



Universidad Miguel Hernández de Elche

Departamento de Biología Aplicada

**Análisis genético del papel multifuncional de  
*PEP* y otros genes con motivos de unión a RNA  
durante el desarrollo reproductivo de  
*Arabidopsis thaliana***

**TESIS DOCTORAL**

Encarnación Rodríguez Cazorla

Sant Joan d'Alacant, 2013





Universidad Miguel Hernández de Elche  
Departamento de Biología Aplicada

**Análisis genético del papel multifuncional de  
*PEP* y otros genes con motivos de unión a  
RNA durante el desarrollo reproductivo de  
*Arabidopsis thaliana***

Encarnación Rodríguez Cazorla  
Sant Joan d'Alacant, 2013





**Análisis genético del papel multifuncional de *PEP* y otros genes con motivos de unión a RNA durante el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis thaliana***



Trabajo realizado por la Licenciada Encarnación Rodríguez Cazorla, en el Área de Genética del Campus de Sant Joan, perteneciente al Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al grado de Doctor.

Sant Joan d'Alacant, 2013



ANTONIO VERA TORNEL, Profesor Titular de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACE CONSTAR

que la Licenciada Encarnación Rodríguez Cazorla ha realizado bajo su dirección y supervisión la Tesis Doctoral con el título *Análisis genético del papel multifuncional de PEP y otros genes con motivos de unión a RNA durante el desarrollo reproductivo de Arabidopsis thaliana* que presenta para optar al Grado de Doctor. El trabajo reflejado en la presente memoria se ha desarrollado íntegramente en el Área de Genética del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Sant Joan d'Alacant a 8 de noviembre de 2013

Antonio Vera Tornel



A quien corresponda:

JOSÉ LUIS MICOL MOLINA, Catedrático de Universidad en el área de conocimiento de Genética y Director del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACE CONSTAR

que da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada Encarnación Rodríguez Cazorla, titulada *Análisis genético del papel multifuncional de PEP y otros genes con motivos de unión a RNA durante el desarrollo reproductivo de Arabidopsis thaliana*, que se ha desarrollado dentro del Programa de Doctorado de Bioingeniería de este Departamento, bajo la dirección del Prof. Dr. Antonio Vera Tornel.

Lo que firmo en Elche, a instancias del interesado y a los efectos oportunos, a 8 de noviembre de 2013.

José Luis Micol Molina  
Catedrático de Genética  
Director del Departamento de Biología Aplicada



- *Minino de Cheshire, ¿te importaría decirme qué dirección debo tomar desde aquí?*
- *Eso depende en gran medida de adónde quieres ir.*
  - *No me importa mucho adónde...*
  - *Entonces, da igual la dirección.*
  - *... con tal de que llegue a alguna parte.*
- *¡Ah!, ten la seguridad de que llegarás si andas lo bastante.*

Alicia en el País de las Maravillas (Lewis Carrol)

*Todo es más sencillo de lo que crees y al mismo tiempo es más complejo de lo que puedas imaginar.*

Wolfgang von Goethe

*Mira siempre el lado bueno de la vida.*

La vida de Brian





## **AGRADECIMIENTOS**

A Antonio Vera, por todo el apoyo que me ha brindado desde el principio, por valorar mi labor, por sus consejos y ayuda, y por el enorme esfuerzo que ha dedicado para que este trabajo llegara a buen puerto, y por supuesto, por su generosidad, cercanía y por ser algo más que mi Director de Tesis.

A Antonio Martínez, como Tutor de los cursos de Doctorado, pero sobre todo le agradezco su disponibilidad y comprensión para cualquier cuestión, científica o no.

A Antonio Vera y Antonio Martínez conjuntamente, por todo el esfuerzo e interés que han mostrado para posibilitar la buena marcha del laboratorio y facilitarnos mucho las cosas a los doctorandos.

A Santi y Alfonso, con quienes he pasado tanto tiempo y tantas cosas, por su ayuda en el laboratorio, por lo que nos hemos reído, y sobre todo por ofrecerme su hombro en los momentos malos. También agradezco las enseñanzas en mis inicios, cuando aún era estudiante, a los pasados miembros de este laboratorio, Hugo, Isabel y particularmente a Juanjo quien se ha interesado siempre por mi trabajo, por sus consejos y sus ánimos.

A Lola y Vicen, cuya ayuda y entrega me han facilitado el trabajo enormemente. Y, por supuesto, por los momentos de “charla femenina”, que a veces se necesitan entre tanto hombre.

Jose Luís Micol por su inestimable labor como Director del Departamento, y por su generosidad a la hora de utilizar su equipamiento siempre que lo hemos necesitado.

A Marcos Egea Cortines y Julia Weiss por la realización de los ensayos de doble híbrido en levaduras y por facilitarnos toda la información que hemos necesitado.

Al grupo de Marty F. Yanofsky por su importante contribución en los ensayos de BiFC reflejados en esta Tesis.

A Miguel Ángel Pérez Amador por su predisposición y colaboración en estudios transcriptómicos.

A Ricardo Granja, por su asistencia en el manejo del microscopio confocal del Instituto de Bioingeniería.

A Verónica López y Andrés Amorós, por su ayuda en el uso de los servicios de microscopía de la Universidad de Alicante.

A Esteve Soler y la empresa Cooperativa Agrícola de Callosa d'en Sarrià, por su apoyo a este proyecto.

A todos los “míos”, que siempre se han interesado por mí y por mi bienestar, por esos buenos momentos (ya sea yendo al karaoke o tomando *musi* de pato), y por tener la certeza de que puedo contar con vosotros, lo que me hace una persona muy afortunada.

Y por último a mi familia, por escucharme siempre, aunque a veces no supieran muy bien de qué estaba hablando, pero sobre todo por creer en mí en todo momento. Lo que soy se lo debo a ellos, y nunca podré agradecerles lo suficiente todo su cariño.

Este trabajo ha sido parcialmente realizado durante el disfrute de una Beca Predoctoral FPI de la Conselleria d’Empresa, Universitat i Ciència de la Generalitat Valenciana, así como de contratos asociados al Proyecto de Investigación “Análisis de genes y programas de desarrollo implicados en la morfogénesis de la flor y el fruto de *Arabidopsis thaliana*” (referencia BIO2009-11407), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.



## RESUMEN

El conocimiento del desarrollo reproductivo de las plantas, además de los numerosos retos científicos que plantea, tiene un interés aplicado y económico innegable. El éxito reproductivo de una angiosperma depende de una concatenación de procesos de desarrollo sucesivos. Éstos incluyen la decisión sobre el momento de la floración, la formación de flores, óvulos y polen, sus correspondientes gametófitos, la fertilización, la producción de frutos y semillas y, finalmente, la germinación. Para coordinar todos estos procesos es necesario integrar numerosas señales endógenas y del entorno, para lo que la planta está dotada de complejos circuitos de control genético.

Se ha progresado enormemente en la identificación de genes involucrados en cada una de estas etapas del desarrollo reproductivo, así como en dilucidar sus vínculos jerárquicos y funcionales. Muchos de estos genes codifican factores de transcripción. En todos los organismos, no obstante, cada vez resulta más evidente la importancia de actividades de regulación génica que operan postranscripcionalmente, afectando a más de un proceso molecular, incluyendo la transcripción, y aportando un mayor nivel de control y ajuste de la expresión. Algunas de estas actividades postranscripcionales participan en diversos programas fisiológicos o de desarrollo, por lo que su versatilidad podría contribuir a la coordinación entre etapas sucesivas. Con estas premisas, se planteó una estrategia de análisis genético para investigar el impacto de *PEPPER* (*PEP*) y otros genes codificantes de presuntos factores postranscripcionales durante distintas etapas del desarrollo reproductivo de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

En esta Tesis se ha continuado la caracterización genética y funcional de *PEP*, un gen que codifica un polipéptido con tres motivos de unión a RNA de tipo *K-homology* (KH). Comprobamos que *PEP* activa a *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), un gen MADS-box clave para la inhibición de la floración, por lo que antagoniza a *FLOWERING LOCUS KH DOMAIN* (*FLK*), un parálogo cercano de *PEP* y miembro de la ruta autónoma de floración. *PEP* actúa en colaboración con *HUA2*, una proteína de tipo RPR implicada en el procesamiento de pre-mRNA. Además, se muestra que las proteínas *PEP* y *FLK* interactúan físicamente.

También se muestra que *PEP* interactúa genéticamente con *HUA1*, *HUA2* y *HUA ENHANCER 4* (*HEN4*), genes previamente identificados como reguladores del gen MADS-box *AGAMOUS* (*AG*), los cuales codifican distintas proteínas de unión a RNA sin relación estructural entre sí. Diversas combinaciones de alelos mutantes *hua1*, *hua2*, *hen4* y *pep* indican que *PEP* ejerce un importante papel en el mantenimiento de la función C ejercida por *AG*, crucial para el desarrollo de la flor, al

contribuir al correcto procesamiento de su pre-mRNA. Significativamente, la proteína PEP forma heterodímeros tanto con HUA1 como con HEN4. También presentamos resultados que muestran cómo *FLK*, en lugar de actuar como antagonista, colabora con *PEP*, *HUA1* y *HUA2* en otros procesos de desarrollo, incluyendo la morfogénesis floral. Es más, *FLK* también interactúa físicamente con HUA1 y HEN4. Por tanto, proponemos la existencia de una actividad génica conjunta que hemos dado en llamar *HUA-PEP*, compuesta por factores como *PEP*, *FLK*, *HUA1*, *HUA2* y *HEN4*, que regulan a sus genes diana transcripcional y postranscripcionalmente.

Nuestro análisis genético indica que la actividad *HUA-PEP* no se detiene en la organogénesis floral y regula la adquisición de identidad de los óvulos. En consonancia, en nuestras estirpes mutantes *hua-pep* se registró un descenso de la expresión de genes MADS-box de función D, *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHP2* y *SEEDSTICK (STK)*. Llamativamente, se detectó la presencia de la proteína APETALA1 (*AP1*) en los órganos ectópicos que se forman en lugar de óvulos, insinuando una transformación de tipo sepaloide. Por último, se muestra que la perturbación de la actividad *HUA-PEP* puede interferir con el desarrollo del gametófito femenino. En conjunto, los resultados perfilan una actividad genética que opera durante el desarrollo reproductivo mediante el mantenimiento de la función de genes fundamentales en sus distintas etapas. Se discuten posibles mecanismos de acción molecular.

## RESUM

El coneixement del desenvolupament reproductiu de les plantes, a més dels nombrosos reptes científics que planteja, té un interès aplicat i econòmic innegable. L'èxit reproductiu d'una angiosperma depèn d'una concatenació de processos de desenvolupament successius. Aquests inclouen la decisió sobre el moment de la floració, la formació de flors, òvuls i pol·len i els seus corresponents gametòfits, la fertilització, la producció de fruits i llavors, i finalment, la germinació. Per a coordinar tots aquests processos és necessari integrar nombroses senyals endògenes i del entorn, i per això la planta posseeix complexos circuits de control genètic.

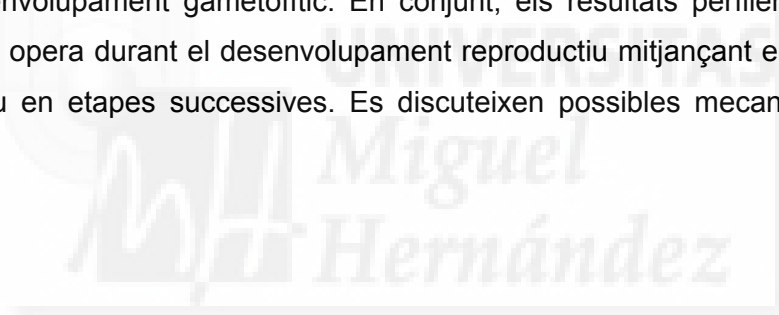
S'ha progressat enormement en la identificació de gens involucrats en cadascuna d'aquestes etapes del desenvolupament reproductiu, així com en dilucidar els seus vincles jeràrquics i funcionals. Molts d'aquests gens codifiquen factors de transcripció. En tots els organismes, en canvi, cada vegada resulta més evident la importància d'altres activitats de regulació genètica que operen postranscripcionalment, afectant a més d'un procés molecular, incloent la transcripció, i aportant un major nivell de control i ajustament de l'expressió. Algunes d'aquestes activitats postranscripcionals participen diversos programes fisiològics o de desenvolupament, per la qual cosa la seva versatilitat podria contribuir a la coordinació entre etapes successives. Amb aquestes premisses, es plantejà una estratègia d'anàlisi genètic per investigar l'impacte de *PEPPER* (*PEP*) i altres gens codificants de presumptes factors postranscripcionals durant distintes etapes del desenvolupament reproductiu de la planta model *Arabidopsis thaliana*.

En aquesta Tesi s'ha continuat la caracterització genètica i funcional de *PEP*, un gen que codifica un polipèptid amb tres motius d'unió a RNA de tipus *K-homology* (*KH*). Comprovarem que *PEP* activa *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), un gen *MADS-box* clau per a la inhibició de la floració, antagonitzant amb *FLOWERING LOCUS KH DOMAIN* (*FLK*), un paràlog proper de *PEP* i membre de la ruta autònoma de floració. *PEP* actua en col·laboració amb *HUA2*, una proteïna de tipus *RPR* implicada en el processament del pre-mRNA. A més, mostrem que les proteïnes *PEP* i *FLK* interaccionen físicament.

També es mostra que *PEP* interactua genèticament amb *HUA1*, *HUA2* i *HUA ENHANCER 4* (*HEN4*), gens prèviament identificats com reguladors del gen *MADS-box* *AGAMOUS* (*AG*), els quals codifiquen distintes proteïnes d'unió a RNA sense relació estructural entre si. Diverses combinacions d'al·lels mutants *hua1*, *hua2*, *hen4* i *pep* indiquen que *PEP* posseeix un important paper en el manteniment de la funció *C* exercida per *AG*, crucial per al desenvolupament de la flor, ja que en contribueix al

correcte processament del seu pre-mRNA. Significativament, la proteïna PEP forma heterodimers tant amb HUA1 com amb HEN4. També presentem resultats que mostren com *FLK*, en comptes d'actuar com antagonista, col·labora amb *PEP*, *HUA1* i *HUA2* en altres processos del desenvolupament, incloent la morfogènesi floral. És més, *FLK* també interactua físicament amb *HUA1* i *HEN4*. Per tant, proposem l'existència d'una activitat gènica conjunta que hem anomenat *HUA-PEP*, composta per factors com *PEP*, *FLK*, *HUA1*, *HUA2* i *HEN4* que regulen els seus gens diana transcripcional i postranscripcionalment.

El nostre anàlisi genètic indica que l'activitat *HUA-PEP* no s'atura a l'organogènesi floral i regula l'adquisició d'identitat dels òvuls. Consonantment, en les nostres estirps mutants *hua-pep* es va registrar un descens de l'expressió de gens MADS-box de funció D, *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHP2* i *SEEDSTICK (STK)*. Destacablement, es va detectar la presència de la proteïna APETALA1 (AP1) al òrgans ectòpics que es formen en lloc dels òvuls, insinuant una transformació de tipus sepaloide. Per últim, es mostra que la pertorbació de l'activitat *HUA-PEP* pot interferir amb el desenvolupament gametofític. En conjunt, els resultats perfilen una activitat genètica que opera durant el desenvolupament reproductiu mitjançant el manteniment de gens clau en etapes successives. Es discuteixen possibles mecanismes d'acció molecular.



## SUMMARY

Knowledge on plant reproduction, in addition to being a challenge for basic research it is of great applied and economic interest. In angiosperms, reproductive success relies on a series of successive developmental processes. These encompass flowering time control, flower morphogenesis, ovule and pollen grain formation, gametophyte development, fertilization, seed and fruit production, and seed germination. To orchestrate these operations it becomes necessary to integrate numerous endogenous and environmental cues. To cope with this need plants are endowed with complex genetic regulatory networks.

A great deal of progress has led to the identification of multiple genes involved in every stage of plant reproductive development, their hierarchical organization and functional characterization. Many of them encode transcription factors. In all organisms, however, it is becoming increasingly evident the important roles played by other types of gene regulatory activities based on post-transcriptional control. These often impinge on more than one molecular operation (including transcription), thus providing additional layers of control and contributing to fine-tune gene expression to meet the cell requirements. Some of these post-transcriptional activities participate in various physiological or developmental processes, and this versatility might be important to coordinate different developmental programs. Bearing this in mind, we initiated a genetic approach to elucidate the impact of *PEPPER* (*PEP*) and other genes coding for post-transcriptional factors during diverse phases of reproductive development in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

We have conducted a genetic, molecular and functional study of *PEP*, a gene encoding a polypeptide with three K-homology (KH) RNA-binding motifs. In doing so, we have revealed that *PEP* upregulates the MADS-box gene *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), a central repressor of flowering, thus counteracting *FLOWERING LOCUS KH DOMAIN* (*FLK*), a close *PEP* paralog and member of the autonomous flowering pathway. *PEP* acts in concert with *HUA2*, an RPR motif protein involved in pre-mRNA processing. In addition, physical interplay between *PEP* and *FLK* is shown.

We also show that *PEP* interacts with previously identified *AGAMOUS* (*AG*) regulators *HUA1*, *HUA2* and *HUA ENHANCER 4* (*HEN4*) coding for distinct structurally unrelated RNA-binding proteins. Mutant combinations of *hua1*, *hua2*, *hen4* and *pep* alleles indicate that *PEP* is an important contributor to flower C function maintenance exerted by MADS-box gene *AG*, crucial for flower development, by promoting adequate processing of its pre-mRNA. Importantly, *PEP* interacts with both *HUA1* and *HEN4* at the protein level. We also present data indicating that *FLK*, rather than antagonizing,

cooperates with *PEP*, *HUA1* and *HUA2* in other developmental operations including flower morphogenesis. Moreover, *FLK* physically interacts with *HUA1* and *HEN4* as well. Hence, we propose the existence of a common *HUA-PEP* gene activity, comprising cooperative factors as *PEP*, *FLK*, *HUA1*, *HUA2* and *HEN4* which regulate target genes at the transcriptional and post-transcriptional levels.

We present data indicating that *HUA-PEP* activity extends beyond flower organogenesis, regulating ovule identity. Congruently, diminished expression of D-function *AG*-related genes *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHP2* and *SEEDSTICK* (*STK*) was observed in *hua-pep* mutant strains. Of note, *APETALA1* (*AP1*) protein was detected in ectopic organs replacing ovules, suggesting sepal-oriented conversion. Finally, we also show that compromised *HUA-PEP* activity may lead to gametophyte disruption. Taken together, our results delineate an activity backing reproductive development by maintenance of crucial gene functions in successive stages. Possible mechanisms at the molecular level are discussed.





# ÍNDICES





## ÍNDICES

### ÍNDICE DE MATERIAS

<b>I.- ABREVIATURAS, NOTAS Y ACLARACIONES PREVIAS .....</b>	<b>1</b>
ANEXO I.- Abreviaturas .....	4
<b>II.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
II.1.- EL DESARROLLO .....	9
II.2.- EL DESARROLLO VEGETAL .....	10
II.3.- EL CICLO DE VIDA DEL ORGANISMO MODELO <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
II.3.1.- Los meristemos y el desarrollo vegetativo .....	12
II.3.2.- La floración .....	15
II.3.3.- Especificación del meristemo floral .....	18
II.3.4.- Morfogénesis floral: identidad de órgano y determinación del meristemo .....	20
II.3.5.- Morfogénesis floral: estructura y desarrollo del gineceo .....	23
II.3.6.- Desarrollo del óvulo y el gametófito femenino .....	26
II.4.- CONTROL POSTRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEÍNAS DE UNIÓN A RNA .....	30
II.5.- EL DOMINIO KH DE UNIÓN A RNA Y LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	33
II.6.- GENES KH EN <i>Arabidopsis</i> .....	35
II.7.- ANTECEDENTES .....	38
<b>III.- OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>IV.- RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
IV.1.- CAPÍTULO 1. EL GEN <i>PEP</i> ES UN REGULADOR DE LA TRANSICIÓN FLORAL .....	47
IV.1.1.- Las mutaciones <i>pep</i> rescatan el fenotipo de floración tardía de las plantas <i>flk</i> .....	47
IV.1.2.- La sobreexpresión de <i>PEP</i> recuerda a los mutantes de pérdida de función de la ruta autónoma .....	48
IV.1.3.- <i>PEP</i> coopera con <i>HUA2</i> activando a <i>FLC</i> .....	51
IV.1.4.- <i>PEP</i> y <i>FLK</i> podrían operar en una ruta común regulando a <i>FLC</i> .....	53
IV.1.5.- La proteína <i>PEP</i> presenta localización celular .....	55
IV.1.6.- Las proteínas <i>PEP</i> y <i>FLK</i> interaccionan físicamente .....	56
IV.2.- CAPÍTULO 2. EL GEN <i>PEP</i> PROMUEVE EL CORRECTO DESARROLLO DE LOS ÓRGANOS FLORALES Y LA FUNCIÓN DEL MERISTEMO FLORAL .....	59

IV.2.1.- Razones y precedentes para el estudio de <i>PEP</i> en relación a la morfogénesis floral .....	59
IV.2.2.- Las interacciones genéticas de <i>pep</i> con alelos mutantes <i>hen4</i> , <i>hua1</i> y <i>hua2</i> sugieren la contribución de <i>PEP</i> al mantenimiento de la función C .....	59
IV.2.2.1.- El doble mutante <i>hen4 pep</i> .....	60
IV.2.2.2.- El doble mutante <i>hua1 pep</i> .....	61
IV.2.2.3.- Estudio de las plantas <i>hen4 hua1 pep/+</i> .....	63
IV.2.2.4.- La eliminación completa y simultánea de las funciones <i>HUA2</i> y <i>PEP</i> no es viable .....	65
IV.2.2.5.- Estudio de las plantas <i>hua1 hua2 pep/+</i> .....	67
IV.2.2.6.- <i>PEP</i> contribuye a mantener los niveles del mRNA de <i>AG</i> .....	71
IV.2.2.7.- Antagonismo de las funciones A y C en el doble mutante <i>hua1 pep</i> . Expresión territorial de las proteínas <i>AG</i> y <i>AP1</i> .....	73
IV.2.2.8.- La actividad <i>HUA-PEP</i> en el desarrollo floral de <i>Arabidopsis</i> . Efecto de dosis génica y redundancia funcional entre los genes <i>HUA-PEP</i> .....	77
IV.2.2.9.- La actividad <i>HUA-PEP</i> en otro contexto del desarrollo floral. El mutante <i>fruitfull (ful)</i> .....	78
IV.2.2.9.1.- La aparición del fenotipo <i>Ful</i> precisa de la actividad <i>HUA-PEP</i> .....	78
IV.2.2.9.2.- La pérdida de la función <i>HUA-PEP</i> modifica el patrón de expresión de <i>FUL</i> .....	82
IV.2.2.9.3.- La pérdida de la función <i>HUA-PEP</i> modifica el patrón de lignificación en el mutante <i>ful</i> .....	84
IV.2.3.- Efecto de la sobreexpresión de <i>PEP</i> durante la morfogénesis floral .....	85
IV.2.3.1.- Sobreexpresión de <i>PEP</i> en el fondo mutante <i>hua1 hua2</i> .....	86
IV.2.3.2.- Expresión de <i>AG</i> en las plantas <i>hua1 hua2 35S::PEP</i> .....	88
IV.2.3.3.- El fenotipo de las flores <i>hua1 hua2 35S::PEP</i> no se debe a un efecto de silenciamiento de <i>PEP</i> .....	88
IV.2.3.4.- Disminución del mRNA efectivo de <i>AG</i> e incremento de transcritos con retención de secuencias intrónicas .....	89
IV.2.3.5.- La sobreexpresión de <i>PEP</i> podría perturbar el equilibrio entre los componentes de la actividad <i>HUA-PEP</i> .....	92
IV.2.3.6.- Sobreexpresión de <i>PEP</i> en el fondo mutante <i>hen4 hua1</i> .....	93
IV.2.3.7.- Sobreexpresión de <i>PEP</i> en el fondo mutante <i>hua1 ag/+</i> .....	94
IV.2.3.8.- <i>PEP</i> interacciona físicamente con <i>HUA1</i> y <i>HEN4</i> .....	95
IV.3.- CAPÍTULO 3. LOS GENES <i>HUA-PEP</i> REGULAN EL DESARROLLO DE LOS ÓVULOS Y EL GAMETÓFITO FEMENINO .....	98
IV.3.1.- La actividad <i>HUA-PEP</i> controla la identidad de los óvulos .....	98

IV.3.2.- La actividad <i>HUA-PEP</i> afecta a la expresión de genes de la función D (identidad de óvulo).....	102
IV.3.3.- Expresión de AP1 en óvulos <i>hua1 pep</i> .....	104
IV.3.4.- <i>FLK</i> : un nuevo integrante de la actividad <i>HUA-PEP</i> .....	106
IV.3.4.1.- <i>FLK</i> actúa junto a <i>PEP</i> y <i>HUA2</i> regulando el desarrollo de los óvulos .....	107
IV.3.4.2.- <i>FLK</i> también afecta a la adquisición de identidad de óvulo .....	109
IV.3.4.3.- El triple mutante <i>flk hua1 hua2</i> revela funciones de <i>FLK</i> en la morfogénesis floral .....	110
IV.3.4.4.- Interacción física de <i>FLK</i> con proteínas <i>HUA-PEP</i> ( <i>HUA1</i> y <i>HEN4</i> ).....	112
IV.3.5.- La actividad <i>HUA-PEP</i> y la viabilidad del gametófito femenino .....	113
IV.3.5.1.- <i>PEP</i> y <i>HUA2</i> desempeñan funciones cruciales para el desarrollo del gametófito femenino .....	113
IV.3.5.2.- La interacción genética con <i>AG</i> revela un papel crítico de <i>PEP</i> en la viabilidad de los óvulos .....	116
<b>V.- DISCUSIÓN</b> .....	<b>121</b>
V.1.- POSICIÓN DE <i>PEP</i> EN EL CONTROL DE LA TRANSICIÓN FLORAL .....	124
V.2.- <i>PEP</i> INTERVIENE EN LA MORFOGÉNESIS FLORAL COMO REGULADOR POSITIVO DE LA ACTIVIDAD C .....	126
V.3.- LA ACTIVIDAD <i>HUA-PEP</i> : UN CASO DE REDUNDANCIA FUNCIONAL ENTRE GENES NO RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE.....	128
V.4.- EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE <i>PEP</i> ES CRÍTICO EN EL CONTEXTO DE LA ACTIVIDAD <i>HUA-PEP</i> .....	129
V.5.- LA ACTIVIDAD <i>HUA-PEP</i> AFECTA AL DESARROLLO DE LOS ÓVULOS CONTROLANDO LA ESPECIFICACIÓN DE SU IDENTIDAD .....	131
V.6.- LA ACTIVIDAD <i>HUA-PEP</i> CONDICIONA LA VIABILIDAD DE LOS ÓVULOS AL MARGEN DE LAS CONVERSIONES HOMEÓTICAS Y AFECTA AL DESARROLLO DEL GAMETÓFITO FEMENINO .....	134
V.7.- <i>FLK</i> , UN MIEMBRO ADICIONAL DE LA ACTIVIDAD <i>HUA-PEP</i> .....	136
V.8.- MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE <i>PEP</i> Y EL CONJUNTO DE LA ACTIVIDAD <i>HUA-PEP</i> .....	137
<b>VI.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>143</b>
<b>VII.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>147</b>
VII.1.- ORGANISMOS UTILIZADOS.....	149
VII.1.1.- <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	149
VII.1.1.1.- Estirpes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	149

VII.1.1.2.- Cultivo en placas de Petri.....	150
VII.1.1.3.- Cultivo en maceta.....	150
VII.1.1.4.- Realización de cruzamientos.....	151
VII.1.1.5.- Medidas de tiempo de floración.....	151
VII.1.1.6.- Tratamiento de vernalización.....	152
VII.1.1.7.- Tratamiento con giberelinas (GA).....	152
VII.1.1.8.- Selección de plantas resistentes a Basta.....	152
VII.1.2.- Organismos bacterianos.....	153
VII.1.2.1.- Estirpes utilizadas.....	153
VII.1.2.2.- Condiciones de cultivo de los organismos bacterianos.....	153
VII.2.- MEDIOS DE CULTIVO, DISOLUCIONES Y TAMPONES.....	153
VII.2.1.- Medios de cultivo.....	153
VII.2.1.1.- Medio de germinación de <i>Arabidopsis</i> (Medio GM).....	153
VII.2.1.2.- Medio mínimo ATM ( <i>Arabidopsis thaliana</i> Medium).....	154
VII.2.1.3.- Sustrato para el cultivo de <i>Arabidopsis</i> en maceta.....	154
VII.2.1.4.- Medio LB ( <i>Luria-Bertani medium</i> ).....	154
VII.2.1.5.- Medio LB sólido.....	154
VII.2.1.6.- Medio LB suplementado con antibiótico.....	155
VII.2.2.- Disoluciones y tampones.....	155
VII.2.2.1.- Antibióticos.....	155
VII.2.2.2.- Solución de giberelina.....	155
VII.2.2.3.- X-gal 2%.....	155
VII.2.2.4.- Solución de infiltración.....	155
VII.2.2.5.- Soluciones para técnicas histológicas.....	156
VII.2.2.5.1- Solución FAE (Formaldehído-Acético-Etanol).....	156
VII.2.2.5.2.- Soluciones de <i>JB4 Embedding Kit</i> .....	156
VII.2.2.5.3.- Soluciones para visualización en microscopio confocal.....	156
VII.2.2.5.4.- Disoluciones para ensayos GUS.....	156
VII.2.2.5.5.- Solución de floroglucinol 2%.....	157
VII.2.2.5.6.- Soluciones para la tinción de Alexander.....	157
VII.2.2.5.7.- Solución de aclarado Hoyer.....	157
VII.2.2.6.- Tampón de extracción de DNA.....	157
VII.2.2.7.- Disoluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa.....	157
VII.3.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS.....	158
VII.3.1.- Fotografías de bajo aumento.....	158
VII.3.2.- Microscopía óptica.....	158
VII.3.2.1.- Inclusión en resina JB4.....	158
VII.3.2.2.- Inclusión en parafina.....	159
VII.3.3.- Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	160

