Utilizar *iaaL* para inactivar la auxina exclusivamente en el tapetum pareció la mejor estrategia para determinar la importancia de la acumulación de esta fitohormona en este tejido, particularmente en el desarrollo del estambre y en la fertilidad masculina debido a las características particulares del tejido. El tapetum provee a la microespora de nutrientes y secreta enzimas que permiten la liberación de las microesporas de la pared de callosa que rodea la tetrada y provee precursores para la biosíntesis de la exina del polen (Bedinger, 1992). Adicionalmente, en plantas transgénicas de tabaco con deficiencia de auxina activa en el tapetum se observó una disminución en polen funcional (Yang y cols., 1997).

Se logró confirmar 6 líneas transgénicas para la construcción *promA6:iaaL*, 9 líneas transgénicas para la construcción *promA9:iaaL* y 9 líneas transgénicas para la construcción *promMSP2:iaaL* (Figura 12). No fue posible confirmar líneas transgénicas para la construcción *promXTH3:iaaL*, esto debido a reiteradas contaminaciones en las placas de medio MS donde se germinaban las semillas.



Figura 14: Evaluación general de planta transgénica.

A. Planta transgénica para el gen *iaaL* bajo el control del promotor *promA6*. B. Planta de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *col-0*.

La actividad de GUS cuando el gen *uidA* se expresa bajo el control del promotor DR5 se vuelve detectable al comienzo del desarrollo tardío del estambre (etapa 10), principalmente en el tapetum, y en menor nivel en la capa media, procambio y microespora. Subsecuentemente, cuando el tapetum degenera en la etapa 11, la actividad GUS disminuye (Cecchetti y cols., 2008). La línea promA6:*iaaL-5* presentó una tinción más tenue que el control positivo, lo que indica que hubo una disminución en la auxina activa en el tejido (Figura 13). Para la línea promA6:*iaaL-3* no se logró observar tinción, sugiriendo una importante disminución de auxina activa en la inflorescencia.

Identificación de posibles alteraciones fenotípicas en la anatomía del tejido floral mediante análisis de microscopía.

Como se ha mencionado anteriormente, la auxina controla positivamente la elongación de los filamentos y controla negativamente la dehiscencia de la antera y la maduración del polen. La doble mutante en receptores de auxina *arf6arf8* presenta flores con pétalos cortos, filamentos de los estambres cortos, anteras que no pasan por dehiscencia y gineceo inmaduro (Nagpal, 2005). La doble mutante en transportadores de auxina *abcb1/abcb19* muestra una precoz maduración de polen y dehiscencia de la antera y una menor elongación de los filamentos (Noh y cols., 2001; Cecchetti y cols., 2008).

Las flores de *Arabidopsis thaliana* poseen normalmente 6 estambres. Durante la etapa 6 del desarrollo floral aparece el primordio de los 4 estambres largos y los primordios de los otros 2 estambres aparecen un poco más abajo y se desarrollan más tarde (Smyth y cols., 1990). Las flores silvestres de *Arabidopsis* también pueden presentar 5 estambres en algunas flores. Cuando las flores son tratadas con NPA el número de estambres por flor es menor y la mayoría de las plantas tratadas presentan menos de 3 estambres por flor (Nemhauser y cols., 2000). En este caso el fenotipo es de esperarse ya que la auxina también participa en la morfogénesis de los

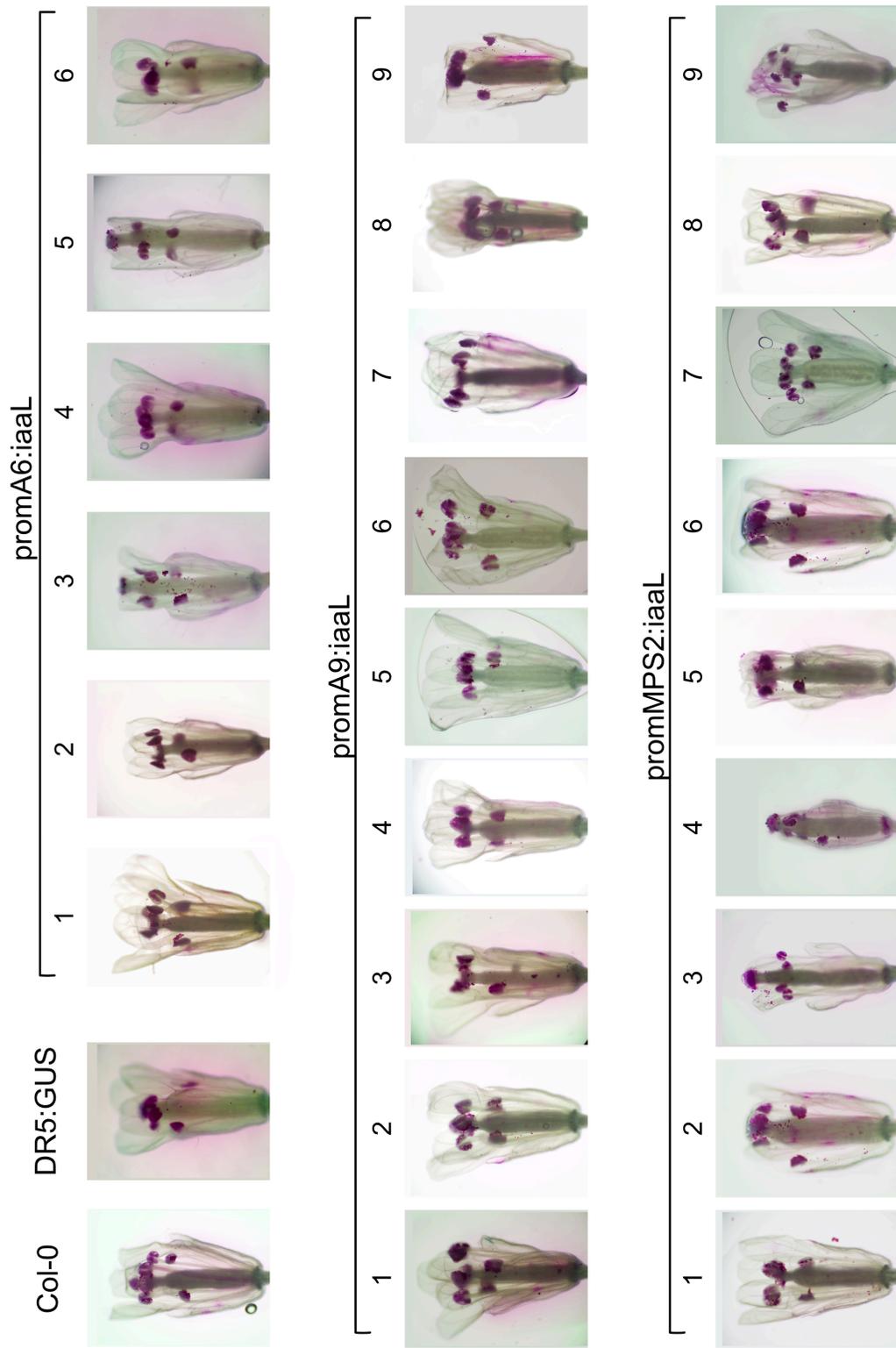


Figura 15: Flores transgénicas en tinción de Alexander.
 Flores de las líneas transgénicas generadas para el gen *iaaL* bajo el control de los distintos promotores seleccionados.

tejidos de la flor. Sin embargo, interesantemente en las líneas transgénicas analizadas aproximadamente el 46% presentó flores con solo 4 estambres (Figura 16). La recurrencia de este fenotipo se observó en diferentes porcentajes en cada línea, siendo las líneas promA9:*iaaL*-7 y promMSP2:*iaaL*-5 con el mayor porcentaje de flores con 4 estambres.

Es difícil determinar cuál es la relación de la auxina acumulada en un tejido en particular con la formación del mismo tejido que lo contiene y parece poco probable que la auxina del tapetum de la misma antera inhiba su formación. Existe la posibilidad de que los promotores se expresen en otros tejidos de la flor de manera temprana inhibiendo la correcta formación de los estambres, pero el hecho de que este fenotipo se observa en líneas de todas las transformaciones significaría que coincidentemente todos los promotores utilizados tienen este patrón de actividad más temprana a lo caracterizado, lo que resulta poco probable. Una alternativa que podría explicar este fenotipo es alguna comunicación de la flor con menos auxina activa con el resto de la planta. Esta es solo una hipótesis que no fue explorada en este trabajo, sin embargo un análisis transcriptómico de los tejidos de una de estas líneas pueda ayudar a dilucidar la razón de este fenotipo observado.

Líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y tabaco que expresan *iaaL* bajo el control de un promotor específico de filamento presentaron filamentos cortos, e interesantemente también presentaron granos de polen defectuosos (Feng y cols., 2006). Este resultado sugiere la posibilidad de que la auxina acumulada en el filamento tenga participación en el correcto desarrollo de la antera y los granos de polen. Los filamentos presentan transporte polar de auxinas en ambas direcciones, basopetal y acropetal (Feng y cols., 2006). Es decir, hay flujo de auxina hacia y desde la antera. Una de las hipótesis propuestas era que la auxina acumulada en el tapetum podría ser transportada al filamento y ocasionar la elongación celular y en consecuencia la elongación del filamento (Cecchetti y cols., 2016). Sin embargo en ninguna de las líneas transgénicas aquí analizadas —promA6:*iaaL*, promA9:*iaaL* o promMSP2:*iaaL*— la elongación de los filamento se vio alterada, incluyendo las