VII.3.4.- Fotografías de microscopio confocal.....	160
VII.3.5.- Tinción GUS .....	160
VII.3.6.- Tinción de ligninas con floroglucinol.....	161
VII.3.7.- Tinción con solución de Alexander.....	161
VII.4.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	161
VII.4.1.- Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	161
VII.4.2.- Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> .....	162
VII.4.3.- Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa .....	162
VII.4.4.- Tratamiento de DNA con enzimas de restricción .....	162
VII.4.5.- Reacciones de ligación de DNA.....	162
VII.4.6.- Aislamiento de RNA total de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	163
VII.4.7.- Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado .....	163
VII.4.8.- Electroforesis en gel de agarosa .....	164
VII.4.9.- Secuenciación de DNA.....	164
VII.4.10.- Análisis informático de las secuencias de ácidos nucleicos .....	164
VII.5.- SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	165
VII.5.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	165
VII.5.2.- Amplificación rápida de los extremos del cDNA 3' (3' RACE) .....	165
VII.5.3.- Retrotranscripción.....	166
VII.5.4.- PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	166
VII.6.- ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA .....	166
VII.6.1.- Ensayo de doble híbrido en levadura ( <i>Yeast two hybrid</i> , Y2H).....	166
VII.6.2.- Ensayo de fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC).....	167
VII.7.- GENERACIÓN DE PLANTAS CON LA CONSTRUCCIÓN <i>35S::GFP-PEP</i> .....	168
VII.8.- TRANSFORMACIÓN BACTERIANA .....	169
VII.8.1.- Transformación por choque térmico.....	169
VII.8.2.- Electroporación.....	169
VII.9.- TRANSFORMACIÓN DE <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	169
VII.10.- ENSAYO DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA .....	170
VII.11.- GENOTIPADOS DE LAS ESTIRPES MUTANTES.....	170
VII.11.1.- Genotipados moleculares.....	170
VII.11.2.- Otros métodos de genotipado .....	171
VII.12.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	171
VII.12.1.- Prueba $\chi^2$ .....	171
VII.12.2.- Análisis estadístico de los experimentos de qPCR.....	172
VII.13.- OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS .....	172
<b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Organismos modelo utilizados en genética del desarrollo .....	10
<b>Figura 2.-</b> Ciclo de vida de <i>Arabidopsis</i> .....	13
<b>Figura 3.-</b> El meristemo apical del tallo (SAM).....	14
<b>Figura 4.-</b> Roseta silvestre de 14 días.....	14
<b>Figura 5.-</b> Meristemo de inflorescencia y meristemo floral de <i>Arabidopsis</i> .....	15
<b>Figura 6.-</b> Regulación del tiempo de floración.....	16
<b>Figura 7.-</b> Representación de la ruta autónoma de la floración de <i>Arabidopsis</i> .....	17
<b>Figura 8.-</b> Etapas del desarrollo de la flor y el fruto de <i>Arabidopsis</i> .....	18
<b>Figura 9.-</b> El modelo ABCE de desarrollo floral.....	20
<b>Figura 10.-</b> Flor silvestre y flores de plantas con mutaciones en elementos del sistema ABCE.....	21
<b>Figura 11.-</b> Terminación del meristemo floral.....	22
<b>Figura 12.-</b> Flor, gineceo y estambres de <i>Arabidopsis</i> .....	23
<b>Figura 13.-</b> Tejidos que conforman el gineceo .....	24
<b>Figura 14.-</b> La zona de dehiscencia .....	24
<b>Figura 15.-</b> Fenotipos de los mutantes <i>ful</i> , <i>rpl</i> y <i>shp1 shp2</i> .....	25
<b>Figura 16.-</b> Modelo del establecimiento del patrón medio-lateral del fruto de <i>Arabidopsis</i> .....	26
<b>Figura 17.-</b> Desarrollo del gametófito femenino .....	27
<b>Figura 18.-</b> Óvulos silvestres .....	28
<b>Figura 19.-</b> Fenotipos en el óvulo del triple mutante <i>stk shp1 shp2</i> .....	29
<b>Figura 20.-</b> Esquema en el que se representan diversos procesos de control de la expresión génica en los que participan proteínas de unión a RNA .....	31
<b>Figura 21.-</b> Ejemplos de poliadenilación alternativa.....	32
<b>Figura 22.-</b> El dominio KH .....	33
<b>Figura 23.-</b> Esquema de la cascada de activación de la quinasa ERK.....	34
<b>Figura 24.-</b> Fenotipos causados por las mutaciones <i>hua1</i> , <i>hua2</i> y <i>hen4</i> .....	36
<b>Figura 25.-</b> Esquema de las proteínas PEP y FLK, y de sus presuntos ortólogos en arroz.....	37
<b>Figura 26.-</b> Fenotipos de los mutantes dobles <i>clv pep</i> .....	38
<b>Figura 27.-</b> Visualización de la expresión de <i>PEP</i> en plantas silvestres (Col-0) mediante el uso de la construcción <i>PEP::GUS</i> .....	39
<b>Figura 28.-</b> Las mutaciones <i>pep</i> rescatan el fenotipo de floración lenta de <i>flk</i> .....	48
<b>Figura 29.-</b> La sobreexpresión de <i>PEP</i> retrasa la floración .....	49
<b>Figura 30.-</b> La mutación <i>flc-3</i> es epistática sobre la sobreexpresión de <i>PEP</i> .....	50
<b>Figura 31.-</b> La pérdida de <i>HUA2</i> también rescata a <i>flk</i> .....	52
<b>Figura 32.-</b> <i>FLK</i> y <i>PEP</i> actúan de forma independiente respecto a <i>FCA</i> .....	54
<b>Figura 33.-</b> El efecto de la mutación <i>fca-9</i> es aditivo con respecto a la sobreexpresión de <i>PEP</i> .....	55
<b>Figura 34.-</b> La proteína <i>PEP</i> exhibe localización nuclear .....	56



<b>Figura 35.-</b> Interacción física entre FLK y PEP .....	57
<b>Figura 36.-</b> Fenotipos florales del doble mutante <i>hen4 pep-4</i> .....	60
<b>Figura 37.-</b> Fenotipo de <i>hua1 pep-4</i> en la roseta .....	61
<b>Figura 38.-</b> Fenotipos florales en el doble mutante <i>hua1 pep-4</i> .....	62
<b>Figura 39.-</b> Indeterminación del meristemo floral en <i>hua1 pep-4</i> .....	63
<b>Figura 40.-</b> Fenotipos florales del sesquimutante <i>hen4 hua1 pep-4/+</i> (1) .....	64
<b>Figura 41.-</b> Fenotipos florales del sesquimutante <i>hen4 hua1 pep-4/+</i> (2) .....	65
<b>Figura 42.-</b> Expresión relativa del mRNA de <i>HUA2</i> en plantas silvestres (WT) y en el mutante <i>hua2-4</i> .....	66
<b>Figura 43.-</b> Fenotipos del doble mutante <i>hua1 hua2-7</i> y del sesquimutante <i>hua1 hua2-7 pep-4/+</i> en el tercer verticilo floral .....	67
<b>Figura 44.-</b> Fenotipos del doble mutante <i>hua1 hua2</i> y del sesquimutante <i>hua1 hua2 pep- 4/+</i> respecto al gineceo .....	68
<b>Figura 45.-</b> Fenotipos de indeterminación del meristemo floral en el sesquimutante <i>hua1 hua2-7 pep-4/+</i> .....	70
<b>Figura 46.-</b> Expresión relativa del mRNA de los genes <i>AG</i> , <i>SPLINZZ</i> y <i>KNU</i> en inflorescencias silvestres (WT) y de distintos fondos mutantes mediante qPCR .....	72
<b>Figura 47.-</b> Detección de la proteína AG-GFP en pistilos y óvulos silvestres.....	74
<b>Figura 48.-</b> Detección de AP1-GFP en plantas silvestres.....	75
<b>Figura 49.-</b> Detección de la proteína AP1-GFP en pistilos del mutante <i>hua1 pep-4</i> .....	76
<b>Figura 50.-</b> Fenotipos florales del sesquimutante <i>hen4 hua1 hua2-1/+ pep-4/+</i> .....	77
<b>Figura 51.-</b> Las mutaciones en los genes de la actividad <i>HUA-PEP</i> modifican el fenotipo Ful <sup>1</sup> (1) .....	79
<b>Figura 52.-</b> Las mutaciones en los genes de la actividad <i>HUA-PEP</i> modifican el fenotipo Ful <sup>1</sup> (2) .....	81
<b>Figura 53.-</b> Patrón de expresión de <i>FUL</i> mediante tinción GUS en distintos fondos mutantes.....	83
<b>Figura 54.-</b> Tinción de ligninas con floroglucinol en el silvestre, el mutante simple <i>ful-1</i> y el sesquimutante <i>ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+</i> .....	85
<b>Figura 55.-</b> Fenotipos de las flores <i>hua1 hua2-7 35S::PEP</i> .....	87
<b>Figura 56.-</b> Estudio de la expresión de RNA mediante qPCR de los genes <i>AG</i> , <i>SPLINZZ</i> , <i>KNU</i> y <i>PEP</i> en inflorescencias silvestres (WT) y de distintos fondos mutantes.....	88
<b>Figura 57.-</b> Las mutaciones en los genes de la actividad <i>HUA-PEP</i> conducen a un incremento de transcritos aberrantes de <i>AG</i> con retención de secuencias intrónicas .....	90
<b>Figura 58.-</b> Esquema parcial de la secuencia del gen <i>AG</i> en el que se muestra la región donde se produce corte y poliadenilación prematura en el intrón 2 .....	91
<b>Figura 59.-</b> Fenotipos del mutante <i>hen4 hua1 35S::PEP</i> .....	93
<b>Figura 60.-</b> Efecto de la sobreexpresión de <i>PEP</i> en un fondo <i>hua1 ag/+</i> .....	95

<b>Figura 61.-</b> La proteína PEP interacciona físicamente con HUA1 y HEN4. Ensayos de detección de la fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC) .....	96
<b>Figura 62.-</b> Defectos de la identidad de óvulo en diversos genotipos.....	100
<b>Figura 63.-</b> Detección de la expresión del gen <i>FUL</i> mediante tinción GUS en conversiones homeóticas de óvulos .....	101
<b>Figura 64.-</b> Expresión relativa de RNA cuantificada mediante qPCR en inflorescencias silvestres y de distintas estirpes mutantes.....	103
<b>Figura 65.-</b> Detección de las proteínas AG-GFP y AP1-GFP en plantas silvestres y dobles mutantes <i>hua1 pep-4</i> , mediante microscopía confocal.....	105
<b>Figura 66.-</b> Fenotipos en el fruto provocados por la interacción de mutaciones <i>flk</i> , <i>hua2</i> y <i>pep</i> .....	107
<b>Figura 67.-</b> Fenotipos de pérdida de la identidad de óvulo en el triple mutante <i>flk hua2-4 pep-4</i> .....	110
<b>Figura 68.-</b> Fenotipos del triple mutante <i>flk hua1 hua2-7</i> .....	111
<b>Figura 69.-</b> La proteína FLK interacciona físicamente con HUA1 y HEN4 .....	112
<b>Figura 70.-</b> <i>HUA2</i> y <i>PEP</i> son importantes para la viabilidad del gametófito femenino .....	114
<b>Figura 71.-</b> El polen del sesquimutante <i>hua2-7 pep-4/+</i> es viable .....	115
<b>Figura 72.-</b> Interacción de <i>pep-4</i> con <i>ag-12</i> .....	117
<b>Figura 73.-</b> Modelo esquemático de las interacciones de <i>FLK</i> y <i>PEP</i> en el contexto de la ruta autónoma de floración de <i>Arabidopsis</i> .....	125
<b>Figura 74.-</b> Modelo de la actuación de la actividad HUA-PEP durante la transcripción evitando una poliadenilación prematura del RNA .....	140
<b>Figura 75.-</b> La actividad <i>HUA-PEP</i> afecta positivamente a la función de <i>AG</i> .....	141
<b>Figura 76.</b> Cultivo en placa de <i>Arabidopsis</i> .....	150
<b>Figura 77.-</b> Plantas de <i>Arabidopsis</i> cultivadas en maceta .....	151
<b>Figura 78.-</b> Análisis cualitativo y cuantitativo de RNA total en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.....	163
<b>Figura 79.-</b> Plásmidos utilizados en los experimentos de BiFC .....	168

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Estadios florales .....	19
<b>Tabla 2.-</b> Recuento de distintos rasgos fenotípicos florales en <i>hua1 hua2-7 pep-4/+</i> .....	69
<b>Tabla 3.-</b> Recuento de distintos rasgos fenotípicos florales <i>hua1 hua2-7 35S::PEP</i> .....	86
<b>Tabla 4.-</b> Abortos de óvulos y semillas en combinaciones mutantes entre <i>flk</i> , <i>hua2</i> y <i>pep</i> .....	109
<b>Tabla 5.-</b> Abortos de óvulos en <i>ag-12</i> y otros mutantes .....	118
<b>Tabla 6.-</b> Líneas mutantes utilizadas .....	149
<b>Tabla 7.-</b> Líneas de sobreexpresión y marcadoras .....	149
<b>Tabla 8.-</b> Agentes selectores utilizados .....	155
<b>Tabla 9.-</b> Genotipado de alelos de inserción .....	171
<b>Tabla 10.-</b> Genotipado de otros alelos.....	171
<b>Tabla 11.-</b> Oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de esta Tesis.....	172





# **I.- ABREVIATURAS, NOTAS Y ACLARACIONES PREVIAS**

*MH Miguel Hernández*



## I.- ABREVIATURAS, NOTAS Y ACLARACIONES PREVIAS

Para simplificar, a lo largo de esta memoria nos referiremos abundantemente al organismo objeto de estudio, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., como *Arabidopsis*.

Para la realización de este trabajo se han seguido las recomendaciones de Meinke y Koornneeff (1997) para la notación genética de *Arabidopsis*. Así, por ejemplo *PEPPER* (*PEP*) representa al gen, la función génica o el alelo silvestre *PEP*, mientras que *PEP* (sin cursiva) hace referencia a la proteína silvestre. Igualmente *pep-2* y *pep-4* representan alelos mutantes. La notación *Pep*<sup>-</sup> se referiría al fenotipo de pérdida de función *PEP* (la primera letra mayúscula y con tipografía normal).

Cuando se ha utilizado más de un alelo mutante correspondiente a un mismo gen de *Arabidopsis* se indica en todos los casos (ejemplo: alelos *hua2-1*, *hua2-4* y *hua2-7* del gen *HUA2*). En algunas ocasiones, y para simplificar, cuando sólo se ha empleado reiteradamente un alelo mutante representativo, tras indicar su identidad inicialmente, se ha utilizado el símbolo correspondiente sin referencia al alelo específico (ejemplos: el alelo *flk-2* del gen *FLK* se describe como *flk*; *hen4-2* como *hen4*; y *hua1-1* como *hua1*).

Para definir una estirpe homocigótica, silvestre o mutante, se ha usado el símbolo del alelo correspondiente. Así, las plantas *PEP* son homocigotas silvestres, mientras que los individuos *pep-4* son homocigóticos para la mutación *pep-4*. Las plantas *flk pep-4* se corresponderían con un doble homocigoto para las mutaciones *flk* y *pep-4*. Los heterocigotos se han referido, salvo específicamente en la sección IV.3.5.1, con el símbolo de la mutación seguido de una barra y el signo +, representando al alelo silvestre. Por ejemplo, el sesquimutante *hua1 hen4 pep-4/+* es homocigótico para las mutaciones *hua1* y *hen4*, y heterocigótico respecto a la mutación *pep-4*.

En este trabajo se emplean diversos mutantes y otras líneas transgénicas originados por la inserción, casi siempre, de elementos derivados del T-DNA de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Por tanto, las estirpes que contienen sólo un alelo afectado por una de estas inserciones se deben definir, en sentido estricto, como hemicigóticas. No obstante, a lo largo de esta memoria se usan indistintamente los términos hemicigótico y heterocigótico para referirse a estas situaciones.

Para señalar la estirpe silvestre de referencia se ha usado profusamente la notación WT (*Wild Type*) en gráficas, tablas y figuras.

## ANEXO I.- Abreviaturas

‰: por ciento

°C: grados Celsius

µg: microgramo

µg/ml: miligramo por mililitro

µl: microlitro

µm: micrometro

µM: micromolar

µmol/m<sup>2</sup>sec: micromol por metro cuadrado por segundo

A: adenina

AD: dominio de activación (*Activation Domain*)

Basta: glufosinato de amonio

BD: dominio de unión (*Binding Domain*)

C: citosina

cDNA: DNA complementario

cm: centímetro

CK: citoquininas

Col-0: Columbia-0

ct: extremo C-terminal de la YFP

CTD: dominio carboxilo terminal (*Carboxyl Terminal Domain*) de la RNA polimerasa II

C-terminal: carboxilo terminal

DE: desviación estándar

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNasa: desoxirribonucleasa

dNTP: desoxirribonucleósidos trifosfato

eds.: editores

EDTA: etilen-diamino-tetraacetato sódico

EMS: etilmetanosulfonato o metano sulfonato de etilo

*et al.*: y otros

Fig.: figura



Figs.: figuras

g: gramo

G: guanina

g/L: gramo por litro

GA: giberelinas

GA3: ácido giberélico

GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

Kan<sup>R</sup>: resistencia a kanamicina

Kb: kilobase

KH: *K homology*

hnRNP: ribonucleoproteína heterogénea nuclear (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein*)

KPa: kilopascal

L: litro

LB: medio Luria Bertani o *Lysogeny Broth*

LD: día largo (*Long Day*)

Ler: *Landsberg erecta*

M: molar

MADS-box: siglas de un dominio proteico derivado de los genes *MCM1* (*Saccharomyces cerevisiae*), *AGAMOUS* (*Arabidopsis thaliana*), *DEFICIENS* (*Antirrhinum majus*) y *SRF* (*Homo sapiens*)

mb: milibares

mg: miligramo

mg/ml: miligramo por mililitro

ml: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MMC: célula madre de la megaspora (*Megaspore Mother Cell*)

mRNA: RNA mensajero

m/v: masa por volumen

ng: nanogramo

nm: nanometro

nt: extremo N-terminal de la YFP

N-terminal: amino terminal

OD: densidad óptica (*Optical Density*)

pb: pares de bases

PCBP: proteínas de unión a poliC (*Poly(C)-Binding Proteins*)

pmol/μl: picomol por microlitro

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR: PCR cuantitativa

RBP: proteína de unión a RNA (*RNA Binding protein*)

RNA: ácido ribonucleico

RNasa: ribonucleasa

RNB: unión a RNA (*RNA Binding*)

rpm: revoluciones por minuto

RPR: *Regulation of nuclear pre-mRNA*

RRM: *RNA Recognition Motif*

RT-PCR: retrotranscripción seguida de PCR

SAM: meristemo apical del tallo (*Shoot Apical Meristem*)

SD: día corto (*Short Day*)

SEM: microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*)

T: timina

TAE: Tris-Acético-EDTA

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

U.: unidad enzimática

U: uracilo

UTR: región no traducida (*UnTranslated Region*)

UV: ultravioleta

V: voltios

v/v: volumen por volumen

YFP: proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*)

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

## **II.- INTRODUCCIÓN**





## II.- INTRODUCCIÓN

### II.1.- EL DESARROLLO

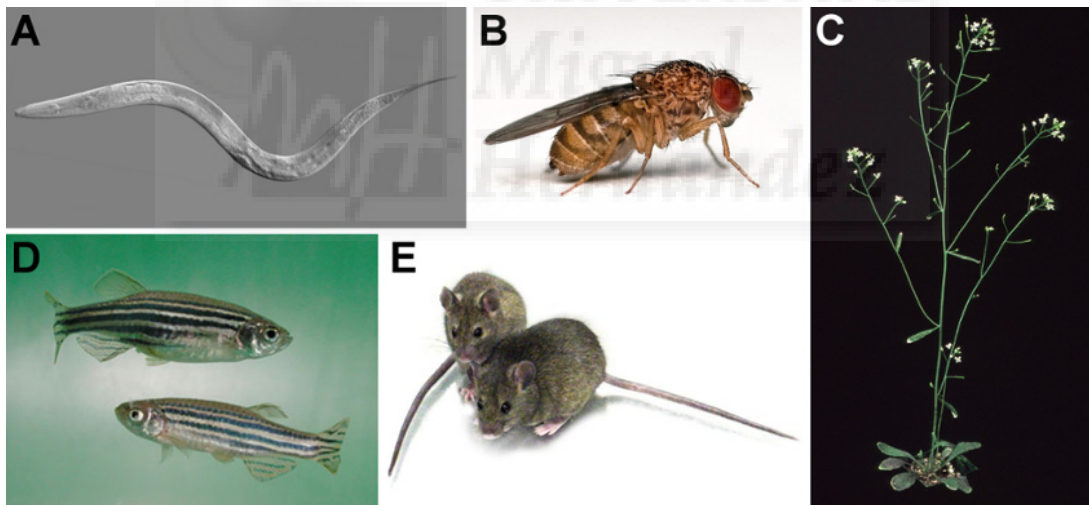
Los organismos multicelulares no aparecen preformados, sino que surgen como consecuencia de un lento proceso de cambio progresivo que conocemos como desarrollo. Casi siempre, el desarrollo comienza a partir de una única célula, el cigoto o gameto femenino fecundado. Éste se divide mitóticamente para dar lugar a toda la diversidad de células del organismo de una manera asombrosamente ordenada, reproduciendo, generación tras generación, patrones y planes corporales característicos de cada ser vivo (Gilbert, 2005; Jessel *et al.*, 2010). Estos procesos ocurren de forma coordinada y están sometidos a un estrecho control genético para dar lugar a niveles de organización sucesivamente más complejos, desde el establecimiento de los ejes principales del embrión hasta la formación de órganos muy especializados en la posición precisa y en el momento adecuado (Gilbert, 2005; Ben-Tabou de-Leon y Davidson, 2007).

Por tanto, no sorprende que las preguntas que suscitan los “misterios” del desarrollo de los organismos pluricelulares constituyan uno de los más grandes retos intelectuales de la biología. Hoy día sabemos que estos procesos se hallan bajo control por parte del genoma de cada especie. Aun así y a pesar de los continuados avances, estos interrogantes siguen teniendo validez (Gilbert, 2005). ¿Cómo el cigoto da lugar a todo el cuerpo adulto? ¿Cómo tiene lugar la diferenciación en cientos o miles de tipos celulares distintos si poseen los mismos genes? ¿Cómo se regulan éstos para que tenga lugar la aparición ordenada de formas (morfogénesis), con estructuras tan complejas como tejidos, órganos y sistemas? ¿Cómo se controla la división y la expansión celulares que gobiernan el crecimiento de estas estructuras? Los gametos son células muy especializadas que transmiten la información para reproducir el plan corporal característico de un organismo de una generación a la siguiente. ¿Cómo se especifican estas células para cumplir esta misión?

Algunas de estas preguntas ya se formularon cientos o miles de años atrás, pero fue tras la propuesta de la teoría celular y el progreso de la embriología, en el siglo XIX, cuando el estudio del desarrollo se consolidó como disciplina, prácticamente identificada con embriología animal. Al comienzo del siglo XX y a pesar del auge del mendelismo, la conexión con la Genética fue escasa hasta la década de 1960, cuando se produjo la confluencia entre la embriología y el análisis genético. El progreso de la biología del desarrollo se aceleró con el análisis de mutantes y el estudio funcional de

las actividades génicas que subyacen a los distintos procesos del desarrollo (Jessel *et al.*, 2010).

Este progreso también se vio favorecido por la incorporación de herramientas moleculares y, particularmente, el uso de organismos modelo (Jessel *et al.*, 2010). Pese a la enorme diversidad existente entre los seres vivos, muchos de los mecanismos que intervienen en el desarrollo son comunes a todos o a grandes grupos de ellos. Esto permite que los conocimientos adquiridos a partir de la investigación en unas pocas especies puedan extrapolarse a procesos similares que ocurren en otras aparentemente muy alejadas. En la actualidad, los organismos modelo más utilizados en la biología del desarrollo (la planta crucífera *Arabidopsis thaliana*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca *Drosophila melanogaster*, el pez cebra *Danio rerio*, el ratón *Mus musculus*, etc.) suelen caracterizarse por su corto tiempo de generación, progenie numerosa, simplicidad en el mantenimiento de las estirpes, un amplio catálogo de mutantes y facilidad de transgénesis. Es decir, son adecuados para el análisis genético (Fig.1; Anderson e Ingham, 2003; Jessel *et al.*, 2010; Koornneef y Meinke, 2010; Ankeny y Leonelli, 2011).



**Figura 1.-** Organismos modelo utilizados en genética del desarrollo. **A)** *Caenorhabditis elegans*. **B)** *Drosophila melanogaster*. **C)** *Arabidopsis thaliana*. **D)** *Danio rerio*. **E)** *Mus musculus*.

## II.2.- EL DESARROLLO VEGETAL

Aunque históricamente no se le prestó tanta atención como al desarrollo animal, el estudio del desarrollo vegetal no es ajeno a las generalidades apuntadas en el apartado anterior y su interés ha aumentado considerablemente, en parte por las

aplicaciones biotecnológicas que pueden derivarse de las investigaciones en este terreno (Spannagl *et al.*, 2011).

El desarrollo pluricelular evolucionó de forma independiente en los animales y en las plantas, siendo su último ancestro común un eucariota unicelular (Meyerowitz, 2002). Por esta razón, a pesar de compartir muchas características estructurales y moleculares con los animales, las plantas poseen ciertas peculiaridades propias. Por ejemplo, una faceta que las distingue de los animales es la presencia de cloroplastos en sus células, proporcionándoles la capacidad de efectuar la fotosíntesis, y por tanto, la autotrofia (Fosket, 1994; Leyser y Day, 2003).

Una diferencia fundamental estriba en que las células vegetales están rodeadas por una pared celular rígida de celulosa y pectinas que impide las migraciones celulares. Además, no son frecuentes los procesos de apoptosis, por lo que el crecimiento y la morfogénesis vegetal dependen fundamentalmente de procesos basados en la división y la expansión celulares (Jessel *et al.*, 2010; Wendrich y Weijers, 2013). La barrera impuesta por la pared celular, no obstante, no es impermeable ya que permite el paso de ciertas sustancias y posee canales intercelulares conocidos como plasmodesmos, que permiten el paso incluso de ciertas macromoléculas (Leyser y Day, 2003; Van Norman *et al.*, 2011; Sparks *et al.*, 2013). En las plantas el destino celular, en general, no está tan determinado por su linaje como por la situación que ocupan entre sus vecinas (Fosket, 1994; Jessel *et al.*, 2010). Por ello, la comunicación intercelular es clave para determinar de forma precisa la información posicional (Van Norman *et al.*, 2011).

La percepción de información del entorno es crucial también porque las plantas son organismos sésiles, pero sorprendentemente plásticos en su desarrollo. Esto les permite adaptarse a las condiciones cambiantes del ambiente. Sus patrones de crecimiento pueden verse profundamente afectados por señales exógenas como la luz o la temperatura, información que se integra con los programas endógenos del desarrollo (Leyser y Day, 2003; Busch y Benfey, 2010; Van Norman *et al.*, 2011; Sparks *et al.*, 2013). Otro reflejo, y a la vez causa, de esta plasticidad es la totipotencia que presentan casi todas las células vegetales, siendo capaces de desdiferenciarse y regenerar una planta completa si se someten a los estímulos hormonales adecuados (Lyndon, 1990; Grafi, 2004; De Veylder *et al.*, 2007).

El desarrollo no cesa al nacer, o durante la etapa adulta. La mayoría de los organismos nunca detienen su desarrollo. Esto es especialmente relevante en el caso de las plantas donde, a diferencia de los animales, el crecimiento es fundamentalmente postembrionario. En el embrión se establece un esbozo básico del plan corporal de la planta (Wendrich y Weijers, 2013), pero los órganos que aparecen

en el adulto se desarrollan a lo largo de todo su ciclo vital de forma continuada e iterativa a partir de los meristemas (Lyndon, 1990; Clark, 2001; Jessel *et al.*, 2010). Los meristemas contienen células que se mantienen en estado indiferenciado (células madre o *stem cells*) y se dividen durante toda la vida del individuo, produciendo nuevas células que pueden diferenciarse para dar lugar a las distintas estructuras de la planta en las posiciones adecuadas. Son, por tanto, estructuras clave en el desarrollo, ya que van a generar todos los órganos, vegetativos y reproductivos, determinando la morfología final de éstos y la arquitectura general del individuo (Clark, 2001; Carles y Fletcher, 2003).

En particular en las angiospermas o plantas con flores, la aparición de éstas y la consiguiente regulación de su producción, convirtieron a este grupo en las plantas terrestres con mayor diversidad y éxito adaptativo (Crepet, 2000). La extraordinaria diversidad de formas que manifiestan las angiospermas es una evidencia de la gran flexibilidad de la unidad básica de desarrollo vegetal, el fitómero (Leyser, 2003; Kalisz y Kramer, 2008).

### **II.3.- EL CICLO DE VIDA DEL ORGANISMO MODELO *Arabidopsis thaliana***

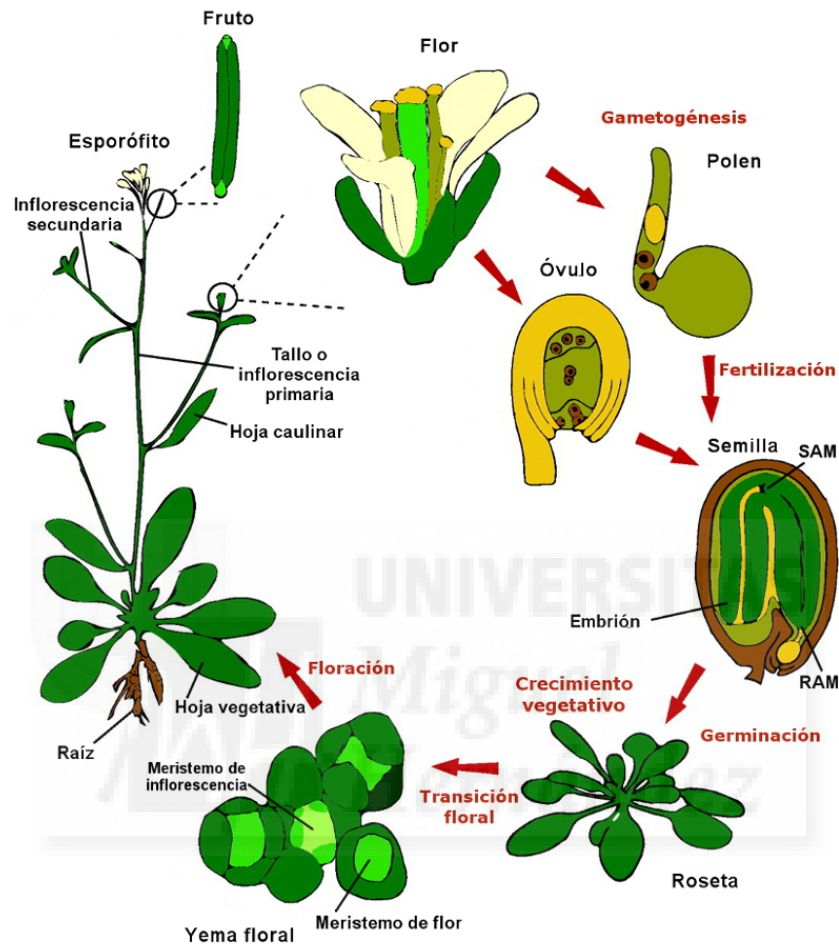
*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*Arabidopsis* a partir de ahora) es una crucífera o brasicácea, adoptada originalmente como sistema modelo por su sencillez para la experimentación genética, debido a su corto tiempo de generación, pequeño tamaño y una prolífica producción de semillas mediante autopolinización (Somerville y Koornneef, 2002; Koornneef y Meinke, 2010). A estas ventajas hay que añadir otras como la relativa simplicidad de su genoma (Meinke *et al.*, 1998; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), su facilidad de transformación (Clough y Bent, 1998), así como los numerosos recursos tanto de estirpes y clones, como moleculares, técnicos o bioinformáticos disponibles para la comunidad investigadora, convirtiéndose en la especie vegetal más estudiada (Koornneef y Meinke, 2010).

#### **II.3.1.- Los meristemas y el desarrollo vegetativo**

La estructura y el ciclo de vida de *Arabidopsis* son comparables a los de cualquier crucífera y a la gran mayoría de las angiospermas. Como en la mayor parte de las plantas, a lo largo del eje principal del adulto encontramos una serie discreta de tipos de órganos aéreos como hojas, tallos o inflorescencias secundarias y flores, unidos al



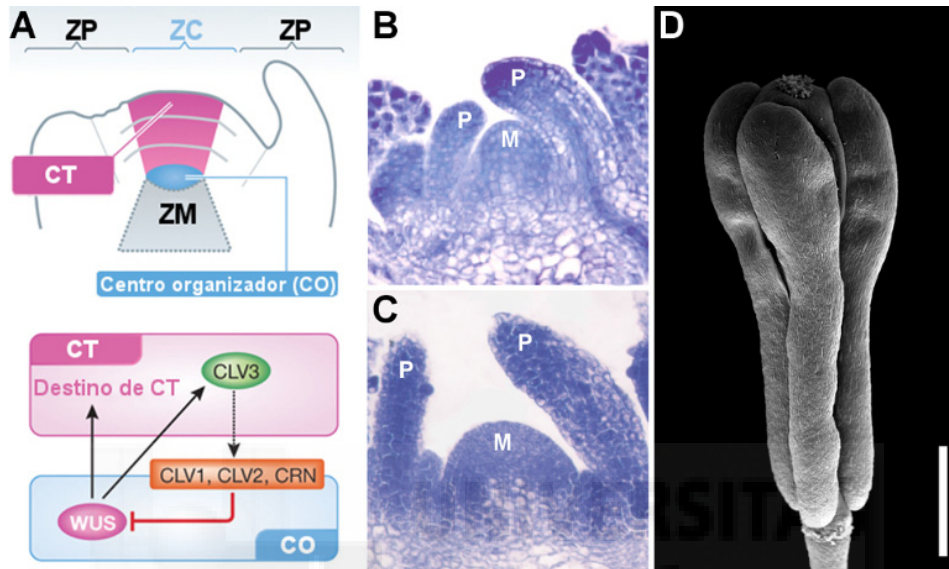
tallo principal, el cual se continúa con el sistema radicular (Fig. 2). Al margen de los cotiledones u hojas embrionarias, todos estos órganos se forman, durante toda la vida de la planta, a partir del meristemo apical de la raíz (RAM, *Root Apical Meristem*) y el meristemo apical del tallo (SAM, *Shoot Apical Meristem*; Figs. 2 y 3).



**Figura 2.-** Ciclo de vida de *Arabidopsis*. En esta figura se representan las distintas etapas del desarrollo de la planta, donde también se han indicado algunos de sus órganos. Las distintas fases que tienen lugar durante el ciclo vital de esta crucífera están anotadas en rojo. Imagen tomada de Smaczniak *et al.*, 2012 con modificaciones.

Éstos producen células madre embrionarias que aportan células descendientes que se incorporan a los nuevos órganos (Carles y Fletcher, 2003; Nimchuk *et al.*, 2011; Sparks *et al.*, 2013; Wendrich y Weijers, 2013), siendo crucial para ello la ruta *WUSCHEL* (*WUS*)/*CLAVATA* (*CLV*). La proteína con homeodominio *WUS* confiere identidad meristemática, al tiempo que promueve la expresión de *CLV3* en el dominio de producción de las células madre (Schoof *et al.*, 2000). *CLV3* es un pequeño polipéptido secretado (Rojo *et al.*, 2002) que actúa como ligando de complejos receptores como los formados por heterodímeros entre las proteínas *CORYNE* (*CRN*), *CLV1* y *CLV2* (Barton, 2010). Así, los genes *CLV* trasladan una señal que reprime

indirectamente a *WUS*, limitando la población de células embrionarias (Fig. 3; Schoof *et al.*, 2000; Busch y Benfey, 2010). De hecho, los mutantes *clv* presentan un dominio de *WUS* aumentado por un exceso de células proliferativas, un meristemo agrandado y órganos supernumerarios en las flores (Fig. 3; Clark *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1997; Schoof *et al.*, 2000; Barton, 2010).