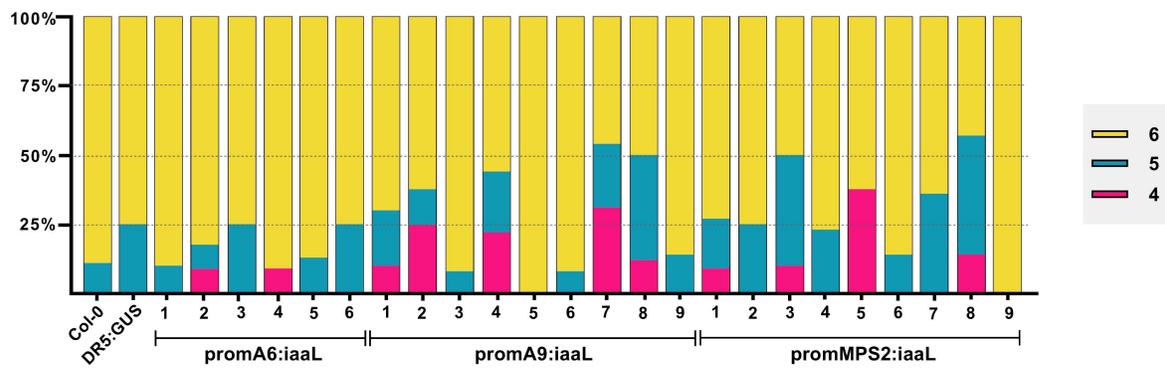


Figura 16: Proporción de anteras por flor.

Número de anteras por flores de cada línea. En rosa se representan la proporción de flores con 4 anteras. En azul se representa la proporción de flores con 5 anteras. En amarillo se representa la proporción de flores con 6 anteras. No se realizaron análisis estadísticos. $n \geq 5$.

líneas estériles (Figura 15). Estos resultados sugieren el control en la elongación de los filamentos del tapetum no estaría regulada por la acumulación de auxina activa en este tejido.

En particular, la auxina regula negativamente la expresión de la proteína MYB26, que controla la lignificación del endotecio, donde el receptor de auxina AFB1 (Dharmasiri y cols., 2005) contribuye principalmente al control de la dehiscencia de la antera (Cecchetti y cols., 2013). El fenotipo se repite en triple y cuádruple mutantes de receptores de auxina, donde la dehiscencia también se adelanta (Cecchetti y cols., 2008). En el caso de las líneas transgénicas *promA6:iaaL*, *promA9:iaaL* y *promMSP2:iaaL* la dehiscencia de las anteras no parece haber sido afectada en ninguna de las líneas analizadas, incluyendo las líneas estériles que podrían tener bajos niveles de auxina activa en el tapetum. Un análisis histológico de este tejido o de lignificación del endotecio permitiría confirmar esta observación. Estos resultados sugieren que la auxina activa que se acumula en el tapetum y granos de polen no participa en el proceso de dehiscencia, o bien que los niveles mínimos necesarios son más bajos de lo que se logró obtener en las líneas transgénicas.

Mediante la tinción de Alexander se evaluó la viabilidad de los granos de polen de flores de todas las líneas analizadas (Figura 17). El alto porcentaje de líneas transgénicas *promA6:iaaL* y *promA9:iaaL* con polen no viable apoyan la idea de que la auxina acumulada en el tapetum tiene participación en el desarrollo del polen y puede ser vital para el correcto desarrollo de éste. Sin embargo, estos resultados no nos permiten determinar si la auxina en el tapetum es transportado al grano de polen o si la acumulación de auxina es parte de una vía de señalización que participa en el desarrollo del grano de polen. Análisis histológicos de anteras de la línea *promA6:iaaL-3* teñida con GUS podría ayudar a determinar al menos si en esta línea se acumula auxina activa en el polen bicelular.

Por otro lado, algunas de las líneas transgénicas *promMPS2:iaaL* también presentaron granos de polen inviable. Sin embargo, en este caso particular no es

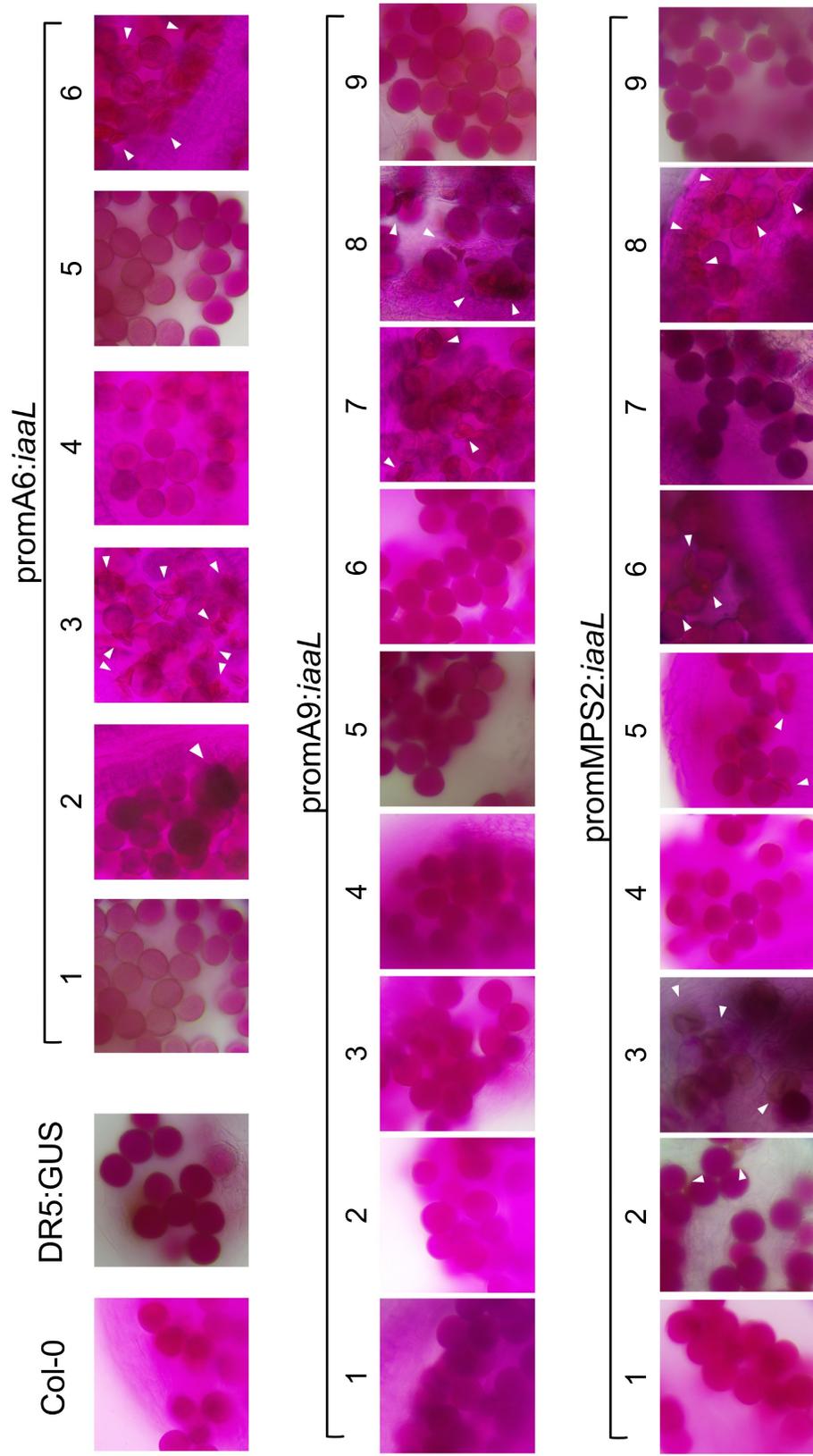


Figura 17: Evaluación de viabilidad del polen de las flores transgénicas. Tinción de Alexander a anteras de flores de las líneas transgénicas. Las flechas blancas indican los granos de polen no viables.

posible distinguir si es un efecto ocasionado por la inactivación de la auxina de tapetum o de la inactivación de auxina de los mismos granos de polen, debido a la temporalidad de la activación de este promotor, y el hecho de que se exprese en mayor medida en el grano de polen, ya que es sabido de la auxina participa en la regulación del ciclo celular de los granos de polen durante su desarrollo (Cecchetti y cols, 2008). Una estrategia para realizar la distinción podría ser transformar una de las líneas promMPS2:*iaaL* con una construcción que tenga *iaaM* —un gen que codifica para una enzima de biosíntesis directa de auxina a partir de triptofano— bajo el control de un promotor de tapetum (Klee y cols., 1987; Sitbon y cols., 1992).

Ya que auxina participa en el desarrollo del estambre y los granos de polen, varias líneas mutantes y transgénicas deficientes en su síntesis, transporte y/o percepción presentan esterilidad masculina y no generan frutos normales (Cardarelli y Cecchetti, 2014). En este caso la producción de semillas se vio afectada en la mayoría de las líneas transgénicas (Figuras 18 y 19). En la transformación promA6:*iaaL* se obtuvieron dos líneas estériles, en las cuales la mayoría de los frutos contenían solo una semilla.

Líneas transgénicas con *iaaL* bajo el control de un promotor específico de tapetum en tabaco presentaba un fenotipo normal pero una importante disminución de polen funcional (Yang y cols., 1997). La germinación *in vitro* de los granos de polen de apariencia viable permitiría determinar si estos son o no funcionales. Es probable que los granos de polen de apariencia viable no lo sea y esto explicaría la disminución en el número de semillas por fruto.