**Figura 3.-** El meristemo apical del tallo (SAM). **A)** Representación esquemática de un corte longitudinal del SAM en el que se indican sus regiones funcionales (ZP: zona periférica; ZC: zona central; ZM: zona medular). Debajo se muestra un esquema de regulación génica del SAM por parte del circuito *CLV-WUS*. CT: célula totipotente. **B)** Corte longitudinal del SAM de una planta silvestre. **C)** Corte longitudinal del SAM agrandado de una planta *clv1*. En (C y D) se han indicado el meristemo (M) y los primordios (P) de los órganos laterales. **D)** Micrografía electrónica de barrido de un fruto *clv3*, con múltiples carpelos. Barra de escala: 1 mm. Imágenes modificadas a partir de Miyashima *et al.*, 2013 (A), Carles y Fletcher, 2003 (B y C) y Ripoll, 2004 (D).

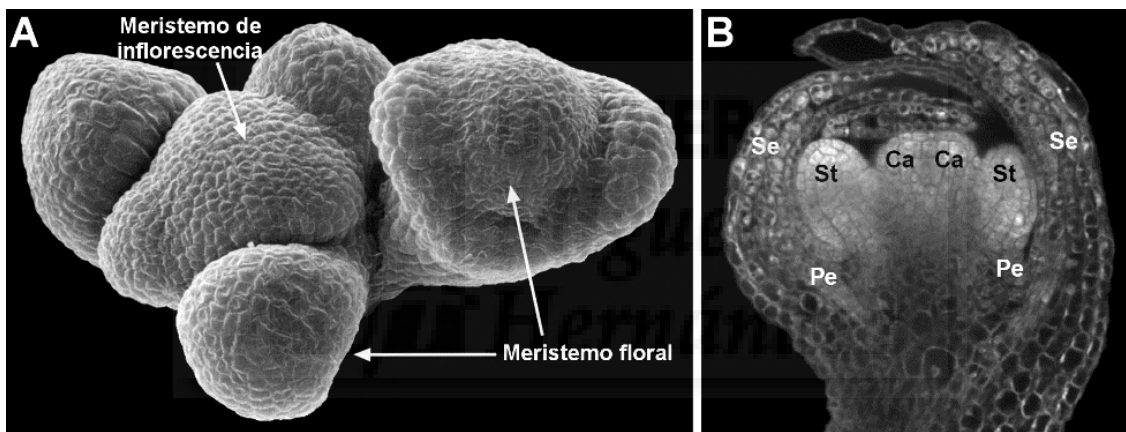
Durante el desarrollo vegetativo, caracterizado por un aumento de los tejidos fotosintéticos y el aumento de masa y tamaño, a partir del SAM se producen reiteradamente hojas de la roseta o vegetativas, siguiendo una filotaxia o disposición helicoidal (Figs. 2 y 4; Huijser y Schmid, 2011).



**Figura 4.-** Roseta silvestre de 14 días. Se pueden distinguir claramente 6 hojas vegetativas. Barra de escala: 1 mm.

### II.3.2.- La floración

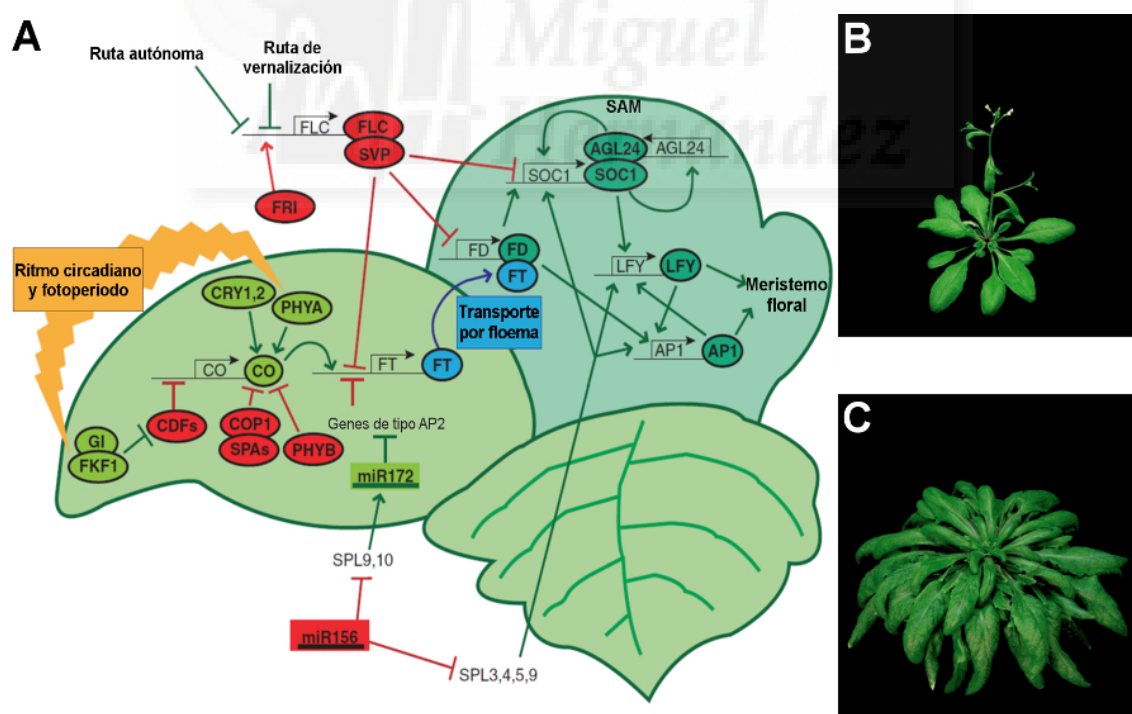
Tras alcanzar cierta competencia como adulto, la planta experimenta una importante transición hacia una fase de desarrollo reproductivo (Huijser y Schmid, 2011). El comienzo de éste viene marcado por el alzado (*bolting*) o desarrollo de un tallo del que surgirán las flores (Fig. 2). Durante la floración el SAM se convierte en un meristemo de inflorescencia, y en sus flancos los primordios de órganos laterales adquieren destino de flor en lugar de hojas (Fig. 5 A). Como cualquier planta, *Arabidopsis* integra numerosas señales endógenas (hormonas, edad, etc.) y medioambientales (luz, temperatura, etc.) para controlar el momento adecuado de la transición floral, asegurando el periodo óptimo para la polinización y la formación de semillas en lo que supone un proceso de desarrollo crucial para el éxito reproductivo (Andrés y Coupland, 2012).



**Figura 5.-** Meristemo de inflorescencia y meristemo floral de *Arabidopsis*. **A)** Micrografía electrónica de barrido (SEM) de un meristemo de inflorescencia rodeado de meristemas florales. **B)** Corte longitudinal de un meristemo floral en el que se indican los sépalos (Se), los pétalos (Pe), los estambres (St) y los carpelos (Ca). Imágenes tomadas de Lenhard y Laux, 1999 (A), y Carles y Fletcher, 2003 (B), con modificaciones.

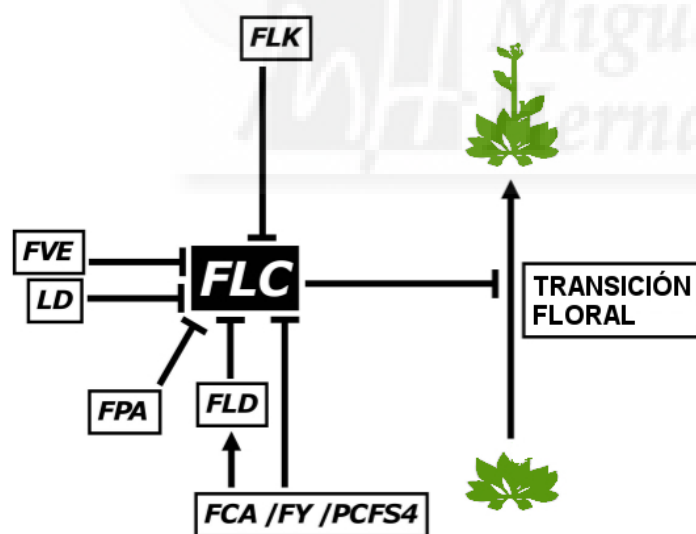
Los análisis fisiológicos, genéticos y moleculares han establecido que la transición floral está regulada por un intrincado sistema formado por múltiples rutas interconectadas que promueven o reprimen la floración de forma cuantitativa (Mouradov *et al.*, 2002; Boss *et al.*, 2004; Michaels, 2009; Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009; Amasino, 2010). Estas rutas, a su vez, convergen en un conjunto común de genes “integradores florales”, como *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* y *LEAFY (LFY)*, los cuales controlan las actividades de iniciación floral (Boss *et al.*, 2004; Amasino, 2010; Lee y Lee, 2010). Por ejemplo, la longitud del día y el tipo de luz se perciben por los elementos de la ruta del fotoperiodo. En *Arabidopsis*, una planta facultativa de día largo (Fig. 6; Amasino,

2010), este régimen luminoso estimula la floración mediante la regulación positiva de *SOC1* y *FT*. Por otro lado, la ruta de las hormonas giberelinas (GA), críticas en condiciones de día corto, activan a *SOC1* y *LFY* (Blázquez *et al.*, 1998; Blázquez y Weigel, 2000; Lee y Lee 2010). Estos efectos positivos se contrarrestan por la acción del represor central de la floración FLOWERING LOCUS C (*FLC*) que, como *SOC1*, es un factor de transcripción de tipo MADS-box que reprime a *FT* y a *SOC1* (Fig. 6; Michaels y Amasino, 1999; Michaels, 2009; Amasino, 2010; Lee y Lee, 2010). El propio *FLC* está sujeto a una estricta regulación. En estirpes anuales invernales de *Arabidopsis*, la ruta de vernalización culmina el silenciamiento epigenético del locus *FLC* tras una prolongada exposición a bajas temperaturas (vernalización), un requisito para superar la activación de *FLC* por parte de los alelos dominantes del gen *FRIGIDA* (*FRI*; Fig. 6; Sung y Amasino, 2005; Michaels, 2009; Amasino, 2010; Song, *et al.*, 2013). En estirpes de ciclo rápido con alelos *fri* amorfos, como Columbia (Col) o Landsberg *erecta* (*Ler*), los mutantes de la ruta autónoma o constitutiva florecen tarde y responden a la vernalización ya que los elementos de esta vía también promueven la floración reprimiendo la acumulación del mRNA de *FLC* (Henderson y Dean, 2004; Quesada *et al.*, 2005; Michaels, 2009; Amasino, 2010).



**Figura 6.-** Regulación del tiempo de floración. **A)** Representación esquemática de las rutas que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Los genes de la ruta autónoma que reprimen a *FLC* están indicados en la Figura 7. **B)** Planta silvestre del ecotipo Col-0 cultivada en condiciones de día largo, cuyo SAM ha generado aproximadamente 13 hojas vegetativas antes de producirse la floración. **C)** Planta Col-0 con un alelo activo del gen *FRI* cultivada en condiciones de día largo y sin tratamiento de vernalización. La roseta ha producido unas 60 hojas vegetativas antes de que la floración tuviera lugar. Imágenes tomadas de Amasino, 2010, con modificaciones.

El análisis genético de los componentes de la ruta autónoma indicó que, a diferencia de lo que ocurre en otras vías inductoras de la floración, no se relacionan siguiendo un modo lineal jerárquico de actuación, sino que regulan a *FLC* independientemente, más bien como un conjunto de subrutinas redundantes (Fig. 7; Boss *et al.*, 2004; Quesada *et al.*, 2005). Además, parecen afectar a distintos procesos moleculares ya que sus elementos codifican desde una proteína con homeodominio (LUMIDEPENDENS, LD) a una demetilasa de histonas como FLOWERING LOCUS D (FLD; Lee *et al.*, 1994; He *et al.*, 2003). Otros genes codifican proteínas con dominios de unión a RNA del tipo RRM (*RNA Recognition Motif*) como FCA y FPA (Quesada *et al.*, 2005). *FCA* se autoregula promoviendo un hecho de corte y poliadenilación dentro de su tercer intrón, lo que rinde un mensajero incapaz de producir una proteína funcional (Quesada *et al.*, 2003). *FCA* y *FPA* suprimen en paralelo a *FLC* mediante silenciamiento de la cromatina, en un proceso que implica a RNA pequeños interferentes o siRNA (*small interfering RNAs*), a *FLD* y RNA largos no codificantes (lncRNA, *long non-coding RNA*) en un complejo proceso que ilustra la interconexión entre distintos niveles de regulación génica (Liu *et al.*, 2007; Bäurle *et al.*, 2007; Bäurle y Dean, 2008; Heo y Sung, 2011; Crevillén *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013).



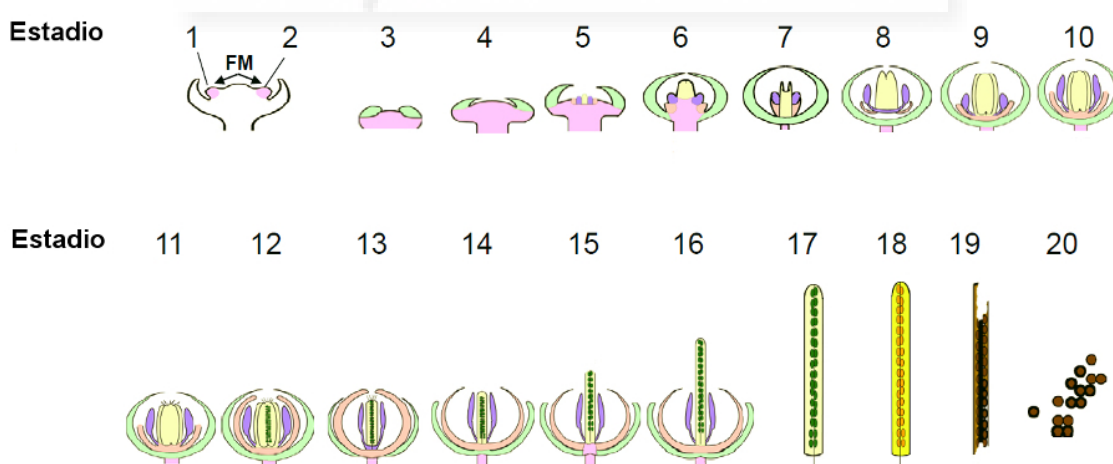
**Figura 7.-** Representación de la ruta autónoma de la floración de *Arabidopsis*. Los genes que conforman esta ruta actúan de manera independiente reprimiendo la expresión de *FLC*, un represor central de la floración, promoviendo, por tanto, la transición floral. Imagen tomada de Ripoll *et al.*, 2009, con modificaciones.

Otro componente de la ruta autónoma es *FLK* (*FLOWERING LOCUS KH DOMAIN*), que codifica un polipéptido con tres dominios de unión a RNA del tipo KH (*K-homology*), que trataremos posteriormente (Adinolfi *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004). Como otros mutantes de la ruta autónoma, las plantas *flk* acumulan niveles elevados del mRNA de *FLC* y florecen tarde independientemente del régimen luminoso (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004), aunque se ignora qué procesos se ven perturbados para que esto ocurra.



### II.3.3.- Especificación del meristemo floral

Finalmente, la edad de la planta, su estatus hormonal y los estímulos ambientales logran superar cierto umbral, lo cual permite a los integradores florales especificar un nuevo destino para el meristemo, como meristemo floral. Entre estos genes destaca inicialmente *FT*, sobre el que existe consenso de que representa al hipotético factor inductor endógeno “florigeno”, así denominado en la década de 1930 (Corbesier *et al.*, 2007; Amasino, 2010; Choi, 2012). La proteína FT se expresa en la vasculatura de las hojas, desde donde viaja al SAM e interacciona con FD, un factor de transcripción de tipo “bZIP” (Fig. 6; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Corbesier *et al.*, 2007). El complejo FT/FD activa a genes de identidad de meristemo floral como *APETALA1* (*AP1*; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005) y otros promotores florales como *SOC1* (Michaels *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2005). Estos genes inducen a ciertos grupos de células o primordios, en los laterales del SAM, a diferenciarse como meristemas florales (Fig. 6). Otras rutas refuerzan este impulso, como por ejemplo *LFY* que también promueve la diferenciación de los primordios hacia meristemas florales. *LFY* es activado por la ruta de las giberelinas y, a su vez, también activa a *AP1* (Fig. 6; Blázquez *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 1999). En el doble mutante *lfy ft* se producen hojas en lugar de flores, lo que es coherente con que diversas rutas contribuyan a la formación de flores (Ruiz-García *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005).



**Figura 8.-** Etapas del desarrollo de la flor y el fruto de *Arabidopsis* (según Smyth *et al.*, 1990). Representación esquemática desde la formación del primordio de la flor, a continuación la de los primordios de cada órgano floral, el desarrollo de los mismos, la fertilización en el estadio 13, el crecimiento del fruto donde se alojan las semillas, y por último la dispersión de éstas. Estos procesos se describen más detalladamente en la Tabla 1. Los distintos órganos se muestran con un código de colores: el meristemo floral (FM) en rosa claro, los sépalos en verde, los pétalos en color salmón, los estambres en azul, el gineceo en amarillo, los óvulos en verde oscuro, y las semillas en naranja y marrón. Imagen tomada de Alvarez-Buylla *et al.*, 2010.

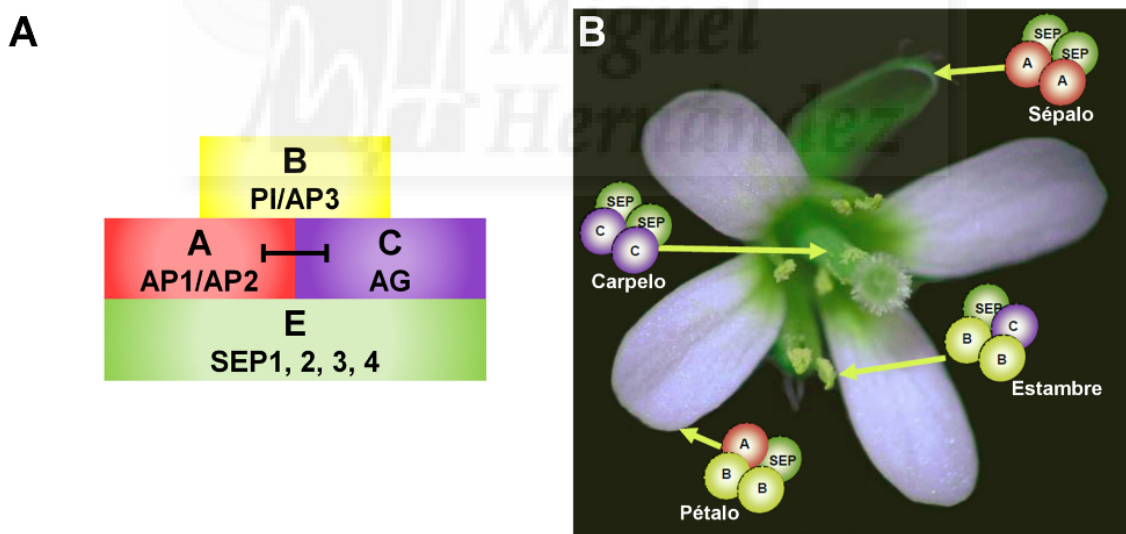
En *Arabidopsis*, una vez que comienza, la inducción de la floración en el SAM parece irreversible. Esta irreversibilidad se da como resultado de múltiples bucles de retroalimentación positiva entre genes que se expresan en el meristemo y se activan unos a otros, como *LFY* y *AP1*, o *SOC1* y *AGAMOUS-LIKE24 (AGL24)*, que también son activadores de *LFY* (Fig. 6; Liljegren *et al.*, 1999; Michaels *et al.*, 2005; Sablowski, 2007; Lee *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2013). De esta manera se inicia el proceso de formación de la flor, cuyo desarrollo se suele dividir en distintos estadios, atendiendo a los rasgos morfológicos que caracterizan cada etapa (Fig. 8 y Tabla 1).

**Tabla 1.-** Estadios del desarrollo de la flor y el fruto donde se describen los acontecimientos que tienen lugar en cada etapa (Smyth *et al.*, 1990).

Estadio	Rasgos morfológicos en la flor	Rasgos morfológicos en el gineceo
1	Aparición del meristemo floral	
2	Formación del primordio de la flor y separación del meristemo de inflorescencia	
3	Aparición de los primordios de los sépalos	
4	Los sépalos sobrepasan el meristemo floral	
5	Aparición de los primordios de sépalos	
6	Los sépalos envuelven el meristemo floral	Aparición los primordios de los carpelos
7	Los estambres desarrollan un pedúnculo basal	Crecimiento del primordio del gineceo como un cilindro abierto
8	Aparición de los lóculos de los estambres	Diferenciación de la placenta y de los haces vasculares principales
9	Los pétalos desarrollan un pedúnculo basal	Aparición de los primordios de óvulo. Diferenciación de cada capelo en endocarpo, mesocarpo y exocarpo
10	Los pétalos se sitúan por encima de los estambres	Cierre apical del gineceo. Formación del septum
11	Aparición de las papilas estigmáticas	Diferenciación de la epidermis del estilo y las dos capas del endocarpo. Desarrollo del funículo del óvulo
12	Los estambres se sitúan por encima de los pétalos	Crecimiento del fruto. Diferenciación del tracto transmisor
13	Antesis	Polinización
14	Los estambres medios sobrepasan el estigma	Fertilización. Suturas visibles entre las valvas y el replum (zona de dehiscencia)
15	El estigma sobrepasa los estambres	Lignificación del xilema
16	Senescencia de pétalos y sépalos	Crecimiento general del fruto
17 A	Caída de sépalos, pétalos y estambres	Formación de la capa de separación. Desarrollo de la cutícula del exocarpo. Las células del endocarpo <i>b (enb)</i> forman el esclerénquima
17 B	La silicua alcanza su tamaño final	Lignificación de la <i>enb</i> y la capa de separación
18	La silicua amarillea	Degeneración del <i>ena</i> y lignificación total del <i>enb</i> . Deshidratación del mesocarpo.
19	Dehiscencia de las valvas	
20	Dispersión de las semillas	

### II.3.4.- Morfogénesis floral: identidad de órgano y determinación del meristemo

Una función crucial de los genes de identidad de meristemo floral es la activación de los genes que, a su vez, han de conferir identidad específica a cada uno de los órganos florales (Jack, 2004; O'Maoiléidigh *et al.*, 2013 a). En *Arabidopsis*, una brasicácea típica, éstos surgen en una disposición de anillos concéntricos o verticilos, con cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y un gineceo o pistilo bicarpelar (Fig. 9 B). El análisis genético de mutantes homeóticos florales de *Arabidopsis* y *Antirrhinum majus* derivó en la formulación del conocido y contrastado modelo ABC, que explica cómo las funciones combinadas de tres clases de genes, A, B y C, determinan la identidad de cada uno de los órganos florales (Coen y Meyerowitz, 1991). *Arabidopsis* tiene dos genes catalogados como de clase A, *AP1* y *AP2*, que determinan la identidad de los sépalos. Además, *AP1* y *AP2*, junto con los dos genes de clase B, *PISTILATA (PI)* y *AP3*, contribuyen a conferir identidad de pétalo en el segundo verticilo. La combinación de *PI* y *AP3*, junto a la actividad C representada por el gen *AGAMOUS (AG)* especifica estambres, mientras que *AG* en solitario especifica la identidad carpelar en el centro de la flor (Fig. 9; Jack, 2004; Krizek y Fletcher, 2005).

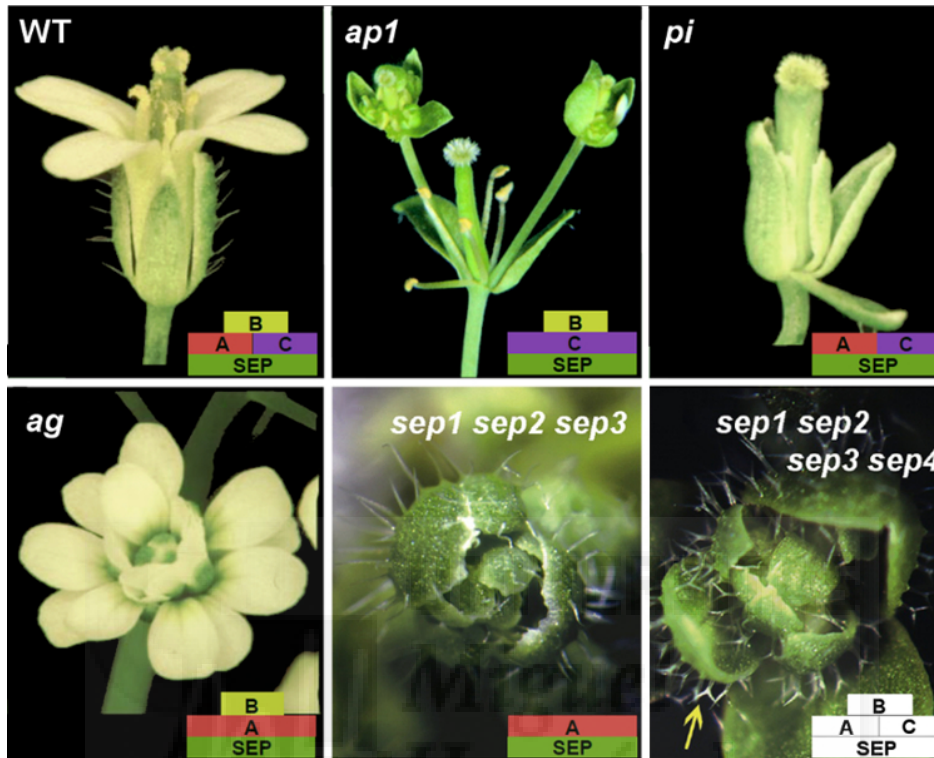


**Figura 9.-** El modelo ABCE de desarrollo floral. **A)** Esquema del modelo ABCE. **B)** Representación de las interacciones entre los elementos de cada grupo para la especificación de los órganos florales. Las esferas muestran los complejos proteicos de los distintos componentes de cada función, y que se requieren para la adquisición de la identidad de cada órgano. Imagen modificada a partir de Alvarez-Buylla *et al.*, 2010.

Un principio fundamental de este modelo es el antagonismo excluyente entre las actividades A y C (Fig. 9 A). Según éste, los genes de una y otra actividad se reprimen mutuamente y sus mutaciones de pérdida de función conducen a la expansión ectópica de su antagonista, contribuyendo a la explicación de los fenotipos



de conversión homeótica observados (Jack, 2004; Krizek y Fletcher, 2005; Causier *et al.*, 2010). Así, por ejemplo, en flores con una función C disminuida, la expansión de la actividad A contribuiría a la conversión de los estambres en pétalos y de los carpelos en sépalos (Fig. 10; Krizek y Fletcher, 2005; Causier *et al.*, 2010).



**Figura 10.-** Flor silvestre y flores de plantas con mutaciones en elementos del sistema ABCE. En el primer panel se muestra una flor silvestre (WT). Las flores *ap1* carecen de pétalos, y presentan flores secundarias, así como brácteas con tricomas compuestos en lugar de sépalos. Las plantas mutantes *pi* poseen flores compuestas por dos verticilos de sépalos y dos verticilos de carpelos. En las flores *ag* los estambres se han transformado en pétalos y los carpelos son sustituidos por otra flor, que repite el mismo patrón. Las plantas triples mutantes *sep1 sep2 sep3* presentan flores en las que todos los verticilos tienen identidad de sépalos. Las flores de los cuádruples mutantes *sep1 sep2 sep3 sep4* están compuestas por órganos muy semejantes a hojas, con tricomas ramificados (flecha). Tomado de Alvarez-Buylla *et al.*, 2010, y de Ng y Yanofsky, 2001 (*ap1*) y Ditta *et al.*, 2004 (*sep1 sep2 sep3* y *sep1 sep2 sep3 sep4*).

Posteriormente se descubrió que las actividades B y C son funcionalmente dependientes de la acción de cuatro genes redundantes y muy similares entre sí, *SEPALLATA1* (*SEP1*), *SEP2*, *SEP3* y *SEP4*, representantes de una nueva categoría, la clase E (Figs. 9 y 10; Pelaz *et al.*, 2000; Ditta *et al.*, 2004). La eliminación de *SEP1*, *SEP2* y *SEP3* conduce a la aparición de sépalos en todos los verticilos florales (Fig. 10; Pelaz *et al.*, 2000), mientras que en el cuádruple mutante todos los órganos florales tienen apariencia de hojas (Fig. 10; Ditta *et al.*, 2004), ilustrando un origen filoide ancestral común para todos ellos, tal como predijo Goethe hace más de dos siglos (Goethe, 1790, citado en Causier *et al.*, 2010). Todos los genes A, B, C y E mencionados codifican factores de transcripción MADS-box, con la única excepción de

AP2, un factor de transcripción que da nombre al dominio AP2 considerado inicialmente específico de plantas (Okamoto *et al.*, 1997; Causier *et al.*, 2010).

Los factores de transcripción MADS-box son reguladores críticos de múltiples procesos del desarrollo vegetal, con una secuencia característica de 60 aminoácidos que les confiere capacidad de unión al DNA, compartida con otras proteínas de levaduras y animales (Yanofsky *et al.*, 1990; Becker y Theissen. 2003; Parenicová *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, los numerosos genes MADS-box se han clasificado en función de su filogenia y diversas facetas estructurales. *AG*, *PI*, *AP3*, *AP1*, los genes *SEP* y *FLC*, entre otros, codifican factores MADS-box de tipo II MIKC<sup>c</sup> capaces de formar distintos complejos tetraméricos (*floral quartets*) reguladores del desarrollo de las flores y otros procesos (Fig. 9 B; Parenicová *et al.*, 2003; Smaczniak *et al.*, 2012). *AG* y *FLC* coinciden junto con otros genes MADS-box en poseer un intrón inusualmente grande en plantas, en cuya secuencia residen numerosos elementos reguladores (Sieburth y Meyerowitz, 1997; Sheldon *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003; Kooiker *et al.*, 2005; Schauer *et al.*, 2009).



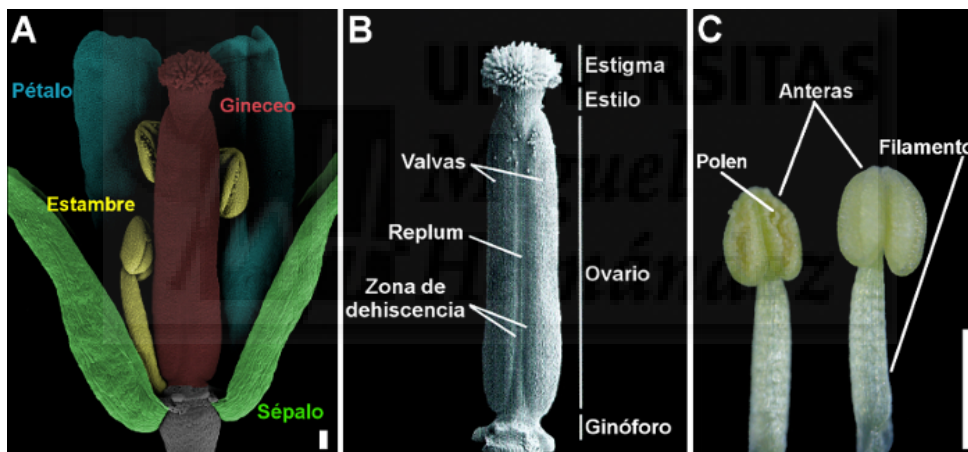
**Figura 11.-** Terminación del meristemo floral. **A)** Representación del corte longitudinal del meristemo floral durante los estadios 3 y 6, respectivamente. *LFY* y *WUS* contribuyen a la expresión de *AG* en el estadio 3. En el estadio 6, este último induce la represión de *WUS* directa e indirectamente, a través de *KNU*, lo que da lugar a la determinación del meristemo floral. **B)** Flor del mutante *ag* en la que el meristemo floral es indeterminado, produciendo nuevos verticilos (sépalos y pétalos). Barra de escala: 1 mm. Panel A), modificado de Liu *et al.*, 2011.