Debido a la similitud en los patrones de expresión generados por los promotores promA6 y promA9, era posible que se obtuvieran líneas estériles también con esta segunda transformación, pero este no fue el caso, sin embargo las líneas 7 y 8 presentaron frutos pequeños con menos de 20 semillas por fruto. Esta diferencia se debe probablemente a que los niveles de expresión generados por este promotor son

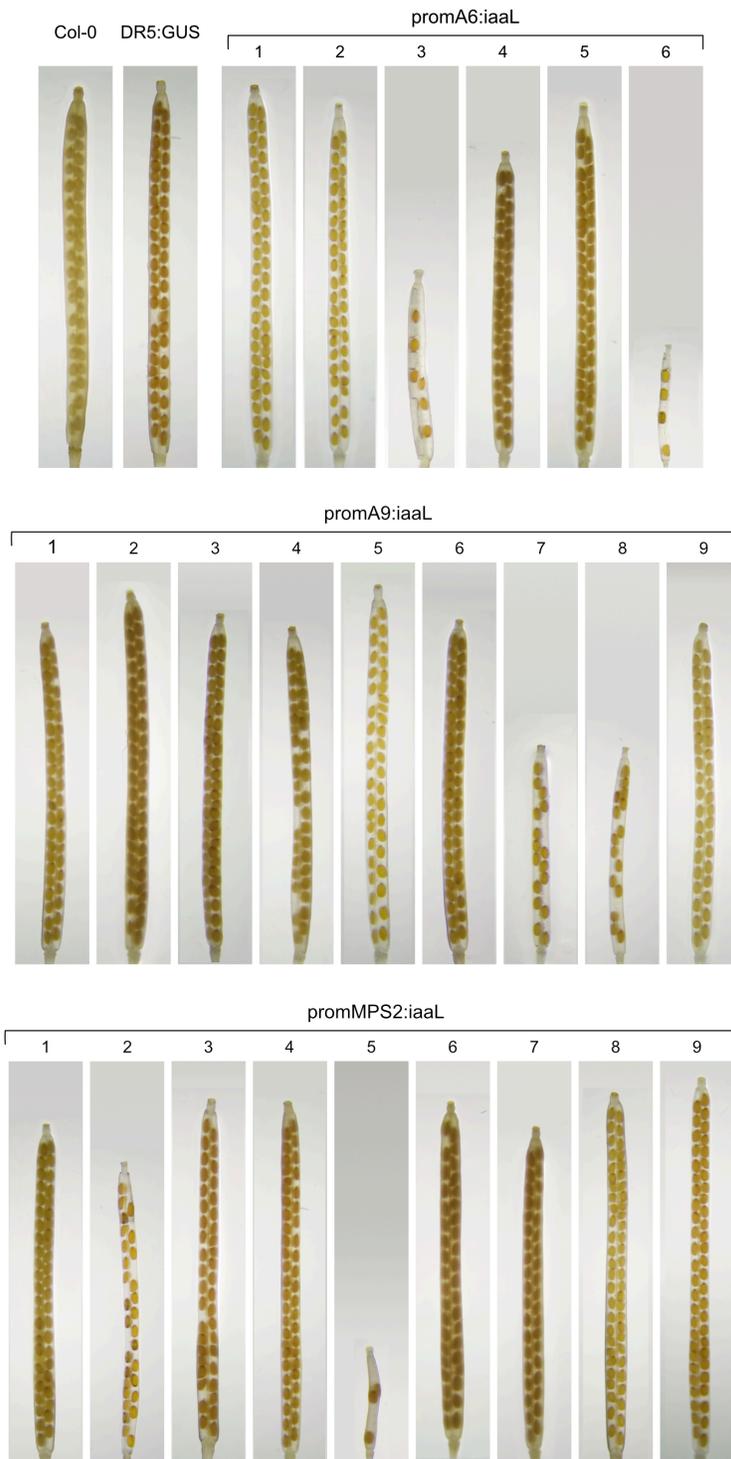


Figura 18: Frutos representativos de las plantas transgénicas.

Frutos maduros representativos de las líneas transgénicas generadas. Los frutos fueron desteñidos en etanol. Fotografías tomadas bajo una lupa estereoscópica.

menores, dejando en evidencia que para la inactivación de auxina mediada por *iaaL* son necesarias altas cantidades de esta enzima.

De la transformación *promMPS2:iaaL* se obtuvo una mayor proporción de líneas con menos semillas por fruto. Estos resultados eran esperables ya que se sabe que durante la germinación el grano de polen y el tubo polínico presentan una gran concentración de auxina activa (Aloni y cols., 2006), la que es determinante para la correcta elongación del tubo polínico y fecundación de los óvulos. Es posible que esto se deba a que la auxina acumulada en la etapa bi-celular del grano de polen es desactivada cuando madura y posteriormente re-activada en la etapa de germinación para provocar la elongación del tubo polínico. Sin embargo existe la posibilidad de que la enzima *iaaL* permanezca en el grano de polen e inhiba la auxina que se genera en el tejido.

Es importante mantener en consideración que la expresión de *iaaL* no fue evaluada de manera directa y, debido a esto, cualquier alteración fenotípica eventualmente podría deberse a otro motivo, como por ejemplo efectos insercionales (Wallroth y cols, 1968). Sin embargo, como fue mencionado previamente, no se observó una alteración en la morfología de ninguna de las líneas y el único efecto encontrado fue en las anteras y en los frutos, efecto que se obtuvo en más de una línea por cada transformación, por lo que aunque sea posible que los efectos observados sean insercionales, se trata de algo muy poco probable. Adicionalmente, los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por Yang y cols., (1997) cuando inactivaron la auxina en el tapetum de tabaco posicionado *iaaL* bajo el control de un promotor específico del tejido. Al igual que en *Arabidopsis thaliana*, en tabaco la disminución de auxina activa en el tapetum solo afectó la viabilidad de los granos de polen aunque la publicación no describe alteraciones en el desarrollo del estambre y atribuyen esta ausencia de fenotipo anormal a que probablemente la actividad del promotor no fue suficiente para inactivar la auxina por completo. No se encontraron publicaciones posteriores que continuaran esta línea de investigación

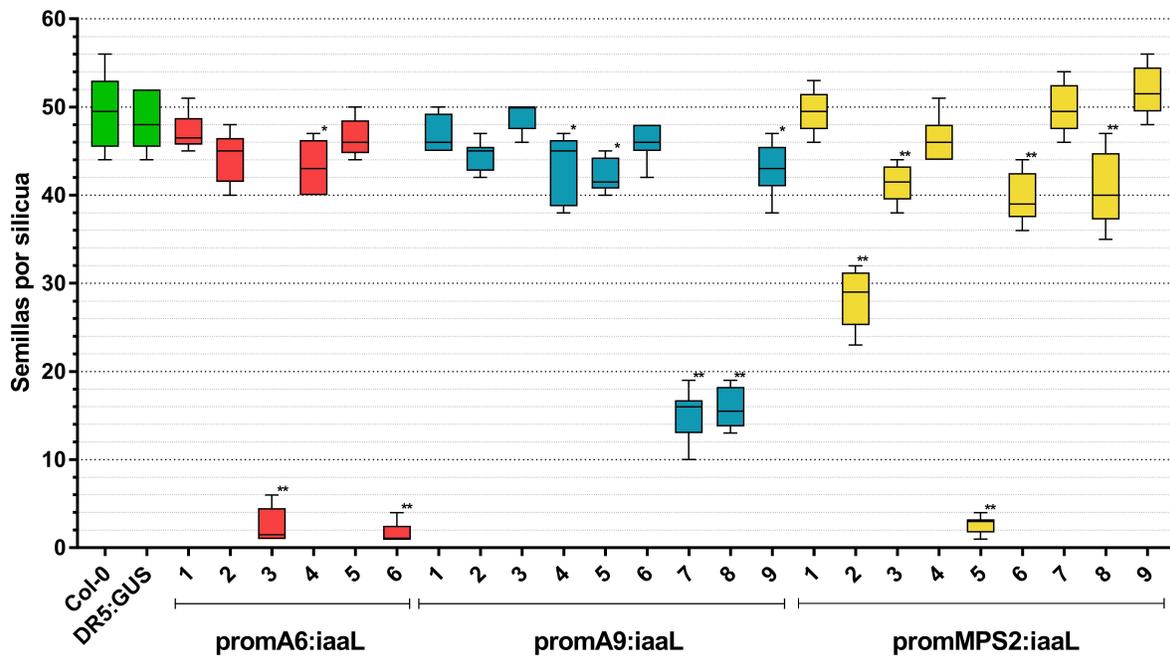


Figura 19: Número de semillas por fruto.

Número de semillas por silicua de plantas transgénicas que expresan el gen *iaaL* bajo el control de los promotores: promA6 (en rojo), promA9 (en azul) y promMPS2 (en amarillo). Col-0 y DR5:GUS en verde fueron utilizados como controles. Se cuantificó el número de semillas por fruto de al menos 10 frutos por línea. La significancia estadística fue calculada mediante one-way ANOVA. Los asteriscos representan la significancia de la medición: * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.001$.

Este estudio permitió asociar la importancia de la auxina activa que se acumula en el tapetum a la viabilidad de los granos de polen, mediante la disminución de la hormona activa en el tejido. Esta información —sumada a todos los antecedentes de publicaciones previas— nos acerca al entendimiento de la función de esta hormona en el desarrollo tardío del estambre, y las líneas transgénicas generadas ser una resultan potencial e interesante, herramienta para futuras investigaciones. Análisis de la segunda generación de algunas líneas con fenotipos anormales de interés como *promA6:iaaL-3* y *promA6:iaaL-6* podrían ayudar a obtener resultados más claros.

Debido a que las células del tapetum son de naturaleza secretora, se cree que la función de la síntesis de auxina en este tejido es entregarlo a los granos de polen. Sin embargo lo más probables es que esta hormona también tenga un rol en el tapetum. Es posible que la auxina participe en la regulación transcriptómica de algunas vías de señalización en el tejido, pero debido a que es muy pequeño y resulta complejo aislarlo del resto del estambre para realizar ensayos directamente en este, el análisis transcriptómico de estambres de líneas transgénicas homocigotas podría entregar valiosa información de las vías mediante las cuales la auxina acumulada en el tapetum participaría en el mismo.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la auxina activa que se acumula en el tapetum participa en el desarrollo de los granos de polen, siendo determinante para la fertilidad masculina. Por otro lado, una disminución de auxina en este tejido no parece afectar la elongación de los filamentos ni la dehiscencia de las anteras.