Además de conferir identidad de estambre y carpelo, *AG* desempeña funciones adicionales. Una de estas tareas es lograr la determinación del meristemo floral. *WUS* y *LFY* contribuyen a la activación de *AG* en el interior del meristemo. Pero a diferencia de lo ocurrido en el SAM, *AG* reprime la expresión de *WUS*, tanto directamente como a través de la activación de *KNUCKLES (KNU)*, un gen que codifica una proteína con dedos de zinc que también reprime a *WUS* (Payne, *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). De esta manera, se consume un bucle de retroalimentación negativa cuya consecuencia es el agotamiento del nicho de células madre y el cese de la actividad meristemática (Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001). Cuando esto no sucede, como en los mutantes fuertes *ag*, continúa la producción de órganos en el centro del

meristemo floral, generando una reiteración de verticilos alternos de sépalos y pétalos, también conocido como el fenotipo “flor dentro de flor” (Fig. 11 B; Bowman *et al.*, 1989). Además de la especificación de los órganos florales y la determinación del meristemo, AG también regula el desarrollo posterior y maduración de carpelos y estambres (Ito *et al.*, 2007).

### II.3.5.- Morfogénesis floral: estructura y desarrollo del gineceo

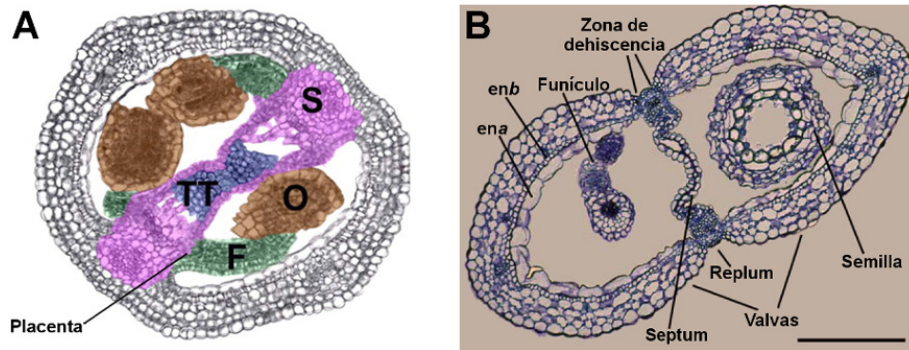
Una vez lograda la correcta especificación de los órganos y la determinación del meristemo floral, se forman distintos tejidos y estructuras que contribuyen a la morfología final de cada órgano. Así, los estambres de *Arabidopsis* se caracterizan por poseer un filamento que sostiene una antera en cuyos lóculos interiores se formarán los granos de polen (Fig. 12 C).



**Figura 12.-** Flor, gineceo y estambres de *Arabidopsis*. **A)** Fotografía realizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de una flor silvestre, en la que se han coloreado los distintos órganos de cada verticilo. **B)** Fotografía de SEM de un gineceo en el que se detallan diversos tejidos y estructuras que lo conforman. **C)** Estambres silvestres, indicando las partes que lo componen. Barras de escala 100  $\mu\text{m}$  (A) y 0,5 mm (C). La imagen mostrada en (B) ha sido tomada de Ferrándiz, 2002, con modificaciones.

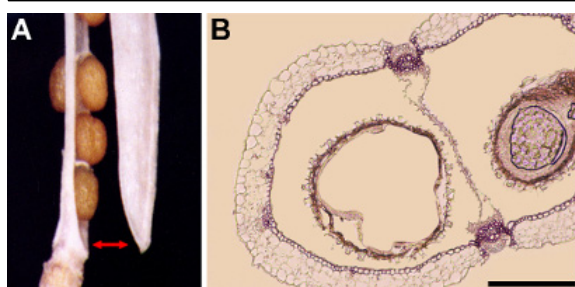
Por su parte, el pistilo o gineceo es probablemente el órgano más complejo en las plantas y en él aparecen preformadas las estructuras definitorias del futuro fruto (Roeder y Yanofsky 2006; Martínez-Laborda y Vera, 2009; Sundberg y Ferrándiz, 2009). A lo largo del eje apical-basal, el pistilo aparece coronado por tejido estigmático (células mucilaginosas a las que se adhiere el polen) seguido de un corto estilo que favorece el contacto del gineceo con las anteras y que ha de ser atravesado por el tubo polínico para llegar al ovario. Éste está formado por dos valvas o carpelos separados exteriormente por las regiones de margen de valva y el replum (plural repla;

Figs. 12 A y B), elementos que definen el patrón mediolateral del ovario (Martínez-Laborda y Vera, 2009). Finalmente, el ovario se encuentra unido al pedúnculo floral por el ginóforo, un entrenudo muy corto con simetría radial y de características vegetativas, en cuya base podemos encontrar los nectarios (Fig. 12 B; Roeder y Yanofsky 2006).



**Figura 13.-** Tejidos que conforman el gineceo. **A)** Corte transversal de un pistilo silvestre en el que se han coloreado los tejidos internos. Septum (S), rosa; tracto transmisor (TT), azul; óvulo (O), marrón; funículo (F), verde. **B)** Corte transversal de un fruto silvestre, en el que se indican las estructuras principales. Barra de escala: 200  $\mu$ m. Imágenes tomadas de Gremski *et al.*, 2007 (A), y Alonso-Cantabrana, 2005 (B), con modificaciones.

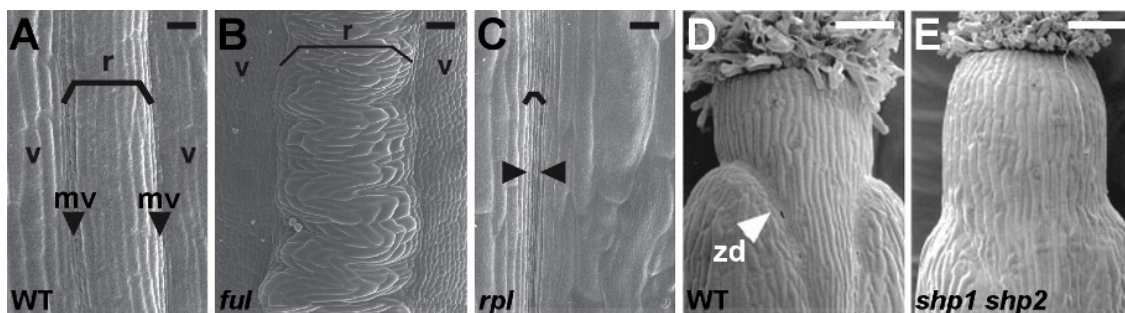
El gineceo presenta también diferencias a lo largo del eje adaxial-abaxial. Éste viene definido por aquellos territorios o tejidos del órgano más próximos al meristemo (adaxial) frente a los más alejados (abaxial), que en este caso concuerdan con interior y exterior, respectivamente. En el interior del ovario (adaxial) podemos distinguir el septum (plural septa), un territorio que une ambos repla congénitamente y que define dos lóculos o espacios donde se alojarán las semillas tras la fecundación de los óvulos (Fig. 13; Roeder y Yanofsky 2006; Sundberg y Ferrándiz, 2009). Ello es debido a que durante el desarrollo temprano los dominios “mediales” proliferan y se desarrollan adaxialmente dos “crestas” de tejido (*marginal ridges*) donde se unen ambos carpelos. Las células de estas crestas retienen cierto grado de potencial meristemático, dando origen a la placenta de donde surgirán los óvulos (Fig. 13; Skinner *et al.*, 2004; Roeder y Yanofsky, 2006). De hecho, los tejidos “marginales”, además de la placenta, incluyen el replum, el septum, el estilo y el estigma (Sundberg y Ferrándiz, 2009).



**Figura 14.-** La zona de dehiscencia. **A)** Fotografía de un fruto en el que la valva se ha desprendido para liberar las semillas. **B)** Corte transversal de un fruto silvestre tratado con floroglucinol, que tiñe de rojo o púrpura las zonas de lignificación. Barra de escala: 500  $\mu$ m. Imágenes tomadas de Liljegren *et al.*, 2000 (A), y Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007 (B) con modificaciones.



Los procesos, actividades génicas y efectos hormonales que operan en la formación de patrón en los distintos ejes a menudo se describen independientemente (Eshed *et al.*, 1999; Nemhauser *et al.*, 2000; Dinneny *et al.*, 2005; Dinneny y Yanofsky, 2005). No obstante, existe una evidente interconexión entre ellos. Así, gradientes y máximos locales de auxinas se han relacionado con los patrones morfogenéticos apical-basal y medio-lateral (Balanzà *et al.*, 2006; Sorefan *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 2013), donde también se han involucrado a las giberelinas y a las citoquininas (Arnaud *et al.*, 2010; Marsch-Martínez *et al.*, 2012).

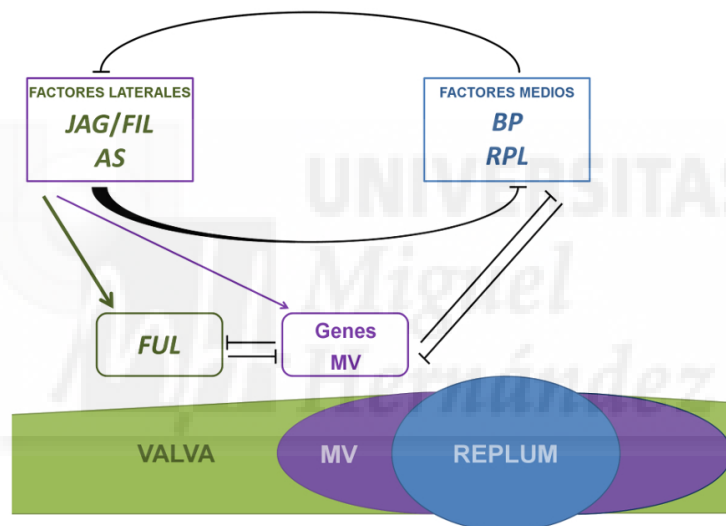


**Figura 15.-** Fenotipos de los mutantes *ful*, *rpl* y *shp1 shp2*. **A)** Micrografía electrónica de barrido (SEM) de la zona media de un fruto silvestre *Ler*, en la que se han señalado las valvas (v), márgenes de valva (mv), y replum (r). **B)** Fotografía de SEM de un fruto *ful* en el que se aprecia el aumento del grosor del replum y su disposición en zigzag. **C)** Micrografía de SEM de un fruto *rpl* cuya región del replum está muy reducida y compuesta por células estrechas. **D)** Fotografía de SEM de un fruto silvestre en la que se indica la zona de dehiscencia (zd). **E)** Micrografía de SEM de un fruto doble mutante *shp1 shp2*, donde no se ha diferenciado el margen de valva. Barras de escala: 20  $\mu$ m (A y C), 50  $\mu$ m (B) y 100  $\mu$ m (D y E). Imágenes tomadas de Roeder *et al.*, 2003 (A, B y C), y Liljegren *et al.*, 2000 (D y E).

Igualmente, son numerosos los genes que participan en más de un proceso. Por ejemplo, el fruto de *Arabidopsis* es una silicua dehiscente que dispersa las semillas mediante un mecanismo similar a un muelle, gracias a la lignificación diferencial que se produce como consecuencia de la correcta formación de las distintas estructuras en su eje medio-lateral (Fig. 14; Liljegren *et al.*, 2000, 2004; Ferrándiz, 2002). El gen MADS-box *FRUITFULL* (*FUL*) y el gen con homeodominio *REPUMLESS* (*RPL*) se expresan en las valvas y el replum, respectivamente, donde impiden la expresión de dos genes MADS-box redundantes, *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) y *SHP2*, restringiéndola a los territorios de margen de valva donde dirigen la especificación de este tejido, posibilitando la posterior dehiscencia del fruto (Fig. 15; Ferrándiz *et al.*, 2000 b; Ferrándiz, 2002; Liljegren *et al.*, 2000, 2004; Roeder *et al.*, 2003). Estas funciones génicas son elementos fundamentales dentro del contexto de actividades antagónicas que rigen la formación del patrón medio-lateral del fruto (Fig. 16; Dinneny *et al.*, 2005, Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007; González-Reig *et al.*, 2012). Curiosamente, *SHP1* y *SHP2*, al igual que *FUL*, se expresan activamente en el estilo.

De hecho, los mutantes *ful* suelen presentar un estilo alargado, por lo que sería razonable que *FUL* contribuyera a modular el crecimiento de esta estructura (Ferrández *et al.*, 2000 a). Por el contrario, se ha demostrado que *SHP1* y *SHP2* promueven la formación del estigma, el estilo y otros tejidos marginales (Colombo *et al.*, 2010). Además, *SHP1* y *SHP2* desempeñan un papel clave en el desarrollo de los óvulos (Pinyopich *et al.*, 2003; ver sección II.3.6).

Otro ejemplo lo constituye el gen *AP2*, que previene el crecimiento excesivo del replum mediante la regulación negativa de los genes con homeodominio *RPL* y *BREVIPEDICELLUS (BP)*, así como del margen de valva, reprimiendo a los genes que confieren identidad a este territorio (Ripoll *et al.*, 2011). *AP2* realiza estas acciones, además de oponerse a la acción de *AG* respecto a la identidad de los órganos florales y a la determinación del meristemo (Zhao *et al.*, 2007; Crogan *et al.*, 2012).

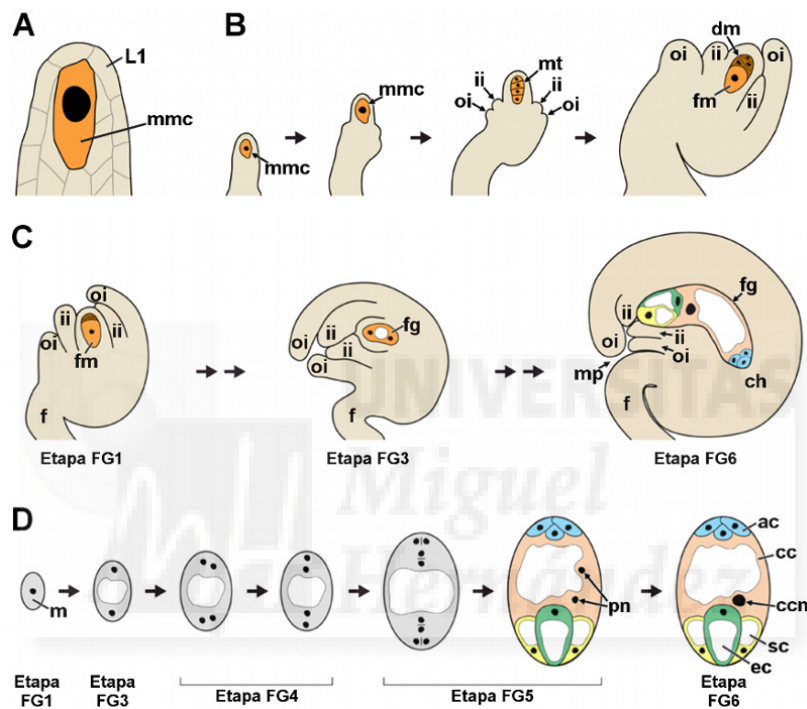


**Figura 16.-** Modelo del establecimiento del patrón medio-lateral del fruto de *Arabidopsis*. La actividad *JAG/FIL* y los genes *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* y *AS2* (factores laterales) promueven la formación de la valva y el margen de valva (MV), mientras que *BP* y *RPL* (factores medios) generan el replum. Existe además un antagonismo mutuo entre las actividades de los factores medios y laterales. Estos últimos forman un gradiente de actividad que determina el desarrollo de valva y de margen de valva: un nivel elevado de los factores laterales promueve la expresión de *FUL* en las valvas, mientras que un nivel reducido de esta actividad induce la expresión de los genes de identidad de margen de valva (Genes MV). Asimismo, estos genes del margen de valva ejercen una represión recíproca con *FUL* y con los factores medios. Tomado de González-Reig *et al.*, 2012, con modificaciones.

### II.3.6.- Desarrollo del óvulo y el gametófito femenino

A diferencia de los animales, las plantas no crean una línea germinal específica durante la embriogénesis, sino que las células germinales se forman a partir de tejidos somáticos florales durante toda la existencia del individuo. En las angiospermas se produce una alternancia entre una generación esporofítica diploide y otra gametofítica

haploide, esta última muy reducida en el tiempo y en tamaño. Así, ambos gametófitos, femenino y masculino, se forman rodeados de tejido esporofítico, coexistiendo ambas generaciones en un único órgano, el óvulo y el grano de polen respectivamente. Dada la íntima conexión entre los tejidos esporofíticos y gametofíticos, no resulta sorprendente el elevado grado de comunicación celular entre ambos durante su desarrollo (Grossniklaus, 2011; Feng *et al.*, 2013). Esta relación complica en ocasiones la distinción entre efectos esporofíticos y gametofíticos en los casos de viabilidad reducida que tienen lugar en algunos mutantes (Muralla *et al.*, 2011).

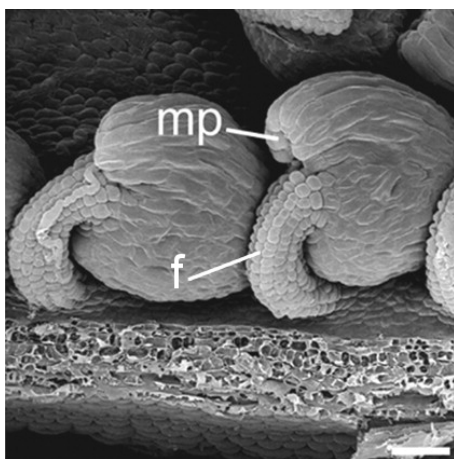


**Figura 17.-** Desarrollo del gametófito femenino. **A)** Región apical de un primordio de óvulo. **B)** Etapas de la megasporogénesis. El primordio del óvulo surge de la placenta, y la célula madre de la megaspora (mmc) experimenta meiosis, dando lugar a cuatro células, de las que mueren tres. La célula que sobrevive será la megaspora funcional (fm). **C)** Visión del desarrollo del óvulo durante diferentes etapas de la megagametogénesis. **D)** Etapas de la megagametogénesis (según Christensen *et al.*, 1998). En la etapa FG1 (*Female Gametogenesis* 1) la megaspora contiene un solo núcleo, que sufre tres rondas de mitosis, originando una célula con 8 núcleos y una gran vacuola. A continuación se generan paredes celulares, y los núcleos polares (pn) se fusionan, dando lugar a un gametófito de 7 células en la etapa FG6. Células antípodas (ac), célula central (cc), núcleo de la célula central (ccn), calaza (ch), megasporas degenerativas (dm), ovocélula (ec), funículo (f), gametófito femenino (fg), integumento interno (ii), capa epidérmica L1 (L1), megaspora (m), micrópilo (mp), tétrada meiótica (mt), integumento externo (oi), células sinérgidas (sc). Imágenes con modificaciones tomadas de Drews y Koltunow, 2011.

En el caso del gametófito femenino o saco embrionario, éste se forma en el interior de los óvulos que surgen de la placenta. Los primordios de óvulo surgen como protuberancias de simetría radial durante el estadio 8 del desarrollo floral (Fig. 17; Tabla 1; Smyth *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2010). Posteriormente se forman tres regiones distintas a lo largo del eje proximodistal, el funículo que conecta con la placenta, la calaza intermedia, donde se formarán los integumentos del óvulo, y una parte distal o

nucela que contiene a la célula madre de la megaspora (*Megaspore Mother Cell*, MMC). La MMC experimenta meiosis, originando una tétrada de megasporas haploides. Tras la degeneración de tres de ellas, la más distal o megaspora funcional dará lugar al saco embrionario, una estructura de 7 células: la ovocélula (el gameto femenino propiamente); dos células de apoyo o sinérgidas, localizadas en el micrópilo y responsables de la atracción del tubo polínico; la célula central (con dos núcleos polares, dará lugar a un endospermo triploide tras la doble fertilización); y tres antípodas, en el lado opuesto del saco embrionario. Durante el estadio 13 de desarrollo floral (Tabla 1) el óvulo está listo para su fertilización (Fig. 17; Yang *et al.*, 2010).

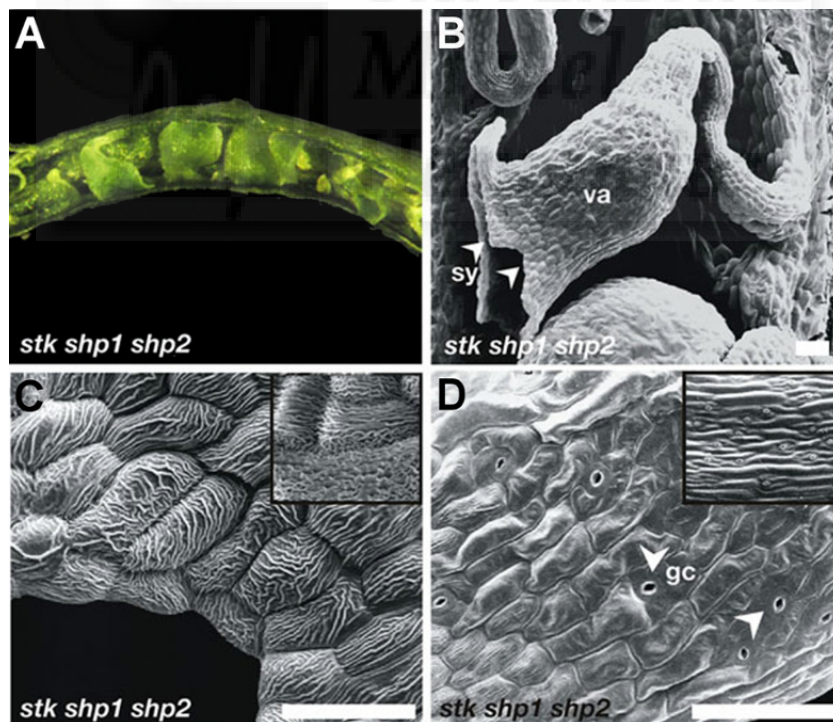
Lógicamente, la correcta adquisición de identidad de los óvulos es un proceso crucial para el éxito reproductivo, por lo que no resulta sorprendente que sea una operación sujeta a un estricto control genético. De hecho, la razón por la que los genes *SEP* fueron adscritos a una nueva “clase E” es que la denominación “D” fue previamente asignada a la función de identidad de óvulo. La información al respecto provino de mutantes que mostraban transformaciones de los óvulos en estructuras u órganos carpeloides. Uno de ellos es *bell1* (*bel1*), afectado en la función de la proteína con homeodominio BEL1 y que desarrolla estructuras carpeloides, incluso con óvulos ectópicos (Robinson-Beers *et al.*, 1992), sugiriéndose que esto era debido a la expresión ectópica de *AG* en los integumentos (Ray *et al.*, 1994). Pero lo cierto es que *AG* también desempeña un papel en el desarrollo del óvulo, como indica el doble mutante *ag ap2*. En plantas *ap2* los sépalos se transforman en estructuras carpelares con óvulos ectópicos, alguno de los cuales desarrolla a su vez rasgos carpelares. Sin embargo, en *ag ap2* los sépalos mantienen características carpelares y aumenta el número de óvulos que se transforman en estructuras carpeloides (Western y Haughn, 1999; Pinyopich *et al.*, 2003).



**Figura 18.-** Óvulo silvestre. La micrografía electrónica de barrido (SEM) muestra óvulos silvestres unidos a la placenta a través del funículo (f). Se destaca el micrópilo (mp). Barra de escala: 20  $\mu$ m. Imagen tomada de Chevalier *et al.*, 2005, con modificaciones.



Los genes de función D *SHP1*, *SHP2* y *SEEDSTICK* (*STK*) forman un grupo monofilético con *AG* (Parenicová *et al.*, 2003) y, en ausencia de éste, proporcionan identidad carpelar en ciertos contextos genéticos (Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003). *STK* es necesario para el desarrollo correcto del funículo (estructura umbilical que conecta el óvulo a la placenta) y para la dispersión de la semilla tras la maduración del fruto (Fig. 18; Pinyopich *et al.*, 2003). En el doble mutante *shp1 shp2* se forman frutos indehiscentes por falta de desarrollo del margen de valva pero no se informó de defectos en el óvulo (Liljegren *et al.*, 2000; Pinyopich *et al.*, 2003). Sin embargo, en el triple mutante *shp1 shp2 stk* muchos óvulos pierden su identidad y se transforman en estructuras carpelares (Fig. 19; Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003). En experimentos de interacción proteica en levadura se comprobó que *STK*, *SHP1*, *SHP2* y *AG* pueden formar complejos de orden superior siempre que se añada *SEP3* (Favaro *et al.*, 2003). Esto involucra a *SEP3* en la adquisición de identidad de óvulo e indica que *AG* puede formar complejos con *SEP3* para especificar el carpelo, pero también puede formar parte de los complejos que intervienen en la determinación de los óvulos.



**Figura 19.-** Fenotipos en el óvulo del triple mutante *stk shp1 shp2*. **A)** Sección de un fruto en el que varios óvulos han sufrido una conversión a estructuras de tipo carpeloide. **B)** SEM de uno de estos órganos unido a la placenta por un funículo, y que presenta zonas con características de valva (va) y células de tipo estilar (sy) en su extremo distal. **C)** Magnificación de la estructura carpeloide mostrada en (B) donde se aprecian las estriaciones epicuticulares de las células, supuestamente de tipo estilar (estilo silvestre en el recuadro). **D)** Ampliación de las células centrales del órgano mostrado en (B) con similitudes a las células de valva de un carpelo silvestre (recuadro). Barras de escala: 50  $\mu$ m (B y D), y 20  $\mu$ m (C). Imágenes modificadas de Pinyopich *et al.*, 2003.

En el cuádruple mutante *bel1 stk shp1 shp2* se forman estructuras carpeloides en lugar de óvulos. Además, de estos órganos y del funículo pueden surgir a su vez óvulos ectópicos (Brambilla *et al.*, 2007). No obstante, no se ha registrado aún ningún mutante o combinación mutante de identidad de óvulo que pierda todas sus regiones características, nucela, calaza, integumentos y, particularmente, el funículo, por lo que se supone la existencia de factores adicionales aún por determinar (Skinner *et al.*, 2004).

Que el desarrollo del óvulo se halla interconectado con el desarrollo del gametófito haploide femenino lo ilustra el mutante *sporocyteless/nozzle (spl/nzz)*, donde no se especifica la MMC, impidiendo el desarrollo del gametófito y condicionando el posterior desarrollo del óvulo en sí (Schiefthaler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). *SPL/NZZ* codifica un factor de transcripción con cierta semejanza a los factores MADS-box y es directamente activado por *AG*. No obstante, una vez inducido *SPL*, *AG* no es necesario para el mantenimiento de su expresión (Ito *et al.*, 2004). Además de la no especificación de la MMC, otros defectos en *spl* incluyen funículos más largos, crecimiento defectuoso de los integumentos y nucela reducida. El doble mutante *spl bel1* desarrolla protuberancias sin integumentos en lugar de óvulos, y se ha demostrado que median la acción de las citoquininas (CK) durante la morfogénesis de éstos (Balasubramanian y Schneitz, 2002; Bencivenga *et al.*, 2012).

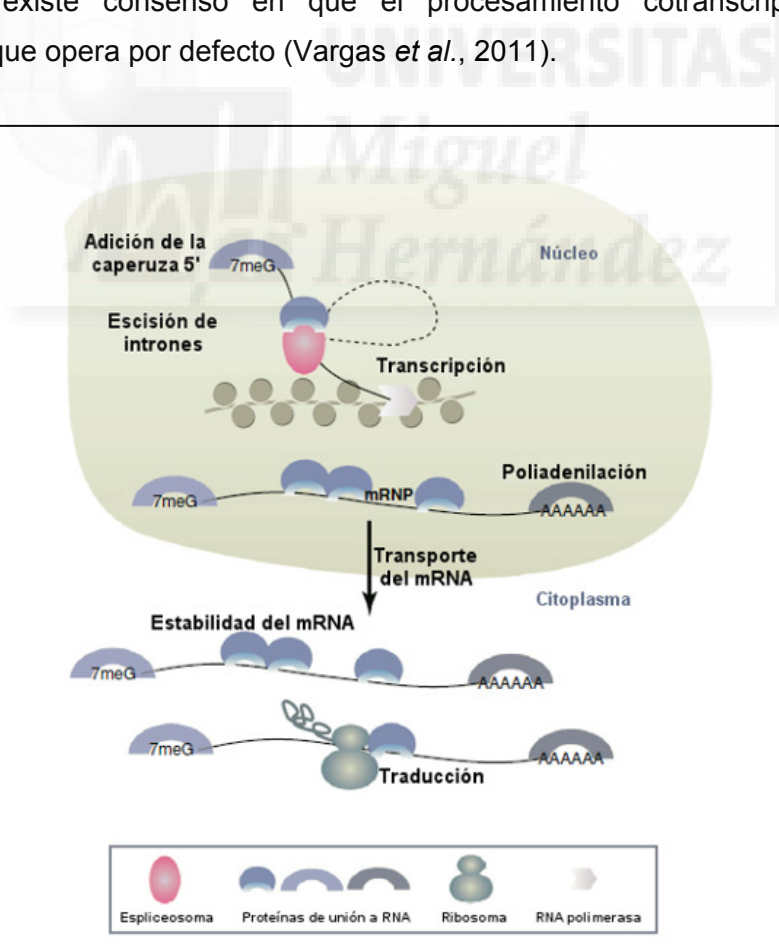
Igualmente, *SPL* es fundamental tras *AG* en la formación y maduración de los estambres, las anteras, los granos de polen y el esporófito masculino (Ito *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2007). Se ha documentado además su papel contribuyendo a conferir identidad de estambre en el tercer verticilo (Liu *et al.*, 2009). Por todo ello, la disminución o pérdida de la actividad *SPL* supone un serio obstáculo para el éxito reproductivo.

#### **II.4.- CONTROL POSTTRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEÍNAS DE UNIÓN A RNA**

Como ejemplifica *Arabidopsis*, el ciclo de vida de los eucariotas atraviesa distintas fases en su desarrollo que están marcadas por patrones espacio-temporales específicos de expresión génica. El control genético de estas operaciones se asienta en complejos sistemas de coordinación basados en sistemas de señalización inter e intracelulares que suelen desembocar en acciones de control transcripcional (Kaufmann *et al.*, 2010). Sin embargo, cada vez resulta más obvia la importancia de la superposición de distintos niveles de regulación génica (*multilayer regulation*) que

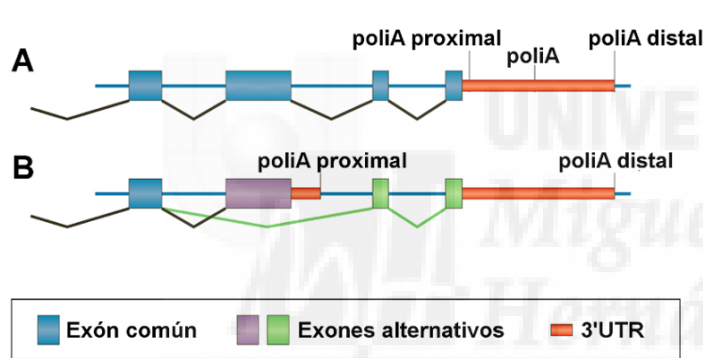
contribuyen a una modulación más ajustada a las necesidades celulares y confieren robustez frente a las fluctuaciones del entorno (Palumbo *et al.*, 2008; Dahan *et al.*, 2011). Esto comprende la regulación de los estados de la cromatina, el control transcripcional, el procesamiento postranscripcional del RNA, su transporte y traducción, las modificaciones postraduccionales, etc. (Fig. 20).

Cada vez es más evidente que estas operaciones de control genético se hallan íntimamente interconectadas, resultando muy difusa en ocasiones la demarcación entre distintos tipos de control (Dahan *et al.*, 2011; Albulescu *et al.*, 2012). Por ejemplo, las evidencias experimentales indican que el procesamiento de intrones suele tener lugar simultáneamente a la elongación del transcrito nascente, es decir, cotranscripcionalmente mediante la asociación de elementos que participan en uno y otro proceso (Fig. 20; Pandya-Jones y Black, 2009; Singh y Padgett, 2009). Se ha comprobado en genes humanos con intrones de gran tamaño (>100kb) que su expresión es sorprendentemente rápida y eficaz debido a este nivel de coordinación que coadyuva a la fidelidad del proceso (Singh y Padgett, 2009; Vargas *et al.*, 2011). De hecho, existe consenso en que el procesamiento cotranscripcional es el mecanismo que opera por defecto (Vargas *et al.*, 2011).



**Figura 20.-** Esquema en el que se representan diversos procesos de control de la expresión génica en los que participan proteínas de unión a RNA. Imagen modificada de Ānko y Neugebauer, 2012.

De igual modo, la maduración del RNA mediante corte y poliadenilación en su extremo 3' también ocurre cotranscripcionalmente, siendo un requisito para finalizar la transcripción (Elkon *et al.*, 2013; Tian y Manley, 2013). Además, el uso de múltiples lugares de poliadenilación, junto con el procesamiento alternativo de intrones, supone una fuente importante de variabilidad en el transcriptoma (Berg *et al.*, 2012; Tian y Manley, 2013). Por consiguiente, ambas operaciones no sólo están estrechamente interconectadas con el progreso de la transcripción, sino que en muchos casos se ha verificado su mutua interdependencia (Kaida *et al.*, 2010; Albulescu *et al.*, 2012; Elkon *et al.*, 2013; Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013). Los nuevos transcritos que se están sintetizando son vulnerables a errores en el procesamiento del intrón o al corte y poliadenilación prematuros que tienen lugar como consecuencia de señales de poliadenilación crípticas, a menudo en secuencias intrónicas, por lo que es crucial la coordinación entre ambos procesos (Fig. 21; Kaida *et al.*, 2010).

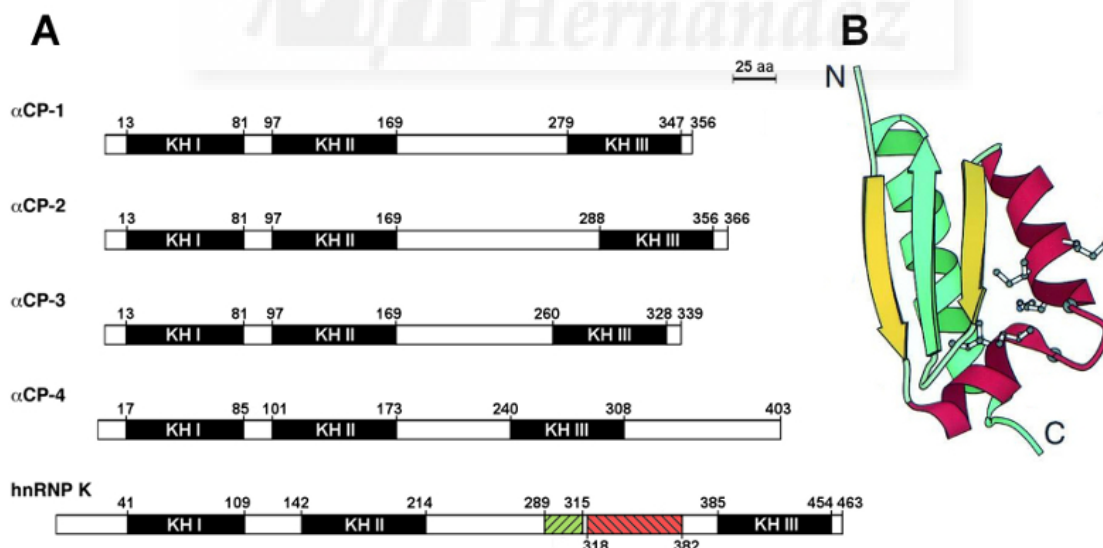


**Figura 21.-** Ejemplos de poliadenilación alternativa. **A)** Sitios de poliadenilación alternativa en tándem dentro del 3'UTR (*untranslated región*), generando isoformas que difieren en la longitud del 3'UTR sin afectar a la proteína codificada. **B)** La poliadenilación alternativa en posiciones anteriores al último exón, puede dar lugar a transcritos aberrantes no efectivos. Imagen tomada de Elkon *et al.*, 2013, con modificaciones.

Para la ejecución de estas acciones, el transcrito naciente se asocia con numerosas “proteínas de unión a RNA” o RBP (*RNA Binding Proteins*) que cuentan con diversos motivos de unión a RNA y de interacción con otros polipéptidos, formando complejos de ribonucleoproteínas (RNP) multifuncionales (Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013). Esta multifuncionalidad se debe en gran medida a la versatilidad de las distintas RBP que se asocian al mRNA y regulan distintas etapas del metabolismo del RNA, influyendo en el resultado neto del nivel de expresión génica (Wilkinson y Shyu, 2001; Chaudhury *et al.*, 2010; Änko y Neugebauer, 2012). Las mutaciones en las RBP o en las secuencias en *cis* que gobiernan estas asociaciones RNA-proteína pueden dar origen a alteraciones en el desarrollo y enfermedades (Änko y Neugebauer, 2012; Radomska *et al.*, 2013).

## II.5.- EL DOMINIO KH DE UNIÓN A RNA Y LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

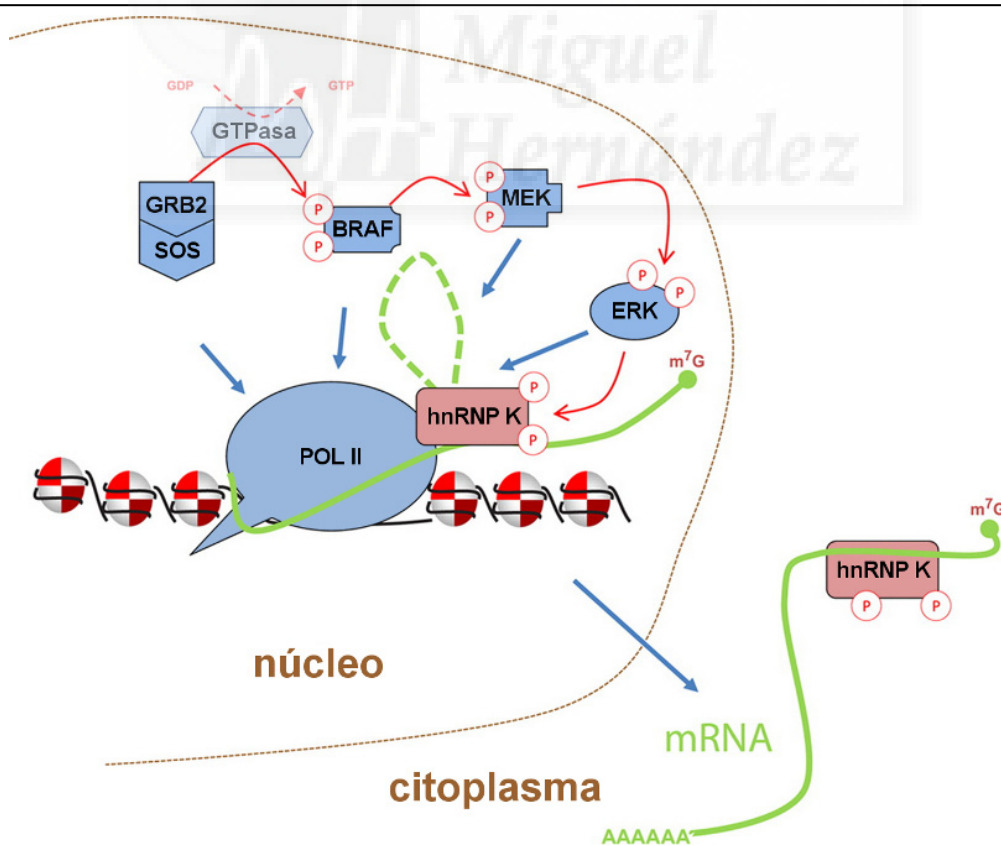
Algunos dominios de unión a RNA también pueden poseer afinidad por el DNA y proporcionar una base estructural para interacciones proteína-proteína, contribuyendo al carácter polifacético de las proteínas RBP. Tal es el caso del dominio KH (*K-homology*; Grishin, 2001; Makeyev y Liebhaber, 2002; Valverde *et al.*, 2008; Chaudhury *et al.*, 2010), así denominado por haberse identificado originalmente en la ribonucleoproteína heterogénea nuclear humana K (hnRNP K, *heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K*; Fig. 22; Siomi *et al.*, 1993). El dominio KH es el segundo motivo de unión a RNA más frecuente, tras el dominio RRM, y se ha encontrado en todos los grupos filogenéticos (Burd y Dreyfuss, 1994). Comprende aproximadamente unos 60 aminoácidos con un patrón característico de residuos hidrofóbicos y un núcleo invariable VIGXXGXXI en el centro del dominio (Burd y Dreyfuss, 1994). Las mutaciones en el motivo KH pueden generar importantes alteraciones durante el desarrollo, como se ha documentado extensamente en sistemas animales (Liu *et al.*, 2008), incluyendo síndromes humanos como el X-frágil, debido a la disfunción del gen KH *FMRP1* (*Familial Mental Retardation Protein1*; De Boulle *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1994).



**Figura 22.-** El dominio KH. **A)** Representación esquemática de la posición de los dominios KH presentes en los miembros de la familia humana de las PCBP. El rectángulo verde simboliza el dominio KI (*K protein interactive region*), y el rojo, la señal KNS (*hnRNP K nuclear shuttling domain*) de transporte al núcleo. Los números indican las posiciones de los diversos elementos mostrados. **B)** Estructura tridimensional del dominio KH más próximo al extremo C-terminal de la hnRNP K. Se han indicado los extremos N- y C-terminales. Imágenes modificadas de Makeyev y Liebhaber, 2002 (A) y Grishin, 2001 (B).



La hnRNP K o proteína K, además de ser el miembro tipo de las proteínas KH, es también un miembro representativo de las proteínas de unión a policitosina o PCBP (*Poly(C)-Binding Proteins*). Las PCBP constituyen una familia de proteínas que se unen a ácidos nucleicos, caracterizadas por su capacidad de interactuar con homopolímeros de poliC (Makeyev y Liebhaber, 2002). En células de mamífero se han identificado hasta el momento 5 miembros, concretamente la hnRNP K y las PCBP1 a 4 (también conocidas como  $\alpha$ CP-1 a 4; las PCBP1 y 2 son denominadas igualmente como hnRNP E1 y E2, respectivamente). Estas proteínas PCBP están relacionadas evolutivamente y presentan una disposición común de tres módulos KH: dos consecutivos en el extremo N-terminal, una región intermedia de longitud variable y un tercer dominio KH más separado de los dos anteriores (Fig. 22 A; Makeyev y Liebhaber, 2002). Las PCBP son particularmente polifacéticas, participando en un amplio espectro de mecanismos de regulación génica, desde el control transcripcional (Choi *et al.*, 2009) a diversas operaciones de regulación postranscripcional, como procesamiento de intrones, corte y poliadenilación, control traduccional, etc. (Makeyev y Liebhaber, 2002; Ji *et al.*, 2011 b; Liu y Szaro, 2011; Cao *et al.*, 2012; Naganuma *et al.*, 2012).



**Figura 23.-** Esquema de la cascada de activación de la quinasa ERK. hnRNP K interviene tanto en la transducción de la señal mediante fosforilación al CTD (*Carboxyl Terminal Domain*) de la RNA polimerasa II, como en la síntesis, *splicing* y estabilidad del pre-mRNA del gen *EGR-1*, y en su posterior transporte al citoplasma. Imagen modificada de Mikula y Bomsztyk, 2011.

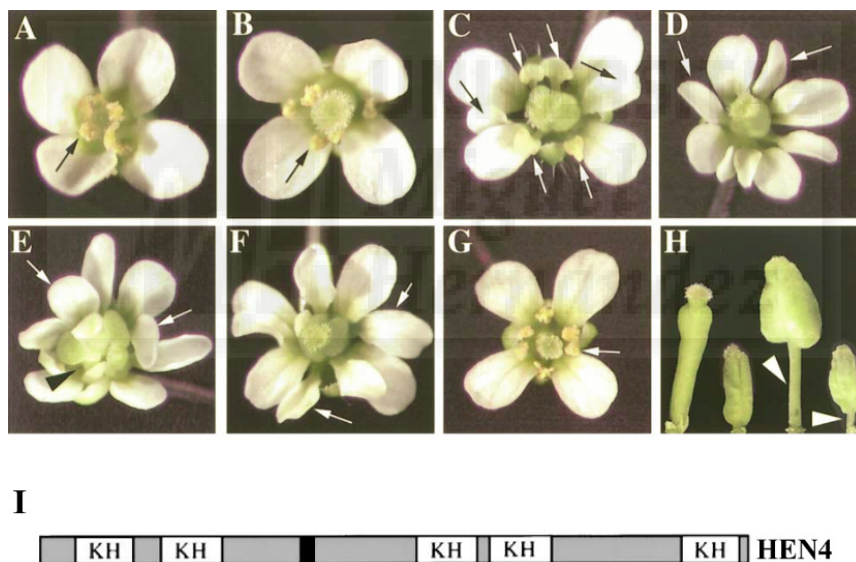
Las PCBP son igualmente versátiles considerando los procesos biológicos en los que están involucradas, como la eritropoyesis, la síntesis de colágeno, regulación de la actividad de los telómeros, apoptosis, control del ciclo celular mediado por la proteína p53, axonogénesis y diferenciación neuronal, desarrollo de células germinales, etc. (Makeyev y Liebhaber, 2002; Du *et al.*, 2004; Thiele *et al.*, 2004; Deshpande *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2012). Las funciones biológicas de las PCBP aún se diversifican más por su capacidad de unirse al DNA y actuar como reguladores transcripcionales (Choi *et al.*, 2009). Por ejemplo, la hnRNP K se une a los promotores de los genes humanos *c-myc* o *BRCA1*, entre otros, activando su transcripción (Choi *et al.*, 2009), aunque también puede actuar como represor (Da Silva *et al.*, 2002). Por último, se han verificado interacciones entre PCBP como hnRNP K o PCBP1 y quinasas del tipo MAPK, mediante las cuales se transmiten señales que gobiernan las posteriores interacciones entre las PCBP y sus sustratos de ácidos nucleicos, así como con otros polipéptidos con los que interactúan. Por ello las PCBP se han comparado con plataformas de integración de los mecanismos de señalización celular y el metabolismo de los ácidos nucleicos (Fig. 23; Makeyev y Liebhaber, 2002; Meng *et al.*, 2007; Mikula y Bomsztyk, 2011).

## II.6.- GENES KH EN *Arabidopsis*

En *Arabidopsis* existen 26 genes que codifican proteínas con dominios KH (Lorković y Barta, 2002), de los cuales sólo unos pocos se han caracterizado funcionalmente. RIK (RS2-Interacting KH protein) es una proteína nuclear expresada en el SAM con un único motivo KH y un dominio helicasa. RIK fue identificada por su interacción en el sistema de doble híbrido de levaduras con el factor de transcripción ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1), por lo que se especula con un papel en la represión que AS1 ejerce sobre los genes de tipo *KNOX* meristemáticos (Phelps-Durr *et al.*, 2005). Recientemente, se identificó *RCF3* (*REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION3*), un gen con 5 motivos KH implicado en la tolerancia frente al choque térmico (Guan *et al.*, 2013). Este gen fue identificado posteriormente como *SHINY1* (*SHI1*) y *HIGH OSMOTIC STRESS GENE EXPRESSION 5* (*HOS5*), cuyo producto interacciona con la fosfatasa CPL1 (C-terminal Domain Phosphatase-like 1), que afecta el estado de fosforilación del dominio c-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II, influyendo tanto en la transcripción como en el procesamiento del mRNA de genes relacionados con estrés abiótico (Chen *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013).

No obstante, el primer gen KH caracterizado funcionalmente fue *HEN4* (*HUA ENHANCER4*). *HEN4* codifica una proteína con 5 dominios KH sin homólogos evidentes en animales, involucrada en el desarrollo floral (Fig. 24 I; Cheng *et al.*, 2003). Su denominación deriva del hecho de que la mutación *hen4* se identificó tras una mutagénesis del fondo doble mutante *hua1 hua2* (*HUA*, flor en chino), donde incrementa los fenotipos relacionados con la disminución de función C observados en dicho doble mutante (Fig. 24; Cheng *et al.*, 2003).

*HUA1* y *HUA2* también codifican polipéptidos presuntamente relacionados con el procesamiento postranscripcional. *HUA1* es una proteína a veces referida como presunto factor de transcripción y, en ocasiones, como factor de regulación post-transcripcional. Lo cierto es que contiene 6 motivos de dedos de zinc de tipo CCCH cuya función no está clara, pero se halla presente en proteínas que actúan sobre pre-mRNA en el núcleo (Li *et al.*, 2001). Por su parte, *HUA2* codifica un polipéptido con un dominio RPR (*Regulation of nuclear pre-mRNA*; Chen y Meyerowitz, 1999).



**Figura 24.-** Fenotipos causados por las mutaciones *hua1*, *hua2* y *hen4*. Las flechas indican órganos del tercer verticilo. **A)** Flor silvestre *Ler*. **B)** Flor *hua1 hua2-1*. **C-E)** Flores tempranas, intermedias y tardías, respectivamente, de plantas triples mutantes *hua1 hua2-1 hen4-1*. Se han indicado los órganos de tercer verticilo de posiciones medias (flechas blancas) y laterales (flechas negras). **F)** Flor temprana del genotipo *hua1 hua2-1 hen4-2*, con transformaciones homeóticas a pétalo en el tercer verticilo. **G)** Flor del mutante *hua1 hen4-1*, con fenotipo silvestre. **H)** De izquierda a derecha, gineceo de una flor *hua1 hua2-1*, gineceos de flores *hua1 hua2-1 hen4-1* temprana y tardía, respectivamente, y gineceo de una flor temprana de genotipo *hua1 hua2-1 hen4-2*. Los dos últimos poseen un ginóforo alargado (triángulos blancos). **I)** Diagrama de la proteína HEN4 con los cinco dominios KH, donde también se ha indicado la señal de localización nuclear (rectángulo negro). Imágenes tomadas de Cheng *et al.*, 2003, con modificaciones.

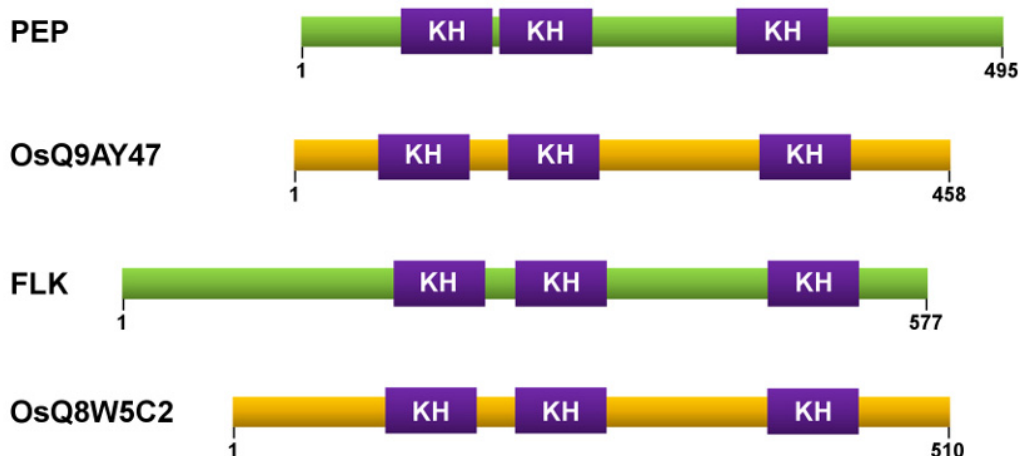
Los mutantes simples y varias combinaciones dobles carecen de fenotipos visibles o resultan muy sutiles, salvo el caso de *hua1 hua2*, requiriendo combinaciones de orden superior para apreciar su efecto (Fig. 24; Chen y Meyerowitz, 1999; Li *et al.*,



2001; Cheng *et al.*, 2003). Un caso claro de redundancia funcional entre genes estructuralmente no relacionados. La acumulación de mutaciones *hua1*, *hua2* y *hen4* produce transformaciones homeóticas de órganos florales y defectos de determinación del meristemo floral como resultado de la disminución progresiva de los niveles del mRNA de *AG*, acompañada de la acumulación de transcritos aberrantes con secuencias intrónicas. Además, *HUA1* presenta afinidad *in vitro* por el pre-mRNA de *AG* e interacciona físicamente con *HEN4*. Por tanto, se les asignó un papel en el procesamiento postranscripcional del pre-mRNA de *AG*, particularmente de su intrón 2 de gran longitud (Cheng *et al.*, 2003).

Posteriormente, también se identificó *HUA2* como un factor regulador de la transición floral (Doyle *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Curiosamente, ejerce tal acción activando la expresión del mRNA de *FLC* y de otros genes MADS-box de su grupo monofilético, como *FLM* (*FLOWERING LOCUS M*), también represores de la floración, los cuales comparten con *AG* la presencia de un intrón inusualmente grande en plantas, por lo que se hipotetizó un mecanismo común para su procesamiento (Doyle *et al.*, 2005).

En la sección II.3.2 se mencionó brevemente *FLK* como uno de los componentes de la ruta autónoma de floración. *FLK* codifica un polipéptido de localización nuclear con tres motivos KH relacionado con el grupo PCBP de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP; Fig. 25; Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004). Su pérdida de función conlleva retraso en la floración, principalmente ocasionado por la desregulación de *FLC*, de lo que se deduce su papel como inductor de la transición reproductiva (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004).

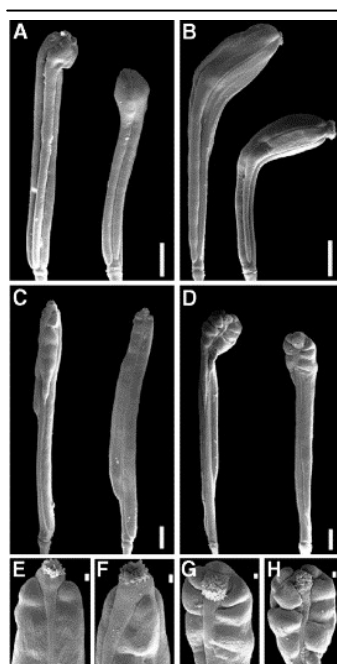


**Figura 25.-** Esquema de las proteínas PEP y FLK, y de sus presuntos ortólogos en arroz. Las proteínas de *Arabidopsis* se muestran en color verde, y las de arroz en naranja. Los rectángulos morados representan los dominios KH en las posiciones relativas donde se encuentran dentro de cada polipéptido. Los números indican los tamaños en aminoácidos.

El gen *PEPPER* (*PEP*), inicialmente caracterizado en nuestro laboratorio (Ripoll, 2004; Ripoll *et al.*, 2006), también codifica una proteína con tres motivos KH con la misma configuración que FLK y el resto de las PCBP. Ambos parálogos, *FLK* y *PEP*, presentan un 42,4% de similitud respecto a sus secuencias aminoacídicas y poseen presuntos ortólogos en arroz (Fig. 25; Ripoll *et al.*, 2006). Se comprobó que *PEP* ejerce funciones que afectan al desarrollo vegetativo. Pero además, los estudios previos proporcionaron numerosos indicios que sugieren la implicación de *PEP* en distintos procesos del desarrollo reproductivo (Ripoll, 2004; Ripoll *et al.*, 2006; datos no publicados).

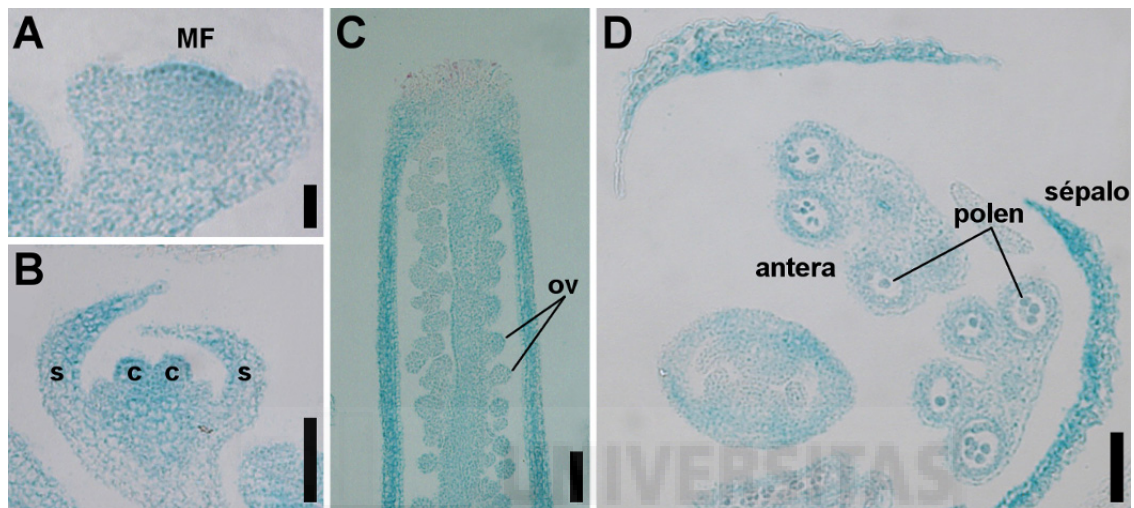
## II.7.- ANTECEDENTES

Además de ciertas alteraciones en las hojas vegetativas y el patrón de filotaxia (Ripoll, 2004; Ripoll *et al.*, 2006), los mutantes *pep* manifiestan algunas alteraciones sutiles en el desarrollo del pistilo, destacando la presencia de carpelos supernumerarios, aunque con muy baja penetrancia. No obstante, la mutación *pep* incrementa la intensidad del fenotipo de los mutantes *clv*, sugiriendo un papel en la función del meristemo floral (Fig. 26; Ripoll *et al.*, 2006). Y, como cabría esperar de una función génica implicada en la morfogénesis floral, *PEP* se expresa activamente en el meristemo floral y en los órganos florales en desarrollo, incluyendo carpelos y estambres (Fig. 27; Ripoll *et al.*, 2006). Además, posteriormente se expresa en los óvulos y en los granos de polen (Fig. 27; Ripoll *et al.*, 2006).



**Figura 26.-** Fenotipos de los mutantes dobles *clv pep*. **A)** Frutos representativos del mutante *clv3-2* introgresado en un fondo Col-0, y sin la mutación *er*. **B)** Frutos del doble mutante *clv3-2 pep-4* que aparecen doblados e hinchados. **C)** Frutos representativos de plantas con la mutación *clv2-1*, introgresadas en un fondo Col-0 y que carecen de la mutación *er*, donde se observan valvas extra cortas. **D)** Frutos del doble mutante *clv2-1 pep-4* cuya región apical se muestra engrosada y doblada, y las valvas están arrugadas. **E-H)** Magnificación de la porción apical de los frutos *clv2-1* mostrada en el panel C (E y F), y de los frutos *clv2-1 pep-4* mostrados en el panel D (G y H). Barras de escala: 1 mm (A-D) y 100  $\mu$ m (E-H). Imágenes tomadas de Ripoll *et al.*, 2006.

La falta de fenotipos conspicuos en los mutantes nulos *pep* sugiere la existencia de redundancia funcional con otras actividades génicas representadas por parálogos cercanos, o bien por genes estructuralmente diversos, como ocurre durante el control del mRNA de AG, efectuado por genes que codifican proteínas con distintos dominios de unión a RNA y cuyos mutantes simples de pérdida de función carecen de fenotipo visible alguno (Chen y Meyerowitz, 1999; Li *et al.*, 2001, Cheng *et al.*, 2003).



**Figura 27.-** Visualización de la expresión de *PEP* en plantas silvestres (Col-0) mediante el uso de la construcción *PEP::GUS*. **A)** Corte longitudinal de una flor de estadio 3 donde se observa una coloración intensa en el meristemo floral (MF). **B)** Corte longitudinal de una flor de estadio 6, con una clara expresión en los primordios de sépalo (s) y de carpelo (c). **C)** Corte longitudinal de un pistilo con señal en las valvas y también en los óvulos (ov). **D)** Corte transversal de una flor. Se puede observar la expresión de *PEP* en el pistilo, y también en las anteras, así como en los granos de polen. Los sépalos están más intensamente teñidos en la superficie adaxial. Barras de escala: 10  $\mu$ m (A) y 50  $\mu$ m (B, C y D).

Algunos de los factores que operan durante la morfogénesis floral, como *HUA2*, también desempeñan un papel previo regulando positivamente a genes represores de la transición floral, señalando su multifuncionalidad. Los mutantes *flk*, al margen del retraso en el tiempo de floración, carecen de fenotipos morfológicos, a pesar de expresarse en todos los órganos de la planta (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004), por lo que también resulta factible que algunos efectos de su falta de función se encuentren compensados por otras actividades génicas. *FLK* y *PEP* codifican presuntas hnRNP de tipo PCBP. Es característico de este grupo de proteínas su versatilidad funcional respecto a las distintas etapas de la expresión génica y los numerosos procesos del desarrollo en los que participan (Makeyev y Liebhaber, 2002). Por tanto, resultaba verosímil que la hipotética multifuncionalidad de *PEP* y *FLK* reflejara esta cualidad de las PCBP en plantas.



### **III.- OBJETIVOS**





### III.- OBJETIVOS

Cada vez es más evidente que la regulación de la expresión genética es el resultado de numerosas acciones coordinadas e interconectadas (transcripción, procesamiento del RNA, transporte, estabilidad, etc.) que contribuyen a modular las respuestas del organismo frente a fluctuaciones internas (desarrollo) o medioambientales. En organismos sésiles como las plantas, esta propiedad resulta crucial, y una manera de contribuir al conocimiento de los mecanismos implicados es el estudio de actividades génicas potencialmente capacitadas para intervenir en ellos, como son las proteínas con dominios multifuncionales de unión a RNA.

Nos planteamos estudiar la incidencia del gen *PEP* en distintos procesos y etapas del desarrollo reproductivo, particularmente la transición reproductiva y la morfogénesis floral. Utilizando *PEP* como eje central de nuestro trabajo, pretendemos contribuir a esclarecer si presuntas proteínas de unión a RNA del tipo PCBP, como *PEP* y *FLK*, despliegan una variada gama de acciones durante el desarrollo de *Arabidopsis*, tal como ocurre en los metazoos. Sus funciones pueden estar enmascaradas por efectos de solapamiento funcional. ¿Se restringe dicha redundancia a genes parálogos o incluye genes no relacionados estructuralmente?

Con estas premisas establecimos los siguientes objetivos:

1. Comprobar si *PEP* desempeña un papel en el control del tiempo de floración y desentrañar de qué manera lo lleva a cabo.
2. Examinar la posible relación de redundancia funcional de *PEP* con su parálogo *FLK* respecto al control de la transición floral.
3. Analizar la relación molecular entre *PEP* y *FLK*.
4. Comprobar la influencia de *PEP* durante la morfogénesis floral, particularmente la determinación del meristemo floral y la identidad de carpelos y estambres, mediante el análisis genético y molecular de combinaciones mutantes con alelos de genes involucrados en el mantenimiento del gen *AG* de función C.
5. Analizar el efecto de la actividad *PEP* sobre la expresión del gen *AG*, así como de otros genes relacionados con los procesos de morfogénesis floral en estudio.
6. Verificar si la proteína *PEP* interacciona físicamente con otras proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA de *AG*.
7. Comprobar la posible implicación del gen *FLK* en la morfogénesis floral, su interacción con *PEP* y con otras actividades de unión a RNA.

8. Debido a su expresión en óvulos y granos de polen, realizar un estudio preliminar sobre la participación de *PEP*, junto con otras actividades génicas de unión a RNA, en etapas del desarrollo reproductivo posteriores a la formación de los órganos florales
9. Proponer un modelo de acción molecular para PEP.





## **IV.- RESULTADOS**





## IV.- RESULTADOS

### IV.1.- CAPÍTULO 1. EL GEN *PEP* ES UN REGULADOR DE LA TRANSICIÓN FLORAL

Como se ha descrito previamente, el gen *PEP* codifica una proteína con tres motivos KH, la misma configuración que el producto de *FLK*, su parólogo más cercano (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004; Ripoll *et al.*, 2006), el cual a su vez también se expresa en las hojas vegetativas, en la flor y en la silicua (Mockler *et al.*, 2004). Así pues, resultaba verosímil que pudiera existir redundancia funcional entre ambos productos, tanto respecto a la transición reproductiva como en relación a la morfogénesis de la flor.