PROYECCIONES

La generación y estudio más profundo de líneas transgénicas homocigotas permitirá dilucidar de mejor manera el real papel que juega la auxina acumulada en el tapetum en el desarrollo tardío del estambre.

BIBLIOGRAFÍA

Alexander M. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Biotechnic & Histochemistry* 44, 117-122.

Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich C. I. (2006) Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* 223, 315-328.

Ariizumi T., Amagai M., Shibata D., Hatakeyama K., Watanabe M., Toriyama K. (2002) *Plant Cell Reports* 21, 90-96.

Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. *The Plant Cell* 4(8), 879–887.

Bisht N. C., Jagannath A., Gupta V., Burma P. K., Pental D. (2004) A two gene – two promoter system for enhanced expression of a restorer gene (*barstar*) and development of improved fertility restorer lines for hybrid seed production in crop plants. *Molecular Breeding* 14(2), 129-144.

Booker J., Chatfield S., Leyser O. (2003) Auxin Acts in Xylem-Associated or Medullary Cells to Mediate Apical Dominance. *The Plant Cell* 15(2), 495-507

Bowman J. L., Smyth D. R., Meyerowitz E. M. (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 1, 37-52.

Cardarelli M., Cecchetti V. (2014) Auxin Polar Transport In Stamen Formation And Development: How Many Actors?. *Frontiers in Plant Science* 5, 333.

Cecchetti V., Altamura M. M., Brunetti P., Petrocelli V., Falasca G., Ljung K., Costantino P., Cardarelli M. (2013) Auxin controls *Arabidopsis* anther dehiscence by regulating endothecium lignification and jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* 74, 411-422.

Cecchetti V., Altamura M. M., Falasca G., Costantino P., Cardarelli M. (2008) Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *The Plant Cell Online* 20, 1760-1774.

Chang F., Wang Y., Wang S., Ma H. (2011) Molecular control of microsporogenesis in *Arabidopsis*. *Current opinion in plant biology* 14, 66-73.

Chapman G. (1987) The tapetum. *International review of cytology* 107, 111-125.

Chen L., Liu Y.-G. (2014) Male Sterility and Fertility Restoration in Crops. *Annual Review of Plant Biology* 65, 579-606.

Chen D. H., Ronald P. C. (1999) A rapid DNA miniprep method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Molecular Biology Reporter* 17, 53-57.

Cheng Y., Zhao Y. (2007) A Role for Auxin in Flower Development. *A role for auxin in flower development* 49(1), 99-104.

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

Clough S., Bent A. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, 16(6), 735-743.

Cohen J. D., Bandurski R. S. (1982) Chemistry and Physiology of the Bound Auxins. *Annual Review of Plant Physiology* 33, 403-430.

Cohen J. D., Bialek K. (1984) The biosynthesis of indole-3-acetic acid in higher plants. In Crozier A., Hillman J.R., eds, *The Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones*. Society for Experimental Biology Seminar 23. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 165-181.

Dresselhaus T., Schneitz K. (2014) The Role of Auxin for Reproductive Organ Patterning and Development. En: Zažímalová E., Petrášek J., Benková E. (eds) Auxin and Its Role in Plant Development: pp. 213-243. Springer Vienna.

Dharmasiri N., Dharmasiri S., Weijers D., Lechner E., Yamada M., Hobbie L., Ehrismann J. S., Jürgens G., Estelle M. (2005) Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins 9(1), 109-119.

Elorriaga E., Meilan R., Ma C., Skinner J. S., Etherington E., Brunner A., Strauss S. H. (2014) A tapetal ablation transgene induces stable male sterility and slows field growth in *Populus*. *Tree Genetics & Genomes*, 10(6) 1583-1593.

Feldmann K. A., Marks M. D. (1987) Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Molecular and General Genetics* 208(1), 1–9.

Feng X., Dickinson H. G. (2007) Packaging the male germline in plants. *Trends in Genetics* 23, 503-510.

Feng X., Dickinson H. G. (2010) Tapetal cell fate, lineage and proliferation in the *Arabidopsis* anther. *Development* 137, 2409-2416.

Feng X. L., Ni W. M., Elge S., Mueller-Roeber B., Xu Z.-H., Xue H.-W. (2006) Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant molecular biology* 61, 215-226.

Glass N. L., Kosuge T. (1986) Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of bacteriology* 166, 598-603.

Guerineau F., Sorensen A. M., Fenby N., Scott R. J. (2002) Temperature sensitive diphtheria toxin confers conditional male-sterility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* 1(1), 33-42.

Hird D. L., Worrall D., Hodge R., Smartt S., Paul W., Scott R. (1993) The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to β -1,3-glucanases. *The Plant Journal* 4(6), 1023-1033.

Hongye L., Yule L., Chengye L., Shuguo F. (1999) Construction of Male-Sterile and Male-Restorer Gene Expression Vectors. *Chinese Journal of Tropical Crops* 2, 8.

Honys D., Oh S., Reňák D., Donders M., Šolcová B., Johnson J. A., Boudová R., Twell D. (2006) Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 6(1), 1.

Hutzinger, O., Kosuge T. (1968) Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. III. The isolation and characterization of indole-3-acetyl- ϵ -L-lysine. *Biochemistry* 7, 601-605.

Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* 6, 3901.

Karimi M., De Meyer B., Hilson P. (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* 10, 103-105.

Kavita P., Burma P.K. (2008) A comparative analysis of green fluorescent protein and β -glucuronidase protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal expression profiles of promoters. *Journal of Biosciences* 33(3), 337–343

Klee H. J., Horsch R. B., Hinchee M. A., Hein M. B., L. Hoffmann N. L. (1987) The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes & Development* 1, 86-96.

Konagaya K., Ando S., Kamachi S., Tsuda M., Tabei Y. (2008) Efficient production of genetically engineered, male-sterile *Arabidopsis thaliana* using anther-specific promoters and genes derived from *Brassica oleracea* and *B. rapa* 27(11), 1741–1754.

Ludwig-Müller J. (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 1757-1773.

Mano Y., Nemoto K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of experimental botany* 63, 2853-2872.

McCormick S. (2004) Control of male gametophyte development. *The Plant Cell* 16, S142-S153.

Matsuda N. (1996) Partial Male Sterility in Transgenic Tobacco Carrying Antisense and Sense PAL cDNA under the Control of a Tapetum-Specific Promoter. *Plant Cell Physiology* 37(2), 215-2221.

Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3), 473-97.

Nagpal P., Ellis C. M., Weber H., Ploense S. E., Barkawi L. S., Guilfoyle T. J., Hagen G., Alonso J. M., Cohen J. D., Farmer E. E., Ecker J. R. and Reed J. W. (2005). Auxin response factors AFR6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132, 4107-4118.

Nemhauser J. L., Feldman L. J., Zambryski P. C. (2000) Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* 127, 3877-3888.

Noh B., Murphy A. S., Spalding E. P. (2001) Multidrug Resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell* 13, 2441-2454.

Parrish R. W., Li S. F. (2010) Death of a tapetum: A programme of developmental altruism 178(2), 73–89.

Paul W., Hodge R., Smartt S., Draper J., Scott R. (1992) The isolation and characterisation of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. Plant molecular biology 19, 611-622.

Quilichini T. D, Douglas C. J., Lacey Samuels A. L. (2014) New views of tapetum ultrastructure and pollen exine development in *Arabidopsis thaliana*. Annals of Botany 14(6), 1189-1201.

Robert H. S., Khaitova L. C., Mroue S., Benková E. (2015) The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Biology 66(16), 5029-5042.

Romano C. P., Hein M.B., Klee H.J. (1991) Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. Genes & Development., 5(3), 438-46.

Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013) Auxin: simply complicated. Journal of experimental botany 64, 2565-2577.

Scott R. J., Spielman M., Dickinson H. (2004) Stamen structure and function. The Plant Cell Online 16, S46-S60.

Scott R., Dagless E., Hodge R., Paul W., Soufleri I., Draper J. (1991) Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. Plant molecular biology 17, 195–207.

Scotland R. W., Wortley A. H. (2003) How many species of seed plants are there?. Taxon 52, 101-104.

Sitbon F., Hennion S., Sundberg B., Little C. A., Oisson O., Sandberg G. (1992) Transgenic tobacco plants co-expressing the *Agrobacterium tumefaciens iaaM* and *iaaH* genes display altered growth and indoleacetic acid metabolism. *Plant Physiology* 99, 1062–1069.

Smyth D. R., Bowman J. L., Meyerowitz E. M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 2, 755-767.

Turgut K., Barsby T., Craze M., Freeman J., Hodge R., Paul W., Scott R. (1994) The highly expressed tapetum-specific A9 gene is not required for male fertility in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 24, 97-104.

Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell Online* 9, 1963-1971.

Weijers D., Sauer M., Meurette O., Friml J., Ljung K., Sandberg G., Hooykaas P., Offringa R. (2005). Maintenance of Embryonic Auxin Distribution for Apical-Basal Patterning by PIN-FORMED-Dependent Auxin Transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 2517-2526.

Yang H., Wei Z., Xu Z. (1997). Effects of specific expression of *iaaL* gene in tobacco tapetum on pollen embryogenesis. *Science in China* 40, 384-391.

Zhang D., Liang W., Yuan Z., Li N., Shi J., Wang J., Liu Y., Yu W., Zhang D. (2008) Tapetum Degeneration Retardation is Critical for Aliphatic Metabolism and Gene Regulation during Rice Pollen Development 1(4), 599–610.

Zhang X., Henriques R., Lin S.-S., Niu Q.-W., Chua N.-H. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols* 1, 641-646.

Zhao Y., Christensen S. K., Fankhauser C., Cashman J. R., Cohen J. D., Weigel D., Chory J. (2001) A Role for Flavin Monooxygenase-Like Enzymes in Auxin Biosynthesis. *Science* 291, 306-309.