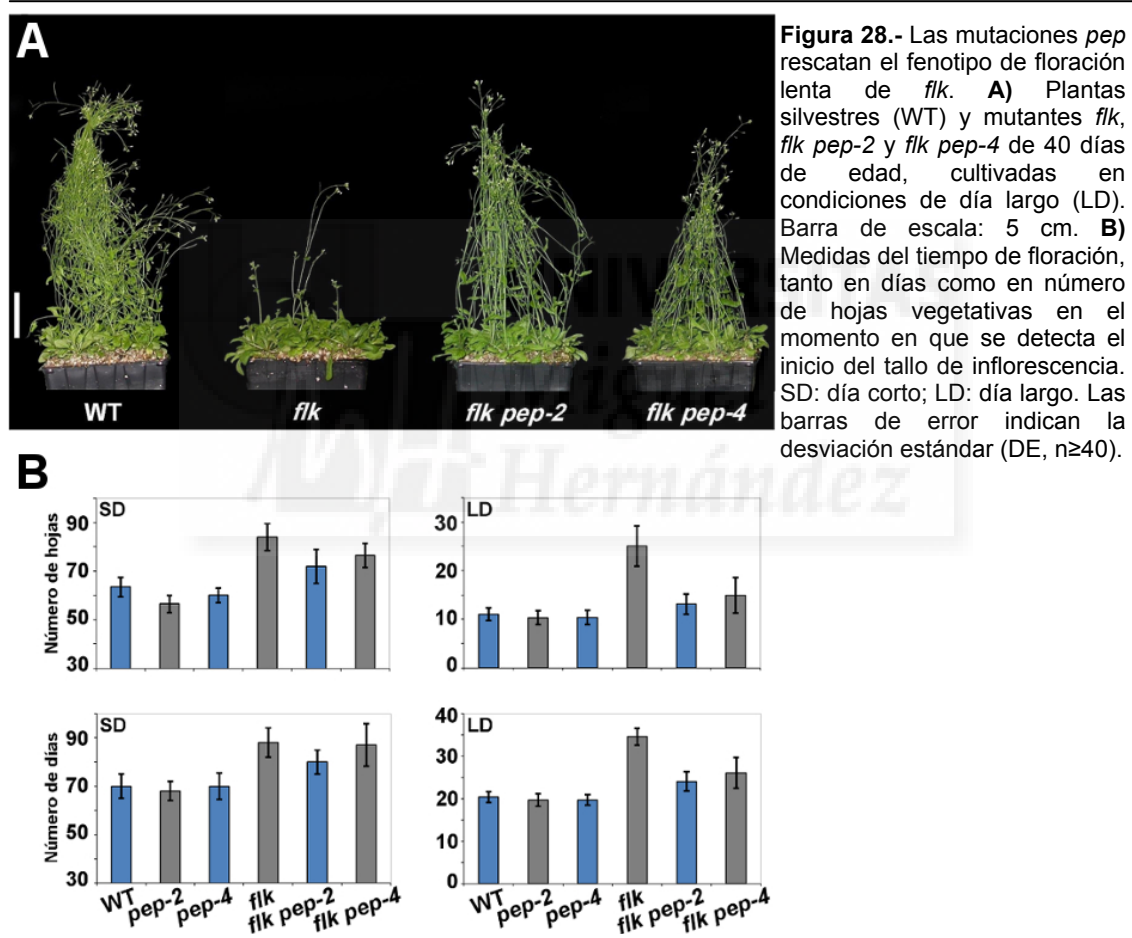
#### IV.1.1.- Las mutaciones *pep* rescatan el fenotipo de floración tardía de las plantas *flk*

Con objeto de revelar un presunto solapamiento funcional entre *FLK* y *PEP*, construimos los dobles mutantes *flk-2 pep-4* y *flk-2 pep-2* en un fondo genético homogéneo Columbia (Col-0). Tanto *flk-2* (a partir de ahora, por simplicidad, *flk*) como *pep-4* son alelos recesivos con pérdida completa de su función (Mockler *et al.*, 2004; Ripoll *et al.*, 2006). Por otro lado, *pep-2* es un alelo peculiar que, en algunos aspectos, presenta fenotipos más fuertes que un alelo nulo, aunque también se transmite de manera recesiva, por lo que, muy probablemente, se trata de una mutación recesiva interferente o antimorfa recesiva (Strader *et al.*, 2004; Ripoll *et al.*, 2006; Sijacic *et al.*, 2013). Sin embargo, en términos del tiempo de floración ambos alelos *pep* se comportan de manera equivalente (ver más adelante).

El análisis preliminar de los dobles mutantes *flk pep* no nos permitió advertir ninguna alteración morfológica de relevancia en sus flores. No obstante, detectamos un comportamiento llamativo respecto al tiempo de floración. Como se había descrito (Mockler *et al.*, 2004), las plantas *flk* florecieron tarde en condiciones de día largo (LD, *Long Day*; Fig. 28). Por contra, los mutantes simples *pep* mostraron fenotipos de floración sutilmente adelantados respecto a su ancestro silvestre (Fig. 28 B). Sin embargo, comprobamos que sorprendentemente las mutaciones *pep* eran capaces de rescatar el fenotipo de floración tardía de *flk* en condiciones de día largo, aunque no

completamente, probablemente debido a la redundancia de *PEP* con actividades génicas adicionales.

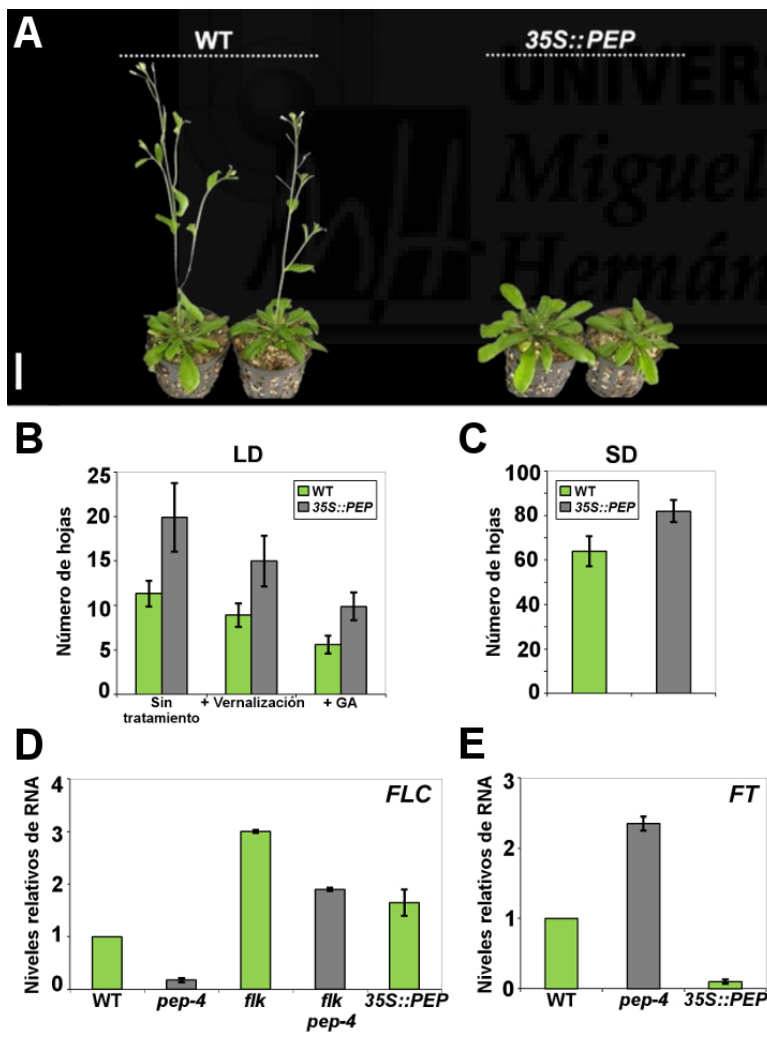
El rescate parcial de la floración tardía de *flk* también ocurrió en régimen de día corto (SD, *Short Day*; Fig. 28 B). En estas condiciones, los ensayos se detuvieron a los 100 días desde la siembra, como habían procedido otros autores (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004), por lo que muchos individuos *flk* no florecieron en dicho periodo. Por tanto, nuestros resultados en día corto (Fig. 28 B), de hecho, incluyen datos de un número limitado de plantas *flk*, claramente infravalorando las diferencias entre *flk* y el resto de los genotipos. En suma, estos datos indican que *PEP* se comporta como un regulador negativo de la floración, actuando de manera opuesta a *FLK*.



#### IV.1.2.- La sobreexpresión de *PEP* recuerda a los mutantes de pérdida de función de la ruta autónoma

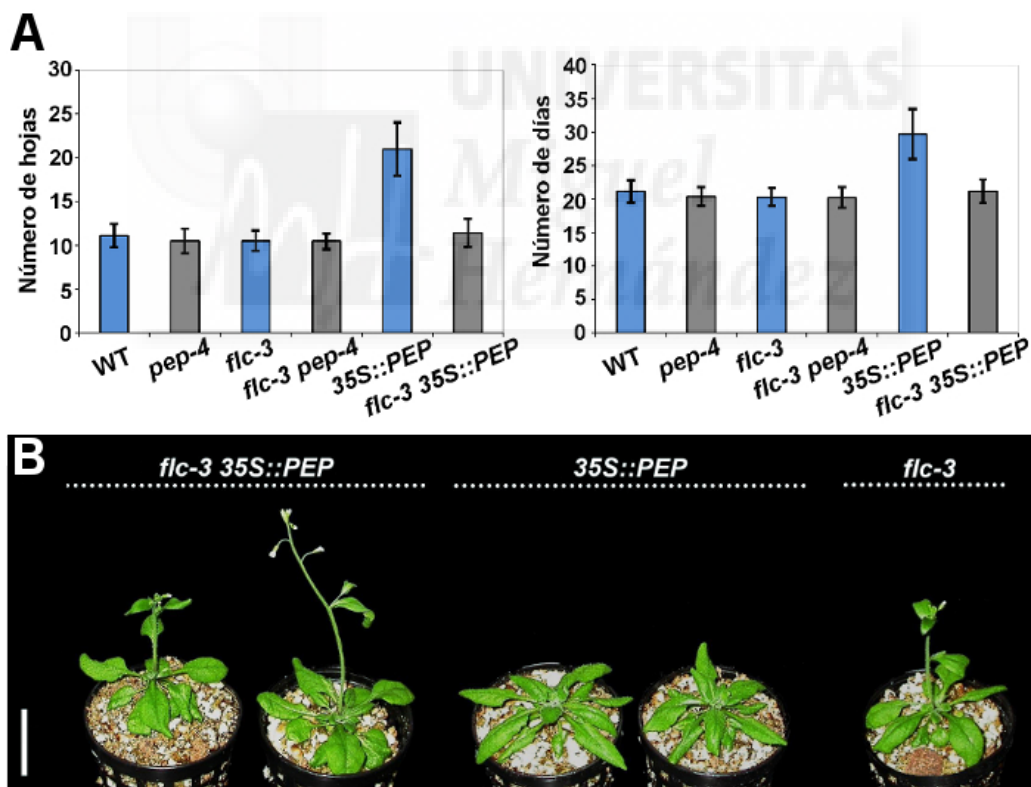
Con objeto de confirmar que *PEP* desempeña un papel como represor de la floración, decidimos estudiar también el efecto de su ganancia de función por sobreexpresión.

Para ello, empleamos líneas transgénicas con la secuencia del cDNA de *PEP* bajo el control del promotor constitutivo de origen viral 35S (*Cauliflower Mosaic Virus*; Fang *et al.*, 1989), obtenidas con anterioridad en nuestro laboratorio (*35S::PEP*; Ripoll, 2004; Ripoll *et al.*, 2009). Las plantas homocigóticas *35S::PEP* no mostraron fenotipos morfológicos de consideración. Por el contrario, exhibieron un retraso en la transición floral (Figs. 29 A y B y resultados no mostrados). Es más, los individuos *35S::PEP* respondieron activamente a los ensayos de vernalización y tratamientos con giberelinas (GA; Fig. 29 B), y en día corto también mostraron retraso en la floración respecto a la estirpe silvestre (Fig. 29 C). Todas estas facetas son típicas de los mutantes de pérdida de función de los genes de la ruta inductiva autónoma, cuya principal función en el plano molecular consiste en suprimir la expresión del gen *FLC*, el principal represor de la floración (Quesada *et al.*, 2005; Ietswaart *et al.*, 2012). Por el contrario, ciertos inhibidores de la floración pueden aumentar la expresión de *FLC* (Sung y Amasino, 2005).



**Figura 29.-** La sobreexpresión de *PEP* retrasa la floración. **A)** Plantas de 27 días de edad representativas del silvestre (WT, izquierda) y de individuos con la construcción *35S::PEP* (derecha). Barra de escala: 3 cm. **B)** Tiempo de floración en condiciones de día largo (LD) de plantas *35S::PEP*, incluyendo el efecto de los tratamientos con vernalización y con GA. **C)** Tiempo de floración de *35S::PEP* en condiciones de día corto (SD). Las barras de error en los paneles B y C indican la desviación estándar (DE, n ≥ 40). Medidas de los niveles de expresión del mRNA de *FLC* (**D**) y *FT* (**E**) mediante qPCR en el silvestre y en distintos fondos mutantes. Barras de error: DE.

Por consiguiente, analizamos nuestros mutantes en relación a los niveles de transcrito de *FLC* mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR). En el momento de la extracción de RNA (plantas de 8 días), el nivel de *FLC* era relativamente bajo en el silvestre y aun inferior en los mutantes *pep* (Fig. 29 D y datos no mostrados). Estos resultados son coherentes con el hecho de que el mRNA de *FLC* fuera indetectable en plantas Columbia de edad similar mediante hibridación *northern* (Michaels y Amasino, 1999). Como era de esperar (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004), se registró un nivel elevado del transcrito de *FLC* en las plantas *flk* (Fig. 29 D). Es notorio que las plantas que sobreexpresaban *PEP* también mostraran un claro incremento de los niveles de mRNA de *FLC* comparados con los del silvestre, en clara correspondencia con su fenotipo de floración tardía (Fig. 29 D). Cabe destacar la disminución de los niveles relativos del transcrito de *FLC* en *flk pep-4*, con respecto a las plantas *flk*, aunque no hasta un nivel propio del silvestre (Figs. 29 D y 31 B). Este dato es muy consistente con el rescate parcial propiciado por las mutaciones *pep* (Fig. 28).



**Figura 30.-** La mutación *flc-3* es epistática sobre la sobreexpresión de *PEP*. **A)** Tiempo de floración en condiciones de día largo. Las plantas silvestres (WT), *pep-4* y *35S::PEP* se corresponden con un grupo de muestras diferente al mostrado en figuras anteriores. Barras de error: DE (n ≥ 40). **B)** Plantas de 24 días de edad representativas de los genotipos *flc-3 35S::PEP* (izquierda), *35S::PEP* (centro) y *flc-3* (derecha). Barra de escala: 3 cm.

Para reforzar estas observaciones medimos los niveles de expresión del gen integrador *FT*, el cual es objeto de represión transcripcional directa por parte de *FLC*

(Helliwell *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Searle *et al.*, 2006). Como se muestra en la Fig. 29 E, los niveles de *FT* aumentaron en el mutante *pep-4* mientras que descendieron abruptamente en los individuos *35S::PEP*, correlacionándose de manera inversa con los niveles de *FLC* en los mutantes de pérdida y ganancia de función de *PEP*, respectivamente (Fig. 29 D).

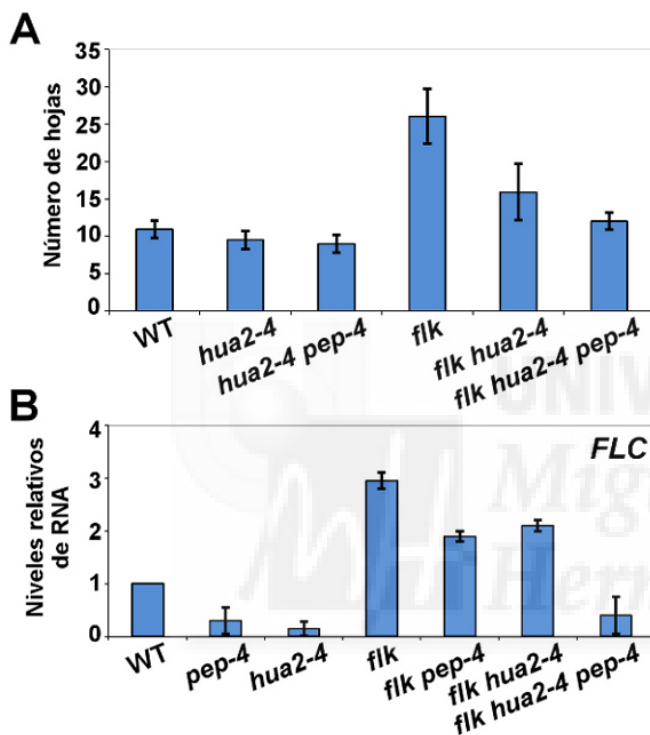
A la vista de los resultados anteriores, *PEP* debiera ya considerarse como un regulador positivo de *FLC*. No obstante, para corroborar este papel de *PEP* analizamos las interacciones genéticas entre el alelo nulo *flc-3* (Michaels y Amasino, 1999) y la construcción *35S::PEP*. La ausencia total de función del gen *FLC* únicamente genera un sutil adelanto de la transición floral, a pesar de lo cual resulta epistática sobre el fenotipo de floración tardía provocado por los alelos dominantes *FRI*, así como sobre las mutaciones de pérdida de función de los genes de la ruta autónoma (Michaels y Amasino, 2001). Como se muestra en la Fig. 30 A, las plantas *pep-4*, *flc-3* y *flc-3 pep-4* florecieron al mismo tiempo que las silvestres, o sólo algo más rápido. Sin embargo, lo más llamativo fue comprobar que también las plantas *flc-3 35S::PEP* florecen como la estirpe silvestre. El fenotipo de floración tardía provocado por la sobreexpresión de *PEP* fue virtualmente suprimido en el fondo *flc-3* (Fig. 30), lo que indica que la influencia de *PEP* sobre la transición floral se debe principalmente a su efecto estimulador de la expresión de *FLC*.

#### **IV.1.3.- *PEP* coopera con *HUA2* activando a *FLC***

La recuperación incompleta del tiempo de floración en los dobles mutantes *flk pep* plantea la cuestión acerca de la naturaleza de presuntas actividades génicas adicionales y redundantes con *PEP*. Uno de estos factores podría ser *HUA2*, una proteína con un dominio RPR involucrada en el procesamiento del transcrito de *AG* y que, por tanto, afecta a la morfogénesis de los órganos florales (Chen y Meyerowitz, 1999; Cheng *et al.*, 2003). *HUA2* también opera en la regulación del tiempo de floración y afecta al desarrollo vegetativo (Doyle *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Aunque las mutaciones *hua2* inducen solamente una floración sutilmente precoz (como ocurre con *pep*), rescatan parcialmente el fenotipo de floración tardía causado por *FRI* y por algunas mutaciones en genes de la ruta autónoma mediante la reducción de los niveles de *FLC* (Doyle *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, utilizamos un teórico alelo nulo de T-DNA de *hua2* en fondo Col-0 (*hua2-4*), disponible en ese momento (Doyle *et al.*, 2005), para construir diversas combinaciones mutantes. Como se había descrito

previamente, las plantas *hua2-4* florecieron sólo algo más temprano que el silvestre. No obstante, el tiempo de floración de los individuos *flk* se redujo considerablemente al sumarles la mutación *hua2-4* (Fig. 31 A), a semejanza de lo ocurrido con los dobles mutantes *flk pep* (Fig. 28). Esto está en consonancia con observaciones previas respecto a combinaciones mutantes *ld hua2* y *fpa hua2* (Doyle *et al.*, 2005). Además, el retraso de *flk* se mitigó aún más en el triple mutante *flk hua2-4 pep-4* hasta casi alcanzar valores silvestres (Fig. 31 A), en consonancia con la idea de que *PEP* y *HUA2* desempeñan labores cooperativas en este aspecto del desarrollo.



**Figura 31.-** La pérdida de *HUA2* también rescata a *flk*. **A)** Tiempo de floración en condiciones de día largo. Los individuos silvestres (WT), *pep-4* y *flk* forman parte de un grupo distinto de muestras a los expuestos en figuras anteriores. Barras de error: DE (n ≥ 40). **B)** Análisis mediante qPCR del mRNA de *FLC* en plantas silvestres (WT) y diversas estirpes mutantes. Barras de error: DE.

Validamos nuestros datos genéticos mediante estudios de expresión de *FLC* (Fig. 31 B). Como en el caso de las plantas *pep-4*, los niveles de transcrito de *FLC* disminuyeron considerablemente en los mutantes *hua2-4* con respecto al silvestre. Asimismo, comparadas con el mutante simple *flk*, la expresión de *FLC* descendió claramente en las plantas *flk pep-4* y *flk hua2-4*. Notablemente, los niveles de mRNA de *FLC* fueron incluso inferiores en el triple mutante *flk hua2-4 pep-4*, en perfecta sintonía con nuestros datos genéticos. De hecho, la pérdida simultánea de las actividades de ambos genes activadores de *FLC* en un fondo *flk* produce un efecto sinérgico, lo que genera un gran descenso en la expresión de *FLC*, incluso por debajo de los niveles silvestres (Fig. 31 B).

Nuestros resultados indican que *PEP* y *HUA2* cooperan retrasando la transición floral mediante la activación de *FLC*, aunque se requerirían experimentos adicionales



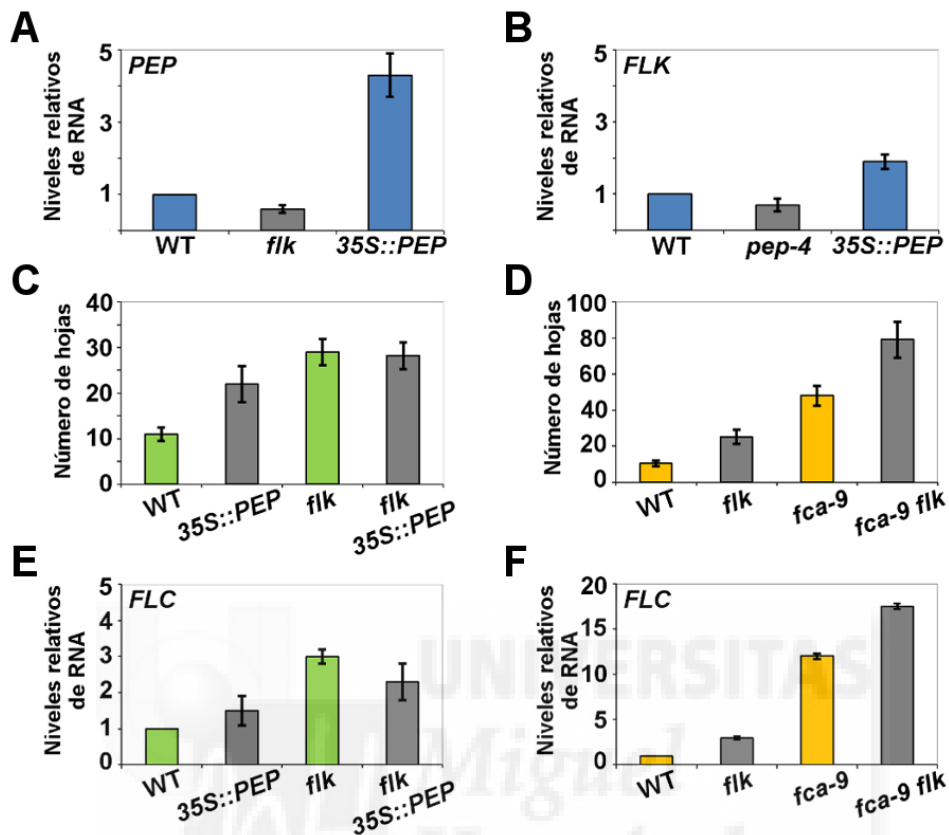
para dilucidar si ambos productos génicos actúan independientemente o no. En cualquier caso, ya que las mutaciones *hua2* también interaccionan con otros mutantes de floración lenta distintos a aquellos que afectan a la ruta autónoma (Doyle *et al.*, 2005), sería concebible que *PEP* también actuara en otras vías de control de la floración. Para responder parcialmente a esta cuestión se utilizó el mutante de fotoperiodo *constans* (*co*; Koornneef *et al.*, 1991). El doble mutante *co pep* no mostró diferencia alguna respecto al fenotipo de floración tardía del mutante simple *co* (resultados no mostrados). Esto sugiere que *PEP* no interviene en la ruta del fotoperiodo o, alternativamente, que su función queda oculta por actividades génicas redundantes.

#### **IV.1.4.- *PEP* y *FLK* podrían operar en una ruta común regulando a *FLC***

Medimos la expresión de *PEP* y *FLK* en plantas con la construcción *35S::PEP*, así como en los mutantes *pep* y *flk*. Los niveles del mRNA de *PEP* no son particularmente abundantes en las plantas silvestres (Fig. 32 A), mientras que las plantas *pep-4* son transcripcionalmente nulas (Ripoll *et al.*, 2006). Por el contrario, los individuos *35S::PEP* produjeron mucho más mRNA de *PEP* que las plantas silvestres (Fig. 32 A). También medimos la expresión de *PEP* y *FLK* en los fondos mutantes *flk* y *pep*, respectivamente (Figs. 32 A y B). No se observaron diferencias significativas que permitieran concluir que *PEP* y *FLK* regulan los niveles de sus transcritos respectivos.

Sin embargo, los datos genéticos y moleculares en relación a la expresión de *FLC* indican que *PEP* participa en la regulación del tiempo de floración como antagonista de *FLK*, en paralelo o aguas abajo respecto a éste. Con objeto de esclarecer este asunto, se introdujo la construcción *35S::PEP* en un fondo *flk* para medir el tiempo de floración y los niveles de *FLC*. Es importante señalar que se verificó una sólida expresión de *PEP* en las plantas *flk 35S::PEP* (no mostrado), eliminando la posibilidad de supresión del RNA del transgén *PEP* mediada por secuencias del promotor vírico 35S (Daxinger *et al.*, 2008), también presentes en el T-DNA del alelo *flk* (Alonso *et al.*, 2003). Así pues, si *FLK* y *PEP* actuaran independientemente, sería esperable encontrar efectos aditivos en las plantas resultantes. Por otro lado, si *PEP* y *FLK* operaran en la misma ruta ni el tiempo de floración ni los niveles de *FLC* deberían ser superiores a los del mutante simple *flk*. Precisamente, nuestros datos mostraron que tanto los individuos *flk* como los *flk 35S::PEP* tenían un comportamiento muy similar en cuanto al tiempo de floración (Fig. 32 C). Además, la expresión del mRNA de *FLC* no se incrementó en las plantas *flk 35S::PEP* respecto a los mutantes simples

*flk* (Fig. 32 E). Estos resultados son compatibles con el supuesto de que *FLK* y *PEP* actúen en una misma ruta.

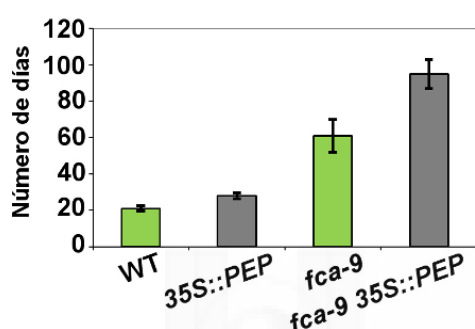


**Figura 32.-** *FLK* y *PEP* actúan de forma independiente respecto a *FCA*. **A)** y **B)** Niveles relativos del mRNA de *PEP* y *FLK*, respectivamente, cuantificados mediante qPCR. **C)** y **E)** Medidas de tiempo de floración en condiciones de día largo. Las plantas silvestres (WT), *35S::PEP* y *flk* forman parte de un grupo muestral diferente al representado en figuras anteriores. Barras de error: DE (n ≥ 40). **D)** y **F)** Niveles relativos del mRNA de *FLC* determinados mediante qPCR en el silvestre y diversas estirpes mutantes. Barras de error: DE.

En una vía común, *FLK* podría reprimir a *FLC*, al menos parcialmente, reduciendo la actividad de factores como *PEP* y muy probablemente otras funciones génicas redundantes con *PEP*. No obstante, nuestros datos no permiten descartar la existencia de funciones independientes de *FLK* y *PEP* en la regulación de *FLC*.

Con el fin de establecer una comparación con los resultados anteriormente expuestos, investigamos la interacción entre *FLK* y *FCA*, un gen de la ruta autónoma que codifica una proteína con motivos RRM de unión a RNA, crucial en la regulación de *FLC* (Macknight *et al.*, 1997). Cruzamos plantas *flk* con individuos portadores de un alelo recesivo fuerte como *fca-9* (Page *et al.*, 1999). Las plantas con las dos mutaciones en homocigosis florecieron extremadamente tarde de un modo aditivo o incluso sinérgico (Fig. 32 D), siendo el fenotipo de algunas de las plantas *fca-9 flk* más extremo de lo que cabría esperar por la simple adición de los genotipos parentales. En

realidad, algunas plantas no llegaron a florecer tras más de 130 días desde la siembra, momento en el que se detuvo el experimento. Esto indica que ambas proteínas de unión a RNA probablemente promueven la floración independientemente. De hecho, los niveles de expresión de *FLC* en las plantas *fca-9 flk* y *fca-9* se correlacionan con los resultados genéticos de tiempo de floración (Fig. 32 F), reforzando así el supuesto de que ambos genes trabajan en paralelo. Además, la respuesta de las plantas *fca-9* portadoras de la construcción *35S::PEP* también fue aditiva (Fig. 33), en consonancia con la idea de que también *PEP* esté actuando sobre *FLC* independientemente de *FCA*.



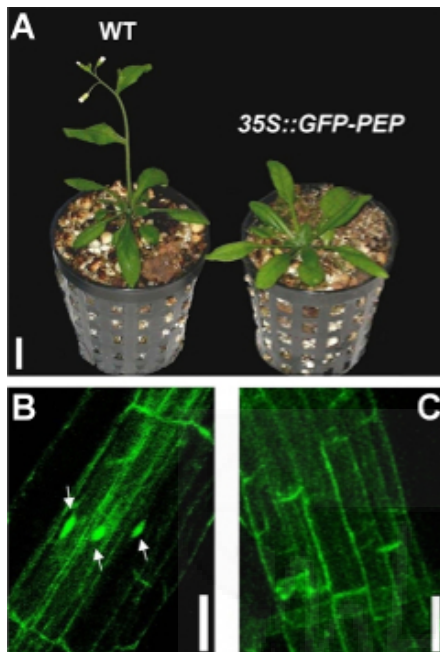
**Figura 33.-** El efecto de la mutación *fca-9* es aditivo con respecto a la sobreexpresión de *PEP*. Tiempo de floración medido en condiciones de día largo. Las plantas silvestres (WT) y *35S::PEP* forman parte de un grupo muestral diferente al representado en figuras anteriores. Barras de error: DE (n ≥ 18)

#### IV.1.5.- La proteína PEP presenta localización celular

Los resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que PEP podría llevar a cabo un papel dual promoviendo tanto la transcripción como el procesamiento de intrones del nuevo transcrito (Ripoll *et al.*, 2009 y resultados no mostrados), como se ha comprobado en proteínas PCBP de animales (Makeyev y Liebhaber, 2002; Bomsztyk *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2007; Mikula y Bomsztyk, 2011). Esta hipótesis implica que PEP debería trasladarse al núcleo para desempeñar su acción sobre *FLC*. Dado que las proteínas de tipo PCBP pueden ejercer numerosas funciones biológicas en distintos compartimentos celulares (Makeyev y Liebhaber, 2002), resultaba necesario examinar la distribución de la proteína PEP dentro de la célula.

Con este motivo se realizó una fusión traduccional entre las secuencias del cDNA de *PEP* y la correspondiente a la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP), con la cual se transformaron plantas silvestres (sección VII.7 de Materiales y Métodos). Las plantas transgénicas *35S::GFP-PEP* exhibieron floración tardía (Fig. 34 A), reforzando el concepto de *PEP* como regulador negativo de la transición floral. Además, cuando se examinaron mediante microscopía confocal las

raíces de las plántulas transformadas, se pudo verificar una acumulación de la fluorescencia GFP y, por tanto, de PEP predominantemente en el núcleo (Fig. 34 B). Esto es coherente con hipotéticas funciones de PEP durante la regulación génica, bien durante la transcripción o durante el procesamiento post o cotranscripcional. Es más, este resultado es consistente con la localización subcelular de FLK (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004).

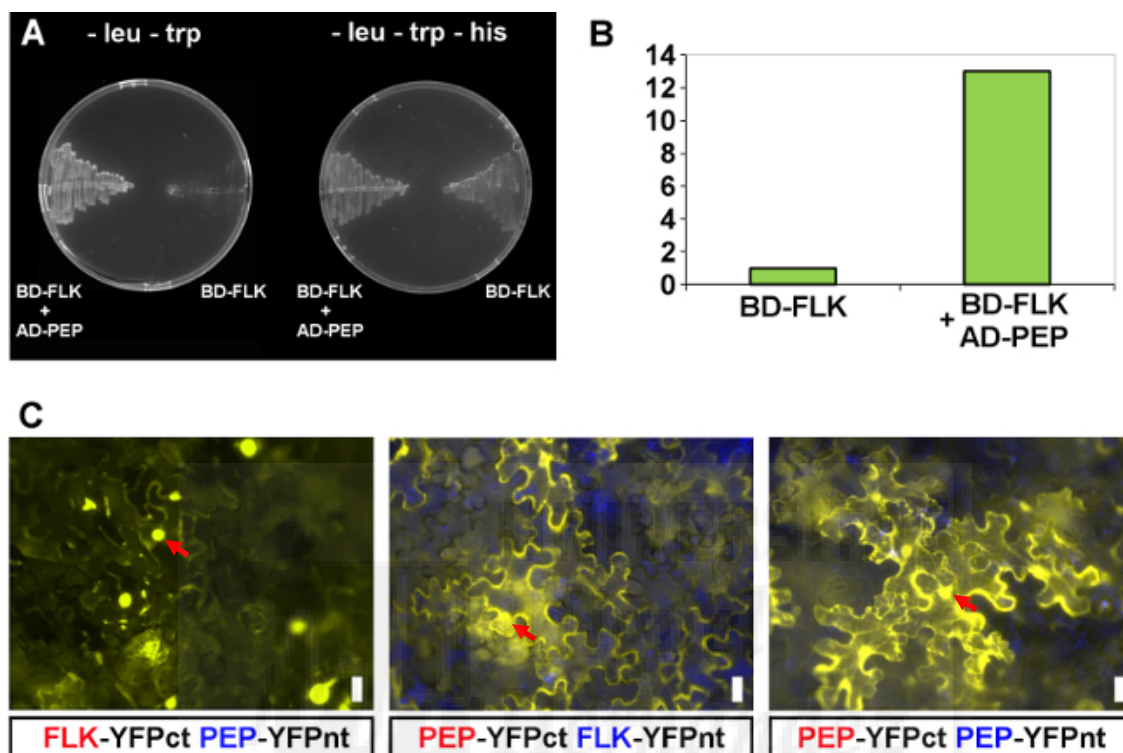


**Figura 34.-** La proteína *PEP* exhibe localización nuclear. **A)** Las plantas transgénicas (25 días de edad) con el vector vacío *35S::GFP* (WT, izquierda) florecen antes que aquellas que contienen el gen de fusión *35S::GFP-PEP* (derecha). Barra de escala: 2 cm. **B)** y **C)** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células de raíz de plantas con las construcciones *35S::GFP-PEP* (B) y *35S::GFP* (C). La señal de la proteína GFP en los núcleos está indicada con flechas. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

#### IV.1.6.- Las proteínas PEP y FLK interactúan físicamente

Lógicamente, nos preguntamos cómo sería la interacción molecular entre *PEP* y *FLK*. Dada su naturaleza y localización subcelular común, no resultaba inverosímil que ambos polipéptidos KH interactuasen físicamente. Para verificar esta posibilidad, se efectuaron ensayos de doble híbrido en levadura (*yeast two-hybrid assay*; sección VII.6.1). Las cepas de levadura que expresan tan sólo FLK como “cebo” (BD-FLK) no eran viables en ausencia de histidina. Por el contrario, las levaduras que contenían simultáneamente los plásmidos para la expresión tanto de FLK (BD-FLK) como de la “presa” PEP (AD-PEP) crecieron vigorosamente en dicho medio (Fig. 35 A). Los resultados de crecimiento de las levaduras se validaron mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 35 B; Kippert, 1995). Estos resultados apoyan firmemente que ambos productos génicos interactúan directamente, probablemente formando parte de complejos multiprotéicos comunes.

Cabe reseñar que no pudimos realizar el ensayo contrario de doble híbrido (BD-PEP + AD-FLK), dado que la proteína de fusión BD-PEP promueve un activo crecimiento de las levaduras (no mostrado), indicando que PEP posee una gran capacidad de autoactivación. Esta circunstancia encaja con una faceta funcional de PEP como factor transcripcional.



**Figura 35.-** Interacción física entre FLK y PEP. **A)** Ensayo de doble híbrido en levaduras (Y2H) donde se muestra la interacción entre las proteínas PEP y FLK, deducida mediante crecimiento selectivo en un medio carente de leucina, triptófano e histidina (-leu, -trp, -his; izquierda), comparado con un medio sin leucina ni triptófano (-leu, -trp; derecha). **B)** Análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Kippert, 1995). Las células de levadura con los plásmidos que expresaban las proteínas de fusión BD-FLK y AD-PEP mostraron un incremento de la actividad enzimática de 12,94 veces, en comparación a aquellas que sólo expresaban BD-FLK. Las medidas de la actividad enzimática se normalizaron con respecto al control (BD-FLK). **C)** Ensayos de fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC) mediante detección de la señal correspondiente a la proteína amarilla fluorescente (YFP). Imágenes de microscopía de fluorescencia de hojas de tabaco en las que se expresan las distintas combinaciones de proteínas de fusión. Las proteínas fusionadas a la mitad C-terminal de la YFP se indican con letras rojas, mientras que las proteínas fusionadas a la mitad N-terminal de la YFP aparecen con letras azules. Algunos de los núcleos en los que se aprecia fluorescencia nítida están indicados con flechas. Las fotografías fueron tomadas a las 72 h de la agroinfiltración. Barras de escala: 40  $\mu$ m.

A continuación, realizamos ensayos de fluorescencia por complementación bimolecular o BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*; sección VII.6.2) utilizando hojas de *Nicotiana benthamiana* para corroborar *in planta* la interacción física entre PEP y FLK. La técnica de BiFC permite la visualización directa de interacciones proteicas en células vegetales vivas y permite la visualización de la localización intracelular en la que la interacción tiene lugar. Se basa en el hecho de

que dos fragmentos no fluorescentes de una proteína que sí lo es pueden generar un complejo fluorescente si se fusionan cada uno de ellos a proteínas que interaccionan entre sí (Kerppola, 2006). Los plásmidos pBJ36-SPYNE y pBJ36SPYCE (Walter *et al.*, 2004) contienen las secuencias de las porciones N-terminal y C-terminal, respectivamente, de la proteína amarilla fluorescente o YFP (*Yellow Fluorescent Protein*; Griesbeck *et al.*, 2001). Los cDNA de *PEP* y *FLK* se clonaron en ambos plásmidos, en la región N-terminal de cada mitad de la YFP, tras lo cual se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* para ser observadas mediante microscopía de fluorescencia (ver Materiales y Métodos).

Como se muestra en las Figs. 35 C y D, la fluorescencia se reconstituye cuando se infiltran las hojas con construcciones de fusión de FLK y PEP unidas a mitades complementarias de la YFP. Esta interacción tiene lugar en ambos sentidos, es decir, cuando se intercambian las mitades de la YFP clonadas en fase (Figs. 35 C y D), lo que refuerza la especificidad de la interacción. Estos resultados confirman que PEP y FLK interaccionan físicamente. Además, esta interacción se produce eminentemente en el núcleo, lo que es consistente con los datos de localización de cada una de estas proteínas (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004; Ripoll *et al.*, 2009, esta Tesis). Por añadidura, obtuvimos una sólida señal fluorescente infiltrando simultáneamente con PEP-YFPct y PEP-YFPnt, lo que indica que PEP tiene la potencialidad de formar homodímeros (Fig. 35 E).

Cuando se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con las construcciones que expresan PEP-YFPct o FLK-YFPct junto a la versión vacía del plásmido pBJ36-SPYNE, o bien PEP-YFPnt o FLK-YFPnt junto a la versión sin inserto del plásmido pBJ36SPYCE, no se observó fluorescencia alguna (no mostrado).



## **IV.2.- CAPÍTULO 2. EL GEN *PEP* PROMUEVE EL CORRECTO DESARROLLO DE LOS ÓRGANOS FLORALES Y LA FUNCIÓN DEL MERISTEMO FLORAL**

### **IV.2.1.- Razones y precedentes para el estudio de *PEP* en relación a la morfogénesis floral**

En el capítulo anterior se describe la función de *PEP* como antagonista de *FLK*, regulando positivamente a *FLC* y, por tanto, retrasando la transición floral. Sin embargo, numerosos indicios experimentales procedentes de nuestro laboratorio y datos de la bibliografía sugieren que *PEP* también podría desempeñar funciones durante el desarrollo de la flor, quizás ocultas por solapamiento con otras funciones génicas. En primer lugar, su patrón de expresión es perfectamente compatible con dicha hipótesis (Ripoll *et al.*, 2006; Fig. 27). Por otra parte, ya se registraron alteraciones en el pistilo en los mutantes *pep* originales, como la presencia ocasional de valvas extra, defectos del cierre apical, etc. (Ripoll *et al.*, 2006).

Como se ha expuesto, *PEP* y *HUA2* colaboran activando a *FLC* (Doyle *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2009; esta Tesis). *HUA2*, a su vez, coopera con otras dos hipotéticas proteínas de unión a RNA como *HUA1* y *HEN4* en la regulación postranscripcional de *AG*, un gen MADS-box estructuralmente relacionado con *FLC* (Cheng *et al.*, 2003). Aunque muy distinta de las PCBP, *HEN4* también es una proteína KH. Además, al igual que en el caso de *PEP*, los mutantes simples de pérdida de función *hua1*, *hua2* y *hen4* carecen de fenotipo propio o es extremadamente sutil, requiriendo la construcción de combinaciones mutantes múltiples para poder apreciar fenotipos relacionados con la disminución de la función C (Chen y Meyerowitz, 1999; Cheng *et al.*, 2003). Por todas estas similitudes y paralelismos, resultaba muy razonable la conjetura de que *PEP* pudiera ejercer un papel en la regulación del desarrollo floral.

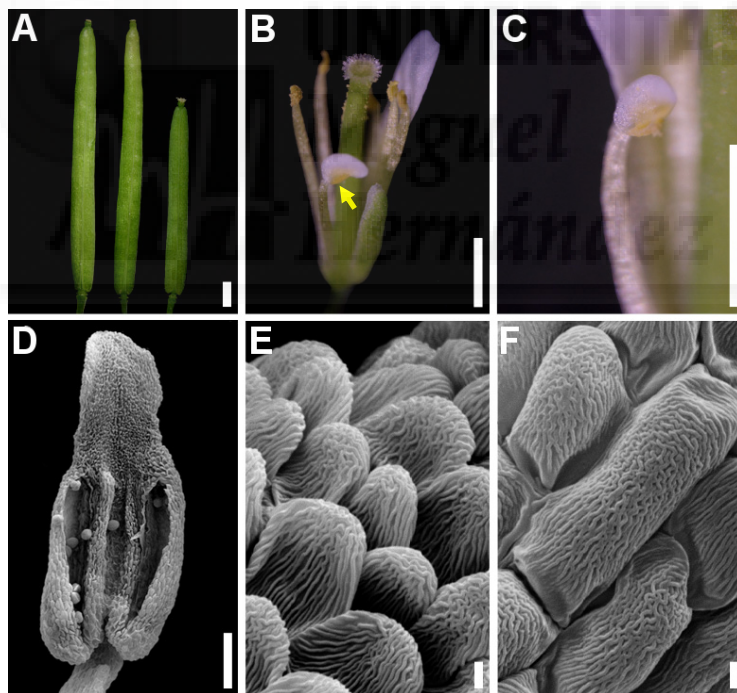
### **IV.2.2.- Las interacciones genéticas de *pep* con alelos mutantes *hen4*, *hua1* y *hua2* sugieren la contribución de *PEP* al mantenimiento de la función C**

Con objeto de iniciar nuestro análisis, procedimos a la construcción de combinaciones mutantes dobles y de orden superior entre *pep* y alelos de pérdida de función de *HUA1*, *HUA2* y *HEN4*. Como se ha indicado, los mutantes simples *hua1*, *hua2* y *hen4* carecen de fenotipos morfológicos en la flor, al igual que sus combinaciones dobles, a

excepción del doble mutante *hua1 hua2* (Chen y Meyerowitz, 1999; Cheng *et al.*, 2003), como se verá más adelante. Comenzamos nuestro análisis examinando el impacto de la pérdida de *PEP* en los fondos genéticos de efecto hipotéticamente más leve, como son los mutantes simples *hen4*, *hua1* y *hua2*.

#### IV.2.2.1.- El doble mutante *hen4 pep*

*HEN4* es un parálogo de *PEP*, aunque no cercano (Cheng *et al.*, 2003). A diferencia del mutante simple *hen4-2* (*hen4*, a partir de ahora), cuya apariencia es absolutamente silvestre, el doble *hen4 pep-4* presenta silicuas como promedio menores que el silvestre y ambos mutantes simples (Fig. 36 A). Esta característica podría deberse a una menor fertilidad, como sugiere el menor rendimiento en semillas por planta. Ello podría estar relacionado con la incidencia ocasional de tenues defectos de cierre apical del pistilo (datos no mostrados).



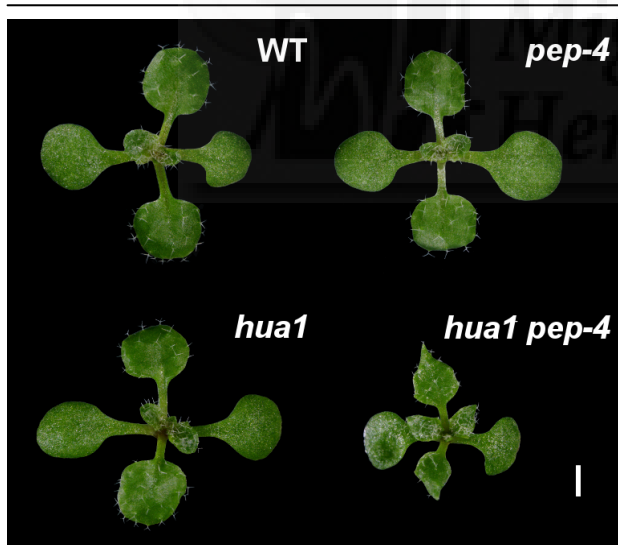
**Figura 36.-** Fenotipos florales del doble mutante *hen4 pep-4*. **A)** Los frutos del doble mutante *hen4 pep-4* (derecha), son más cortos que los del silvestre y el mutante simple *hen4*, (izquierda y centro, respectivamente). **B)** Flor doble mutante con un estambre lateral parcialmente transformado en pétalo, conservando una región estaminoide de color amarillo (flecha). **C)** Detalle de otro estambre lateral del doble mutante, con una transformación parcial hacia pétalo. **D)** Micrografía electrónica de barrido (SEM) de la superficie adaxial de una antera transformada parcialmente en pétalo en su porción apical, mientras que en su porción basal retiene identidad estaminoide, incluso con producción de polen. **E)** Detalle de la porción apical del órgano mostrado en (D) donde se aprecian células de marcado carácter petaloide con forma cónica y deposición de ceras siguiendo un patrón característico de estrías apical-basal. **F)** Detalle de la porción basal del órgano mostrado en (D) donde se observan células típicas de la superficie adaxial de antera con un patrón de estrías de ceras más abigarrado. Barras de escala: 1 mm (A, B y C), 100  $\mu$ m (D) y 2  $\mu$ m (E y F).



Pero el rasgo más llamativo a simple vista fue la aparición de flores con estambres petaloides (Figs. 36 B-F), que nunca se presentan en el mutante simple *hen4*. Estas conversiones homeóticas afectan a un número discreto de flores (~10%) y suelen ser de carácter parcial, pudiendo retener el órgano afectado evidentes características estaminoides, incluso con producción de polen (Figs. 36 D y F; ver sección IV.2.2.5). Aun no tratándose de un fenotipo muy ostensible, estos datos son compatibles con la hipótesis de partida.

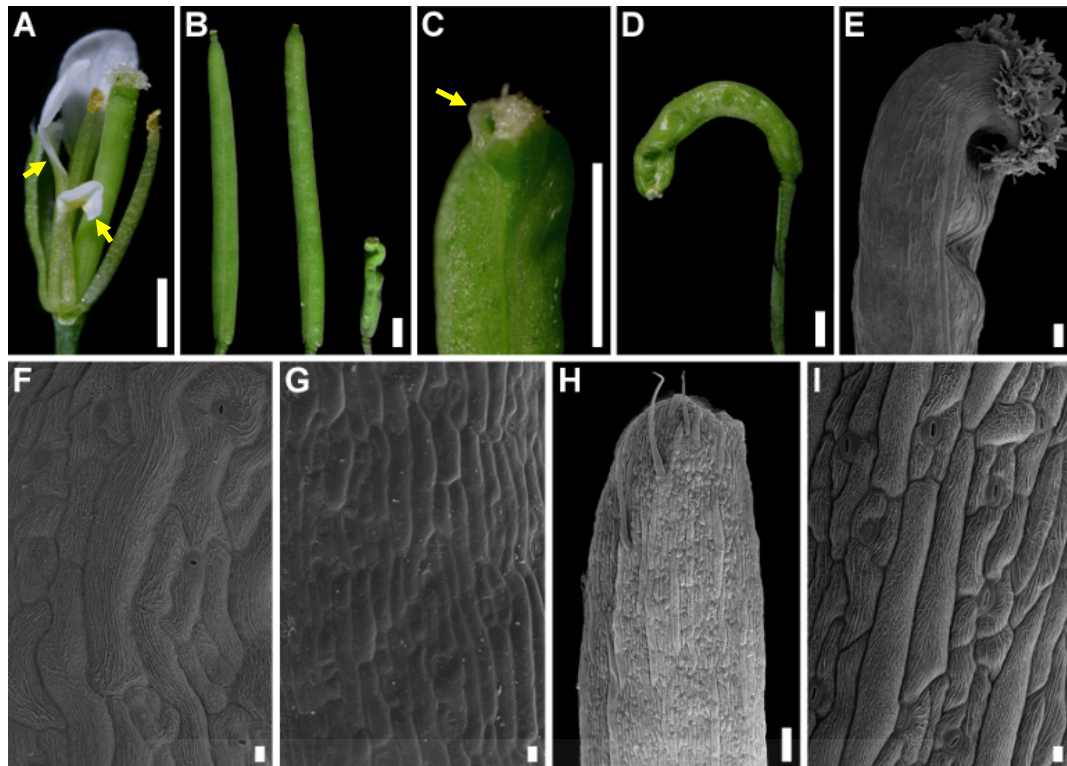
#### IV.2.2.2- El doble mutante *hua1 pep*

La pérdida de función de *HUA1*, al igual que en el caso de *HEN4*, carece de cualquier rasgo morfológico mutante apreciable (Chen y Meyerowitz, 1999; Cheng *et al.*, 2003). Sin embargo, el efecto de la introducción de la mutación *pep-4* en el fondo *hua1-1* (*hua1* a partir de ahora) se aprecia desde etapas tempranas del desarrollo de la planta. Así, la roseta *hua1 pep-4*, en contraposición al silvestre y los mutantes simples, es más pequeña y con hojas puntiagudas (Fig. 37).



**Figura 37.-** Fenotipo de *hua1 pep-4* en la roseta. Plantas de 11 días. Las rosetas de los mutantes simples *hua1* y *pep-4* son indistinguibles de una silvestre, mientras que en *hua1 pep-4* son de menor tamaño y sus hojas más jóvenes son puntiagudas en lugar de redondeadas, con las posiciones de los hidatodos más marcadas. Barra de escala: 1 mm.

En las flores de los individuos *hua1 pep-4* es notable la aparición de transformaciones homeóticas petaloides en los órganos del tercer verticilo, siendo bastante más abundantes (~40%) y, como promedio, más fuertes que en el caso del doble mutante *hen4 pep-4* (Fig. 38 A). En cuanto a los pistilos y frutos, éstos presentaban un amplio rango de fenotipos, desde silicuas de tamaño y morfología similar al silvestre hasta tamaños muy reducidos (Fig. 38 B).



**Figura 38.-** Fenotipos florales en el doble mutante *hua1 pep-4*. **A)** Flor doble mutante en la que se han eliminado manualmente varios órganos externos para revelar la presencia de transformaciones petaloides en el tercer verticilo (flechas), donde también se aprecian estambres normales con anteras amarillas funcionales. **B)** De izquierda a derecha se muestran una silicua silvestre, un fruto *hua1*, y un pistilo *hua1 pep-4*, respectivamente. **C)** Porción apical de un gineceo *hua1 pep-4*, donde se aprecia un notorio defecto de cierre apical (flecha) y reducción de estilo y estigma. **D)** Gineceo *hua1 pep-4* corto, arrugado, sin apenas estilo ni estigma y con una valva extra. **E)** SEM de la porción apical de un fruto doble mutante con 3 valvas en las que se observan rugosidades y diversas células de gran tamaño. Obsérvese que, aunque el estigma es conspicuo, no se aprecia una región de estilo. **F)** Detalle (SEM) de la superficie abaxial de una valva *hua1 pep-4* con células de tamaños muy diversos, todas ellas cubiertas con estrías de ceras epicuticulares, donde destaca una célula de gran tamaño que recuerda a las células gigantes de sépalo. **G)** Superficie abaxial de una valva silvestre, con células regulares, ordenadas y lisas. **H)** Porción apical de un sépalo silvestre, con células gigantes características. **I)** Detalle de la superficie abaxial de un sépalo silvestre, cuyas células muestran las mismas características que las del gineceo *hua1 pep-4* mostrado en (F). Barras de escala: 1 mm (A, B, C y D), 100  $\mu$ m (E y H) y 10  $\mu$ m (F, G e I).

Numerosos pistilos (~50%) mostraban apertura apical (defectos de cierre apical) y una importante proporción (~80%) con una gran reducción de estilo y estigma. (Figs. 38 C-E). Estas alteraciones pueden comprometer el éxito de la polinización y la posterior fertilización, lo que podría contribuir a la disminución de tamaño que, como promedio, presentan sus frutos. Además, en muchos de estos casos, llamaba la atención la porción apical de los pistilos al adquirir los carpelos una morfología puntiaguda reminiscente de órganos filoides como los sépalos (Fig. 39 B). Mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) pudimos observar carpelos arrugados, con células de tamaños muy variables, con estrías generadas por depósitos de ceras, y células alargadas gigantes (Figs. 38 E y 38 F). Estas características son propias de sépalo (Bowman, 1993; Roeder *et al.*,

2010; Roeder *et al.*, 2012) y sugieren distintos grados de transformación homeótica parcial de carpelo a sépalo.

Por otra parte, registramos un aumento de la presencia de carpelos supernumerarios (valvas extra, 40%) como síntoma de pérdida de determinación del meristemo floral (Fig. 39 A). Esta pérdida de determinación se reflejó con más fuerza y claridad en los fenotipos “flor dentro de flor”. En una fracción de las flores *hua1 pep-4* aparecen órganos y verticilos adicionales en el interior del cuarto verticilo (Figs. 39 B-E). Muchos de estos órganos florales adicionales presentaban largos ginóforos y características sepaloides o mixtas carpelo-sépalo, de algún modo reproduciendo lo sucedido en el cuarto verticilo (Fig. 39 C).



**Figura 39.-** Indeterminación del meristemo floral en *hua1 pep-4*. **A)** SEM de un fruto con 4 valvas. **B)** Gineceo en el cuarto verticilo formado por 4 valvas u órganos con regiones apicales puntiagudas y blanquecinas (flecha amarilla). Este verticilo está sustentado por un largo ginóforo (flecha blanca). De su interior surge un nuevo verticilo de órganos que reproducen las características anteriores, con rasgos mixtos sépalo-carpelo. **C)** La misma estructura mostrada en (B) tras eliminar los órganos del cuarto verticilo, apreciándose un largo ginóforo. **D)** Gineceo del que se ha eliminado una valva, donde se observa una nueva estructura en su interior con células estigmáticas en el margen. **E)** Pistilo con ginóforo alargado, y órganos florales adicionales en su interior. Barras de escala: 100  $\mu$ m (A) y 1 mm (B, C, D y E).

Todas estas observaciones de conversiones homeóticas de estambre a pétalo y de carpelo a sépalo, así como los síntomas de pérdida de determinación del meristemo floral, favorecen la idea de que la pérdida de la actividad génica *PEP* compromete la función C en un fondo mutante *hua1*.

#### IV.2.2.3.- Estudio de las plantas *hen4 hua1 pep/+*

A continuación, nos propusimos estudiar el triple mutante *hen4 hua1 pep-4*. Sin embargo, tras reiterados intentos, fuimos incapaces de aislar individuos con este genotipo a partir de distintos tipos de familias segregantes para uno o varios de estos tres genes, concluyendo que el triple mutante *hen4 hua1 pep-4* es letal. Ello indica que

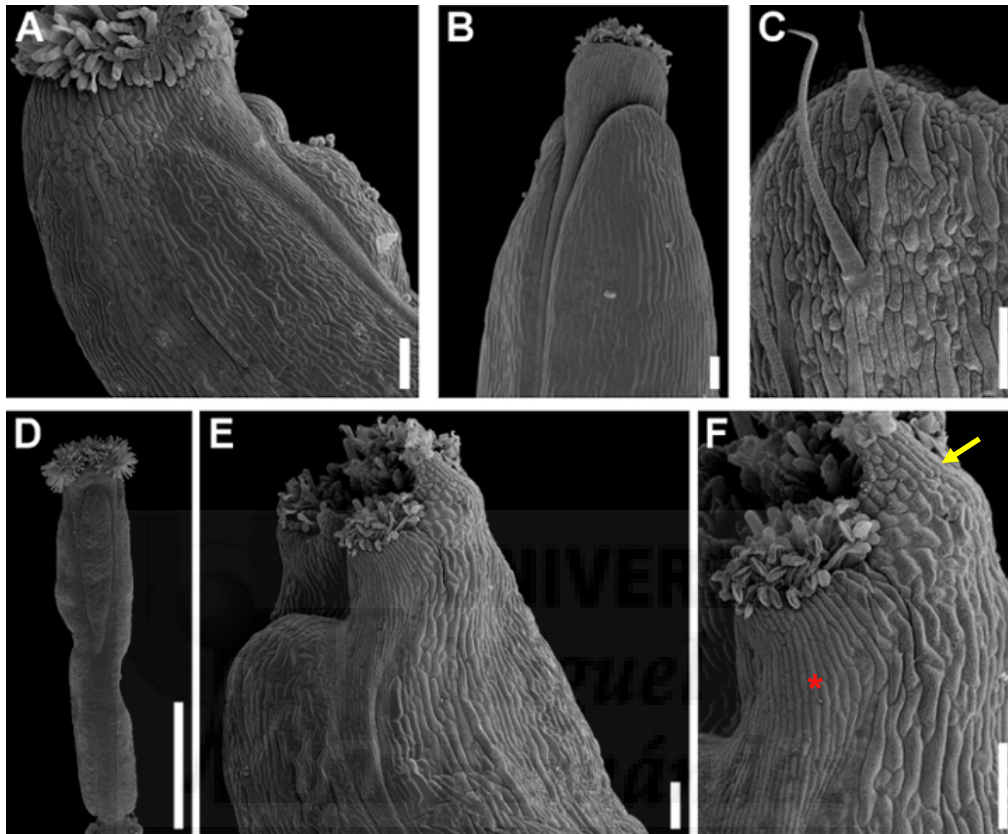
*PEP* es vital en el fondo genético *hen4 hua1*. Esto es muy interesante, pues el doble mutante *hen4 hua1* es completamente viable y descrito como fenotípicamente silvestre (Cheng *et al.*, 2003). Resulta aún más llamativo, por tanto, el impacto producido por la reducción de *PEP* en el fondo *hen4 hua1* mediante la creación del sesquimutante *hen4 hua1 pep-4/+*. Con sólo 5 alelos mutantes de los 6 posibles, estas plantas presentan notables alteraciones fenotípicas, como la aparición de estambres con transformaciones petaloides en todas las flores observadas (Fig. 40 A). Estas alteraciones en el desarrollo de los órganos del tercer verticilo muestran distinta intensidad, oscilando desde suaves transformaciones parciales a órganos completamente transformados.



**Figura 40.-** Fenotipos florales del sesquimutante *hen4 hua1 pep-4/+*. **A)** Flor *hen4 hua1 pep-4/+* con un órgano del tercer verticilo convertido parcialmente en un pétalo (flecha). **B)** Ápice de un gineceo *hen4 hua1 pep-4/+*, prácticamente sin estilo y con un fallo en la fusión de las valvas. **C)** Gineceo *hen4 hua1 pep-4/+*, una de cuyas valvas muestra abundantes irregularidades y finaliza formando un pico blanquecino, semejante al de un sépalo silvestre (flecha). **D)** Flor silvestre, en la que se advierte el rasgo descrito en C (flecha). Barras de escala: 1mm.

Por otra parte, los pistilos y frutos muestran un menor tamaño y una serie de rasgos que incluyen, una vez más, defectos de cierre apical, importante reducción del territorio del estilo y del tejido estigmático, así como ovarios con hendiduras y deformaciones (arrugas), en cuya superficie abaxial se pueden apreciar células estriadas y otras de gran longitud que recuerdan, de nuevo, a la correspondiente superficie abaxial de los sépalos (Figs. 41 A y E). De hecho, en algunos casos los carpelos, además de presentar reducción de estilo y estigma y de no culminar el cierre del gineceo, adquieren en su porción más apical una estructura puntiaguda que confiere aún más aspecto de sépalo (Fig. 40 C), mostrando incluso un reborde blanquecino formado por pequeñas células, como suele ocurrir en el ápice de los sépalos (Fig. 40 D). Es decir, al igual que en los casos de las plantas *hen4 pep* y, sobre todo, *hua1 pep*, todo sugiere que la reducción de la actividad *PEP* contribuye a la aparición de rasgos característicos de una función C disminuida. En las plantas

*hen4 hua1 pep/+* no detectamos fenotipos fuertes de indeterminación del meristemo floral (“flor dentro de flor”), pero sí que observamos una significativa presencia de valvas extra (25% de frutos con carpelos supernumerarios) que refleja una pérdida suave de la determinación floral (Fig. 41 D).



**Figura 41.-** Fenotipos florales del sesquimutante *hen4 hua1 pep-4/+*. **A)** Zona apical de un fruto *hen4 hua1 pep-4/+* con 3 valvas en las que se observan abundantes células alargadas, muy semejantes a las células gigantes de un sépalo (C). **B)** Ápice de un fruto doble mutante *hen4 hua1*. **C)** Porción apical de un sépalo silvestre, con células de menor tamaño en su margen superior y tricomas simples. **D)** Fruto *hen4 hua1 pep/+* con una valva extra y hendiduras. **E)** Ápice de un fruto sesquimutante, defectuoso en el cierre de las valvas. **F)** Detalle de (E), donde se distinguen células similares a las del margen apical de un sépalo silvestre (flecha), y otras más estrechas y prismáticas, típicas de estilo (asterisco). Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$  (A, B, C y E) y 1 mm (D).

#### IV.2.2.4.- La eliminación completa y simultánea de las funciones *HUA2* y *PEP* no es viable

*HUA2* codifica un polipéptido con un dominio RPR, cuya pérdida contribuye también a la disminución de los niveles del mRNA de *AG* y, consecuentemente, al mantenimiento de la función C (Li *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003). A pesar de ello, los mutantes simples *hua2* presentan flores absolutamente normales (Chen y Meyerowitz, 1999). Además, regula positivamente también a otros genes MADS-box estructuralmente



relacionados, como *FLM* y *FLC* (Doyle *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2009; esta Tesis). Consecuentemente, tratamos de generar el doble mutante *hua2 pep* con los alelos nulos *hua2-7* y *pep-4*. Sorprendentemente, ello no fue posible tras reiterados intentos, logrando a lo sumo sesquimutantes *hua2-7 pep-4/+* o *hua2-7/+ pep-4* (la base de esta inviabilidad se tratará posteriormente en la sección IV.3.5.1). Estas plantas no presentaban ninguna alteración fenotípica de consideración. Obtuvimos idénticos resultados con el alelo *hua2-1*. Estas observaciones indican que las actividades génicas *PEP* y *HUA2* son cruciales para el correcto desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*.

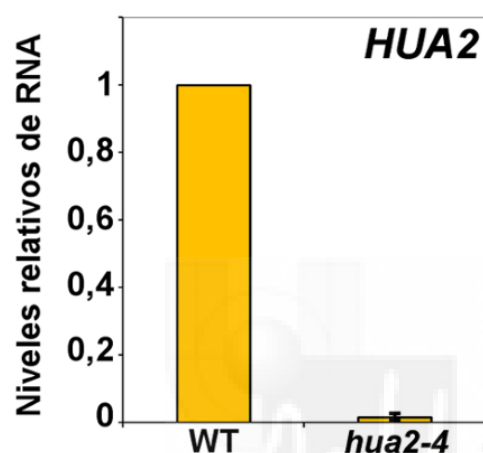


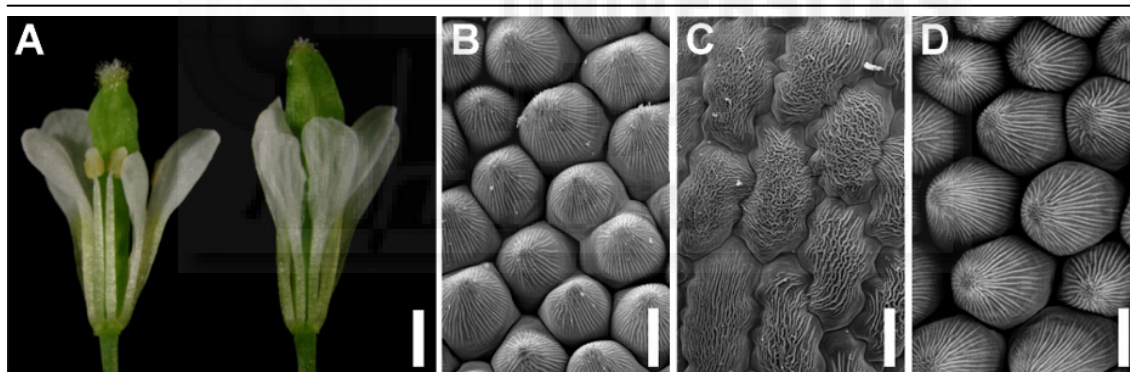
Figura 42.- Expresión relativa del mRNA de *HUA2* en plantas silvestres (WT) y en el mutante *hua2-4*. Barras de error: DE.

Sin embargo, este hecho contradice aparentemente los resultados anteriormente expuestos (sección IV.1.3), en los que se obtenía con entera normalidad el doble mutante *hua2-4 pep-4*. Por tanto, decidimos reexaminar el alelo *hua2-4*, una mutación de pérdida de función debida a una inserción de T-DNA en el intrón 2 del gen (Doyle *et al.*, 2005), lo que debiera interferir con su transcripción. Sin embargo, cuando evaluamos la expresión de *HUA2* en las plantas *hua2-4* mediante RT-PCR y cebadores situados a ambos lados de la inserción, pudimos comprobar un nivel muy escaso de transcrito (Fig. 42), quizás como consecuencia de una escisión ineficaz del intrón debido a la presencia del T-DNA. En cualquier caso, dicho transcrito podría permitir la producción de un nivel residual de actividad *HUA2*, constituyendo un ejemplo de alelo casi nulo (mutación porosa, *leaky*), lo que serviría para reconciliar la aparente discrepancia de resultados entre los distintos alelos. La actividad *HUA2* residual presente en las plantas *hua2-4* permite, de cualquier modo, que sus flores y órganos florales, así como los del doble mutante *hua2-4 pep-4* sean enteramente de apariencia silvestre.

#### IV.2.2.5.- Estudio de las plantas *hua1 hua2 pep/+*

Los resultados anteriores permitían anticipar la letalidad del triple *hua1 hua2 pep*. En efecto, combinaciones triples con los alelos *hua2-1*, *hua2-7* o incluso con el alelo *hua2-4*, resultaron inviables.

El doble mutante *hua1 hua2* presenta de por sí un fenotipo característico consistente en algunas transformaciones petaloides de estambres laterales en las primeras flores, así como frutos más cortos que en el silvestre, con ensanchamiento en su porción apical y estrechamiento en su porción basal (Chen y Meyerowitz, 1999). En nuestro laboratorio realizamos diversas combinaciones con los alelos *hua2-4* y *hua2-7*, en fondo Col-0, y los alelos introgresados en Col-0, *hua1-1* y *hua2-1*, obtenidos originalmente en un fondo *Ler* (ver Materiales y Métodos). En general, nuestras estirpes *hua1 hua2* manifestaron fenotipos aún más fuertes con *hua2-7* (Fig. 44 A), mostrando una escasa fertilidad. Por tanto, además de corroborar observaciones anteriores (Figs. 43 A y 44 A; Tabla 2; Chen y Meyerowitz, 1999), nuestros resultados permitieron confirmar la mayor severidad de este alelo.

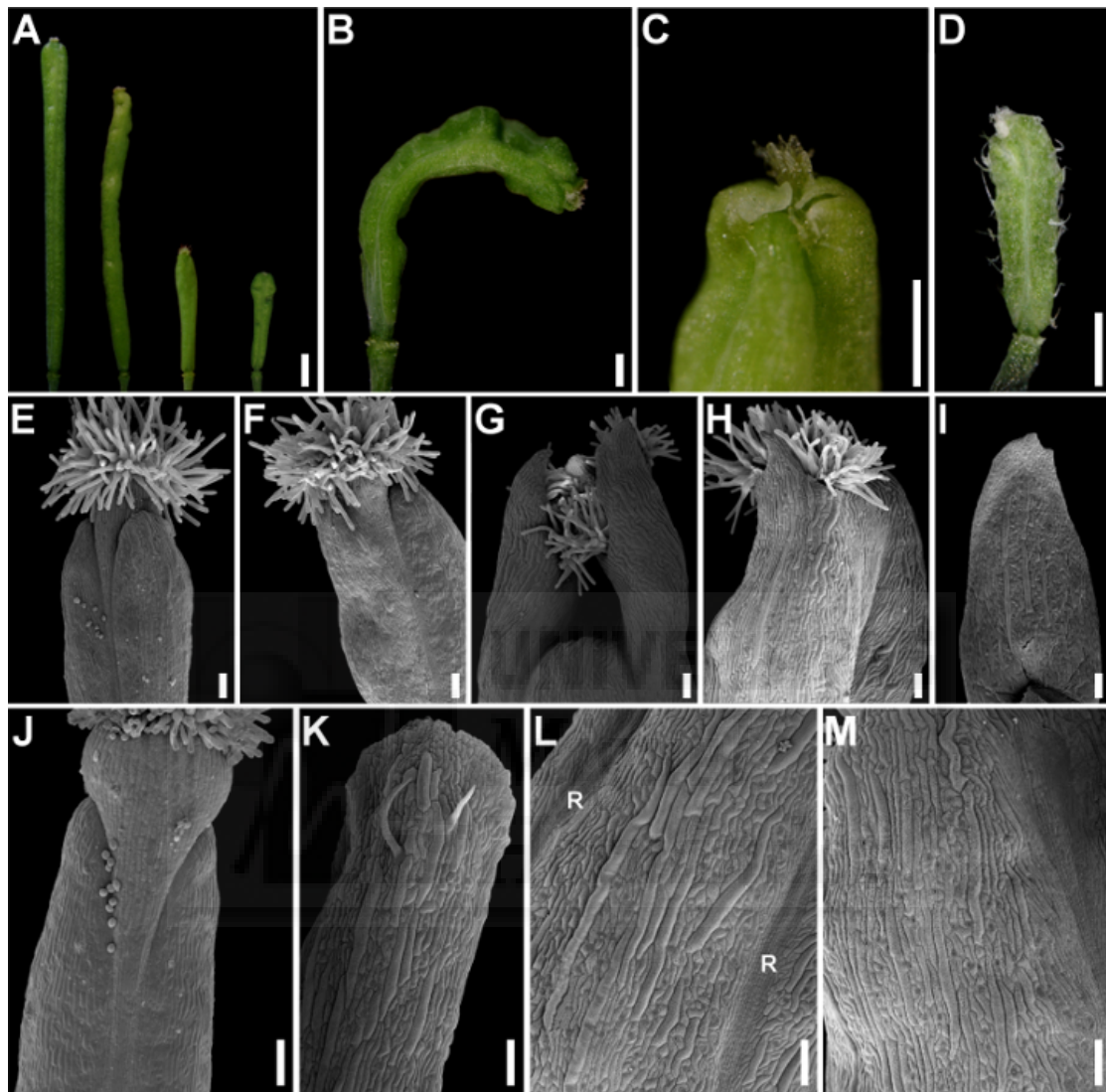


**Figura 43.-** Fenotipos del doble mutante *hua1 hua2-7* y del sesquimutante *hua1 hua2-7 pep-4/+* en el tercer verticilo floral. **A)** Flor *hua1 hua2-7* (izquierda), con estambres laterales transformados en pétalos y cierta transformación en el ápice de las anteras medias; y flor *hua1 hua2-7 pep-4/+* (derecha), donde todos los órganos del tercer verticilo tienen la apariencia de pétalos silvestres. **B)** Superficie adaxial de un pétalo silvestre, con células cónicas recorridas por estrias desde la punta hacia la base. **C)** Detalle de la superficie adaxial de una antera silvestre, cuyas células poseen contornos irregulares y están cubiertas por multitud de estriaciones epicuticulares. **D)** Células de la superficie adaxial de un órgano del tercer verticilo de *hua1 hua2-7 pep-4/+*, con una morfología totalmente indistinguible de las de un verdadero pétalo (B). Barras de escala: 1 mm (A) y 10  $\mu\text{m}$  (B, C y D).

Como se aprecia en la Fig. 43 A, las flores del doble mutante *hua1 hua2-7* presentaban transformaciones petaloides en el tercer verticilo en la totalidad de las flores examinadas, aunque con gran variación en cuanto al número de estambres afectados y a la intensidad de esta transformación (Tabla 2).

Así mismo, en los pistilos se observó cierta reducción de la región estilar y muchos de ellos presentaron constricciones y hendiduras en el ovario, fenotipos anteriormente descritos por otros autores (Figs. 44 E y F; Chen y Meyerowitz, 1999).

Además, la mitad de los pistilos observados presentaban defectos de cierre apical de diversa envergadura (Tabla 2).



**Figura 44.-** Fenotipos del doble mutante *hua1 hua2* y del sesquimutante *hua1 hua2 pep-4/+* respecto al gineceo. **A)** Frutos o pistilos *hua1 hua2* con distintos alelos *hua2*. De izquierda a derecha, *hua1 hua2-1*, *hua1 hua2-4*, *hua1 hua2-7* y *hua1 hua2-7 pep-4/+*; este último pistilo representa un fenotipo suave de su genotipo. **B)** Pistilo *hua1 hua2-7 pep-4/+*, con valvas extra, y una gran reducción del estilo y el estigma. **C)** Porción apical de un pistilo *hua1 hua2-7 pep-4/+*, con un tejido estigmático muy escaso y un estilo prácticamente ausente, así como apertura apical y 4 órganos arrugados en el cuarto verticilo terminados en un pico blanquecino muy sepaloide. **D)** Pistilo *hua1 hua2-1 pep-4/+* con numerosos tricomas sobre sus valvas. **E)** y **F)** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la región apical de pistilos *hua1 hua2-7*. **G)** y **H)** Fotografías de SEM de la porción apical de gineceos *hua1 hua2-7 pep-4/+*, que muestran un tejido estigmático y estilar muy reducido, así como defectos en el cierre apical, y valvas terminadas en picos. **I)** Imagen de SEM de un sépalo silvestre con una forma puntiaguda en su porción apical. **J)** Micrografía de SEM de un pistilo silvestre. **K)** Imagen de SEM de la superficie abaxial de un sépalo silvestre, donde se observan células de diverso tamaño, algunas de ellas gigantes, así como otras pequeñas en el extremo apical. **L)** y **M)** Imagen de SEM de la superficie abaxial de pistilos *hua1 hua2-7 pep-4/+*, cuyas células son asombrosamente parecidas a las del sépalo silvestre (K). R: replum. Barras de escala: 1 mm (A y B), 500  $\mu$ m (C y D) y 100  $\mu$ m (E, F, G, H, I, J, K, L, M).

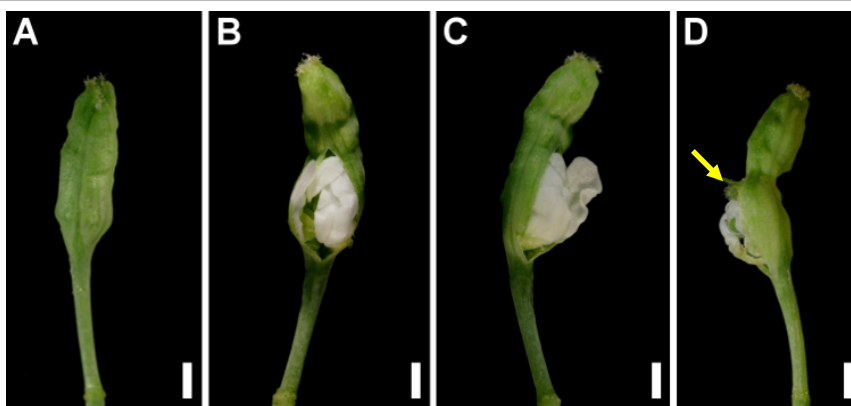


GENOTIPO		<i>hua1 hua2-7</i>	<i>hua1 hua2-7 pep-4/+</i>
<b>Transformaciones petaloides del tercer verticilo</b>	<b>Suave</b>	62%	6%
	<b>Medio</b>	36%	82%
	<b>Fuerte</b>	2%	12%
	<b>Total</b>	100%	100%
<b>Fallo del cierre apical del gineceo</b>		54%	97%
<b>Órganos en un quinto verticilo</b>		0%	24%
<b>Valvas supernumerarias</b>		4%	32%

**Tabla 2.-** Recuento de distintos rasgos fenotípicos florales en *hua1 hua2-7 pep-4/+*. En esta tabla se recoge el porcentaje de flores y pistilos que presentan los fenotipos estudiados. En el caso de los fenotipos del tercer verticilo se han establecido tres categorías según la severidad de la transformación homeótica a pétalo, dado que todas las flores mostraban alteraciones en este verticilo. Suave: defectos sutiles en las anteras laterales. Medio: los estambres laterales parecen pétalos y los estambres medios tienen rasgos petaloides sólo en las anteras. Fuerte: todos los órganos del tercer verticilo tienen aspecto de pétalos silvestres. Número de flores observadas en cada genotipo: 50; número de plantas: 20.

Como ocurre con las plantas *hen4 hua1 pep-4/+* (sección IV.2.2.3), y pese a la inviabilidad del triple homocigoto mutante *hua1 hua2-7 pep-4*, pudimos constatar el profundo impacto que la reducción de la función *PEP* ejerce en el fondo *hua1 hua2-7*. En esencia, las plantas *hua1 hua2-7 pep-4/+*, además de ser estériles, presentaban básicamente los mismos fenotipos florales que los individuos *hua1 hua2*, salvo que con una mayor incidencia, tanto en la frecuencia como en la intensidad de los mismos (Figs. 43 y 44; Tabla 2). Así, como ilustra la Fig. 43, las flores *hua1 hua2-7 pep-4/+* experimentan intensas transformaciones petaloides en sus órganos del tercer verticilo. Para corroborar el carácter petaloide de estos órganos y su base celular, los examinamos con mayor detalle mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La superficie adaxial de un órgano del tercer verticilo de una flor *hua1 hua2-7 pep-4/+*, completamente transformado en un pétalo, difiere claramente de la correspondiente superficie de una antera silvestre. Ésta se encuentra formada por células epidérmicas interdigitadas con una superficie rugosa a causa de la presencia de estrías de ceras con un patrón característico (Fig. 43 C). Por el contrario, la superficie adaxial de un pétalo silvestre se encuentra recubierta de células cónicas con estrías dispuestas desde la base al ápice celular (Fig. 43 B). Como se observa en la Fig. 43 C, la histología de un órgano del tercer verticilo de una flor *hua1 hua2-7 pep-4/+* es indistinguible de la de un verdadero pétalo. En ambos genotipos, tanto en *hua1 hua2-7* como en *hua1 hua2-7 pep-4/+*, las transformaciones petaloides parciales también se reflejaron en el fenotipo celular de dichos órganos, presentando territorios de histología estaminoide y otros con células típicamente petaloides. Se debe resaltar que estas observaciones son representativas de lo que sucede durante las transformaciones

petaloides, totales o parciales, en los órganos del tercer verticilo floral en los genotipos anteriormente descritos, así como en otros que se describirán posteriormente (Fig. 36 D y ver más adelante).



**Figura 45.-** Fenotipos de indeterminación del meristemo floral en el sesquimutante *hua1 hua2-7 pep-4/+*. **A)** Pistilo con valvas supernumerarias y un ginóforo muy largo. **B), C)** y **D)** Pistilos con un largo ginóforo, valvas extra, y nuevos verticilos de órganos surgiendo de su interior. El exceso de presión, ocasionalmente, provoca roturas que permiten observar los órganos internos. Pueden distinguirse órganos petaloides e incluso papilas estigmáticas (flecha). Barras de escala: 1 mm.

En cuanto al cuarto verticilo floral, los gineceos de las plantas *hua1 hua2-7 pep-4/+* estaban seriamente afectados en su desarrollo, exhibiendo una amplia gama de fenotipos aberrantes. Para comenzar, alcanzaban un tamaño notoriamente menor que el de los frutos *hua1 hua2-7*, apareciendo muy arrugados (Fig. 44 A) y, a menudo, colocados sobre un ginóforo conspicuo de longitud variable (Fig. 45). Además, frente al 50% de casos en *hua1 hua2-7*, la práctica totalidad de los pistilos *hua1 hua2-7 pep-4/+*, presentaban severos defectos de cierre apical con una obvia disminución del estilo y del tejido estigmático, llegando en algunos casos a ser vestigiales o a desaparecer (Figs. 44 B, C, G y H; Tabla 2). Frecuentemente este rasgo coincidía con la forma puntiaguda y blanquecina de los supuestos carpelos, recordando claramente el ápice de un sépalo, formado característicamente por células de pequeño tamaño (Figs. 44 C, G y H). Además, en la superficie abaxial del ovario silvestre aparecen células prismáticas regularmente distribuidas (Fig. 44 J), mientras que en los mutantes aparecen células irregularmente dispuestas y de muy diverso tamaño, donde destacan células excepcionalmente alargadas que recuerdan a las células gigantes de la superficie abaxial de los sépalos (Figs. 44 L y M). Con más detalle, se puede apreciar que estas células, en lugar de ser lisas como las de la pared del ovario, presentan estrías causadas por deposiciones de ceras, como es característico en los sépalos. Además, aunque con baja penetrancia, alguno de estos órganos presenta tricomas simples, también típicos de sépalo, e incluso tricomas ramificados (Fig. 44 D). Nuestros resultados indican ostensiblemente que la reducción de la actividad *PEP* compromete seriamente a la función C en el fondo mutante *hua1 hua2*, modificando la

identidad de estambres y gineceo hacia su conversión homeótica en pétalos y sépalos, respectivamente.

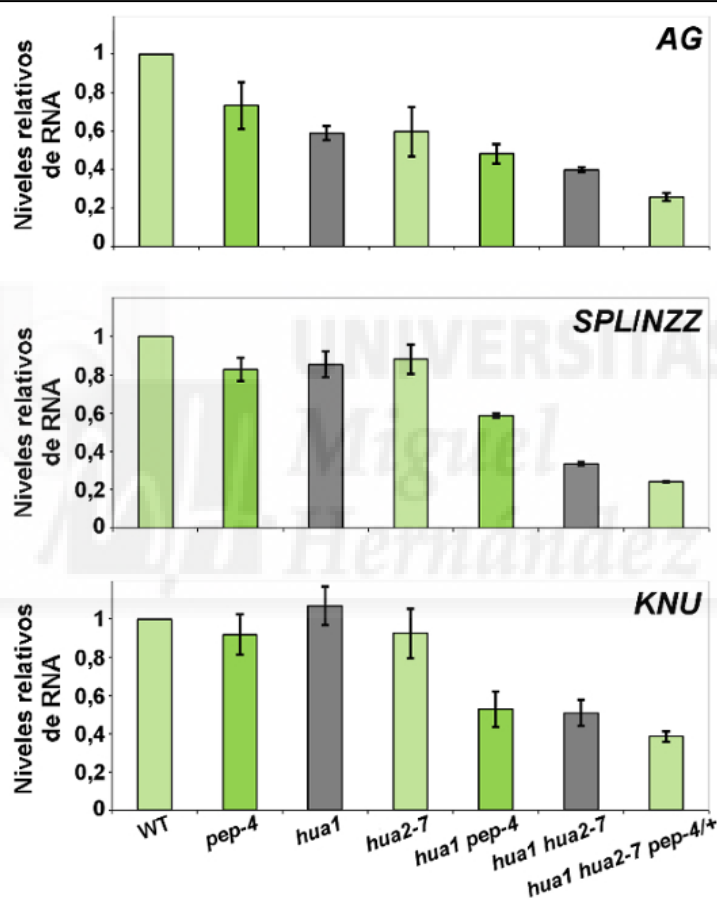
La otra faceta definitoria de la función C es la de lograr la conclusión de la actividad meristemática en el centro de la flor. Ya en las plantas *hua1 hua2-7* registramos una cierta incidencia de valvas extra como síntoma de una pérdida modesta de la determinación floral. Sin embargo este rasgo se intensificó con la inclusión de un alelo *pep-4* (Tabla 2; Fig. 45). Pero sobre todo resulta concluyente la aparición de un 24% de flores con un fenotipo de “flor dentro de flor”. En el interior del supuesto gineceo surgen verticilos adicionales formados habitualmente por pétalos y órganos sepaloideos como los anteriormente descritos, a menudo sustentados de nuevo por un ginóforo largo (Figs. 45 B-D). En resumen, la mutación *pep-4*, aun en estado de heterocigosis, exagera los defectos de las flores *hua1 hua2-7* y conduce a la aparición de fenotipos propios de los mutantes *ag*. Estas observaciones refuerzan claramente la idea de que *PEP* ejerce un papel en el mantenimiento de la función C.

#### **IV.2.2.6.- *PEP* contribuye a mantener los niveles del mRNA de *AG***

Obviamente, ya que el desempeño de la función C de desarrollo floral en *Arabidopsis* compete al gen *AG* (Coen y Meyerowitz, 1991; Jack, 2004), nos propusimos verificar si *PEP* influye en su expresión, lo que explicaría la contribución de su pérdida de función a los fenotipos florales descritos hasta ahora. Anteriormente se demostró el papel de *HUA1*, *HUA2* y *HEN4* en el mantenimiento de los niveles del mRNA de *AG*, comprobándose en experimentos de *northern blot* que sus mutaciones de pérdida de función contribuían conjuntamente a reducir los niveles del mRNA efectivo, correctamente procesado, de *AG* (Cheng *et al.*, 2003). Por tanto decidimos evaluar el papel de *PEP* en este contexto, midiendo los niveles de *AG* mediante qPCR en distintas estirpes mutantes.

Dado que los mutantes simples *hua1*, *hua2* y *hen4* carecen de fenotipo floral visible, y que el único doble mutante con fenotipo propio sin el concurso de *pep* es *hua1 hua2* (Chen y Meyerowitz, 1999; Cheng *et al.*, 2003; esta Tesis), concentramos nuestro esfuerzo en una serie discreta de genotipos representativos como los que aparecen en la Fig. 46. Como se aprecia en dicha figura, los niveles de *AG* experimentan una moderada reducción en el mutante *pep-4*. El descenso de los niveles de *AG* registrado en los mutantes simples *hua1* y *hua2-7* es ligeramente mayor y estadísticamente significativo (Fig. 46), a diferencia de lo expuesto en un trabajo anterior (Cheng *et al.*, 2003), donde no se apreciaba cambio alguno en los niveles de

mRNA efectivo de *AG* en ningún mutante simple. Resulta verosímil que esta discrepancia sea atribuible a la mayor sensibilidad del método empleado en esta Tesis, aunque en el caso de *hua2* pueda deberse también a la mayor fuerza del alelo empleado en este trabajo. Sea como fuere, la disminución de *AG* se acentúa en los dobles mutantes *hua1 pep-4* y *hua1 hua2-7* (Fig. 46), siendo esto coherente con los fenotipos mostrados por dichas plantas. No obstante, los niveles más bajos de expresión de *AG* se midieron en la plantas *hua1 hua2-7 pep-4/+* (Fig. 46), en clara correspondencia con los fenotipos aún más severos observados en dicho genotipo (sección IV.2.2.5).



**Figura 46.-** Expresión relativa del mRNA de los genes *AG*, *SPLINZZ* y *KNU* en inflorescencias silvestres (WT) y de distintos fondos mutantes mediante qPCR. Barras de error: DE.

Se pone de manifiesto el profundo impacto que tiene la reducción de la función *PEP* en el fondo mutante *hua1 hua2-7*. Estas observaciones refuerzan la noción de *PEP* como regulador de *AG* y sugieren la existencia de redundancia funcional entre los genes *HUA* y *PEP*, también en el plano molecular, en el mantenimiento de la función C.

Además, como refuerzo a las medidas anteriores, también examinamos los niveles de expresión de dos genes representativos como dianas de *AG* e involucrados

en distintos aspectos de la función C. Así, *SPL*, tras ser activado por *AG*, contribuye a conferir identidad de estambre y participa en diversos aspectos del desarrollo de estos órganos, así como a la correcta formación de los gametófitos, tanto masculino como femenino (Schiefthaler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2004, 2007; Liu *et al.*, 2009). En la Fig. 46 se aprecia cómo la expresión de *SPL* en los distintos fondos mutantes se asemeja bastante a lo sucedido con *AG*.

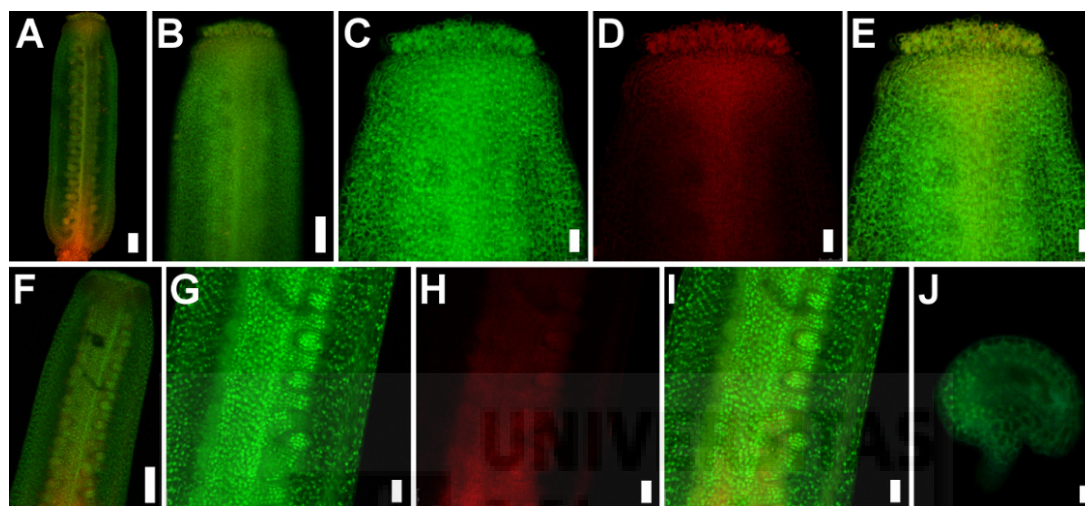
Por su parte, *KNU* también es activado por *AG* y ejerce un papel en la determinación del meristemo floral, contribuyendo a reprimir a *WUS* en el centro de éste (Payne, *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). En este caso no observamos una variación destacable en los mutantes simples *pep-4*, *hua1* y *hua2-7*. Sin embargo, en los dobles mutantes *hua1 pep-4* y *hua1 hua2-7* y particularmente en las plantas *hua1 hua2-7 pep-4/+*, los niveles del mRNA de *KNU* disminuyeron notablemente (Fig. 46), en sintonía con la disminución del mRNA de *AG* y los fenotipos detectados en dichos genotipos. Estos resultados también señalan la redundancia funcional que parece existir entre los genes *HUA* y *PEP*, a pesar de la disparidad estructural de sus productos.

#### **IV.2.2.7.- Antagonismo de las funciones A y C en el doble mutante *hua1 pep*. Expresión territorial de las proteínas *AG* y *AP1***

Uno de los elementos fundamentales del modelo ABC de desarrollo floral es la relación de antagonismo y mutua exclusión entre las funciones A y C. De acuerdo con este principio, la acción de los genes de función A, *AP1* y *AP2*, queda excluida de los territorios que originarán estambres y pistilos, mientras que la función C representada por *AG*, queda restringida a estos órganos y excluida de sépalos y pétalos (Jack, 2004; Krizek y Fletcher, 2005; Causier *et al.*, 2010). Se ha comprobado que la eliminación o disminución de una u otra actividad mutuamente excluyente conduce a la expansión ectópica de su antagonista, contribuyendo a las transformaciones homeóticas que tienen lugar (Gustafson-Brown *et al.*, 1994).

Examinamos el patrón de expresión territorial de las proteínas *AG* y *AP1* en los órganos florales del doble mutante *hua1 pep-4*. Para ello utilizamos construcciones que expresan las proteínas de fusión *AG-GFP* y *AP1-GFP* bajo la dirección de sus respectivas secuencias reguladoras, reflejando su auténtico patrón espacio-temporal (Materiales y Métodos; Urbanus *et al.*, 2009). Las construcciones *AG-GFP* y *AP1-GFP* son capaces de rescatar el fenotipo de los mutantes *ag* y *ap1*, respectivamente (Urbanus *et al.*, 2009).

En flores silvestres en el estadio 12 la presencia de la proteína AG-GFP es clara y abundante en los distintos territorios que componen el pistilo (Fig. 47; Urbanus *et al.*, 2009). Además, pudimos detectar con sencillez la fluorescencia específica de la proteína AG-GFP en núcleos de células de los óvulos y de la placenta (Figs. 47 F-J). Por otra parte, y como cabría esperar, la presencia de la proteína AP1-GFP en los sépalos de la estirpe silvestre es conspicua, no detectándose en pistilos ni en óvulos (Fig. 48, y resultados no mostrados; Urbanus *et al.*, 2009).



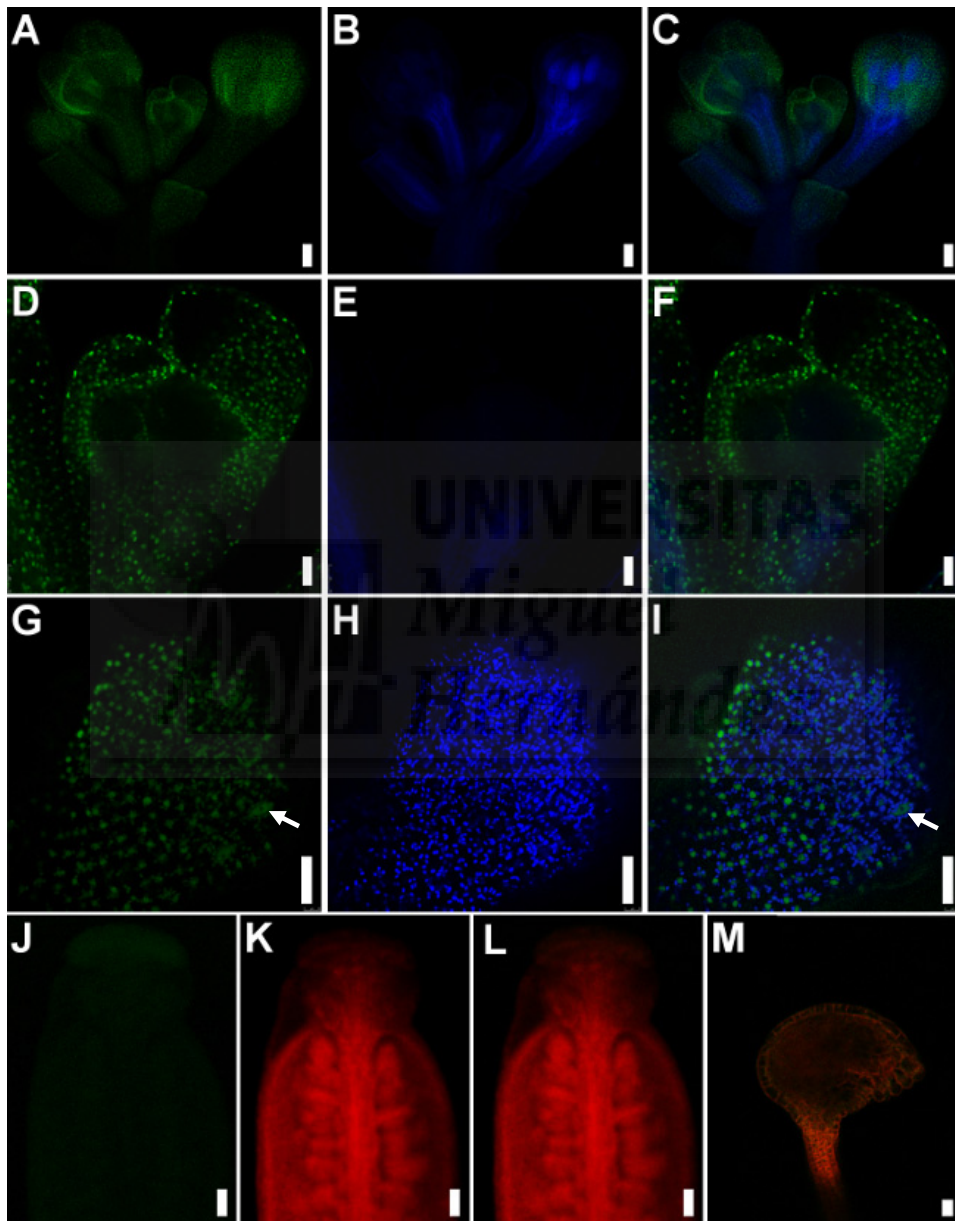
**Figura 47.-** Detección de la proteína AG-GFP en pistilos y óvulos silvestres. **A)** Pistilo en el estadio floral 12. **B)** Magnificación de la porción apical de la imagen anterior. **C), D)** y **E)** Zona apical del pistilo mostrado en (A) y (B), con distribución de la señal específica por todas las células. **F)** Pistilo en el estadio 12, donde AG-GFP se encuentra en todos los tejidos. **G), H)** e **I)** Magnificación de la imagen anterior, donde se observa señal en los óvulos y la placenta. **J)** Óvulo silvestre. Señal específica de GFP (C, G), autofluorescencia (D, H), imagen combinada (A, B, E, F, I, J). Fotografías tomadas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 75  $\mu\text{m}$  (A, B y F), 25  $\mu\text{m}$  (C, D, E, F, G, H e I) y 10  $\mu\text{m}$  (J).

A continuación, exploramos pistilos del doble mutante *hua1 pep-4* con aparentes rasgos sepaloideos, como los descritos en apartados anteriores de esta Tesis. Razonamos que si estas características están vinculadas a la reducción de la actividad C como consecuencia de la disminución de la expresión de *AG*, sería factible registrar indicios de la expansión de la función antagonista A, como la presencia de la proteína AP1 en el cuarto verticilo. Efectivamente, tal como se muestra en la Fig. 49, AP1-GFP se encuentra presente en los pistilos que manifiestan signos de transformación homeótica hacia sépalo, en un grado comparable al de los auténticos sépalos del primer verticilo. Sin embargo, otros gineceos retienen rasgos carpelares ostensibles, como son la presencia de estilo y tejido estigmático, (Figs. 38 A y C en sección IV.2.2.2). Aun así, resulta elocuente la presencia de cierto nivel de señal AP1-GFP específica en estos territorios (Fig. 49 E-G). Estos resultados son coherentes con trabajos anteriores en los que el mRNA de *AP1* se expresaba ectópicamente en los verticilos internos de plantas *hua1 hua2* y *hua1 hua2 hen4* (Chen y Meyerowitz, 1999;

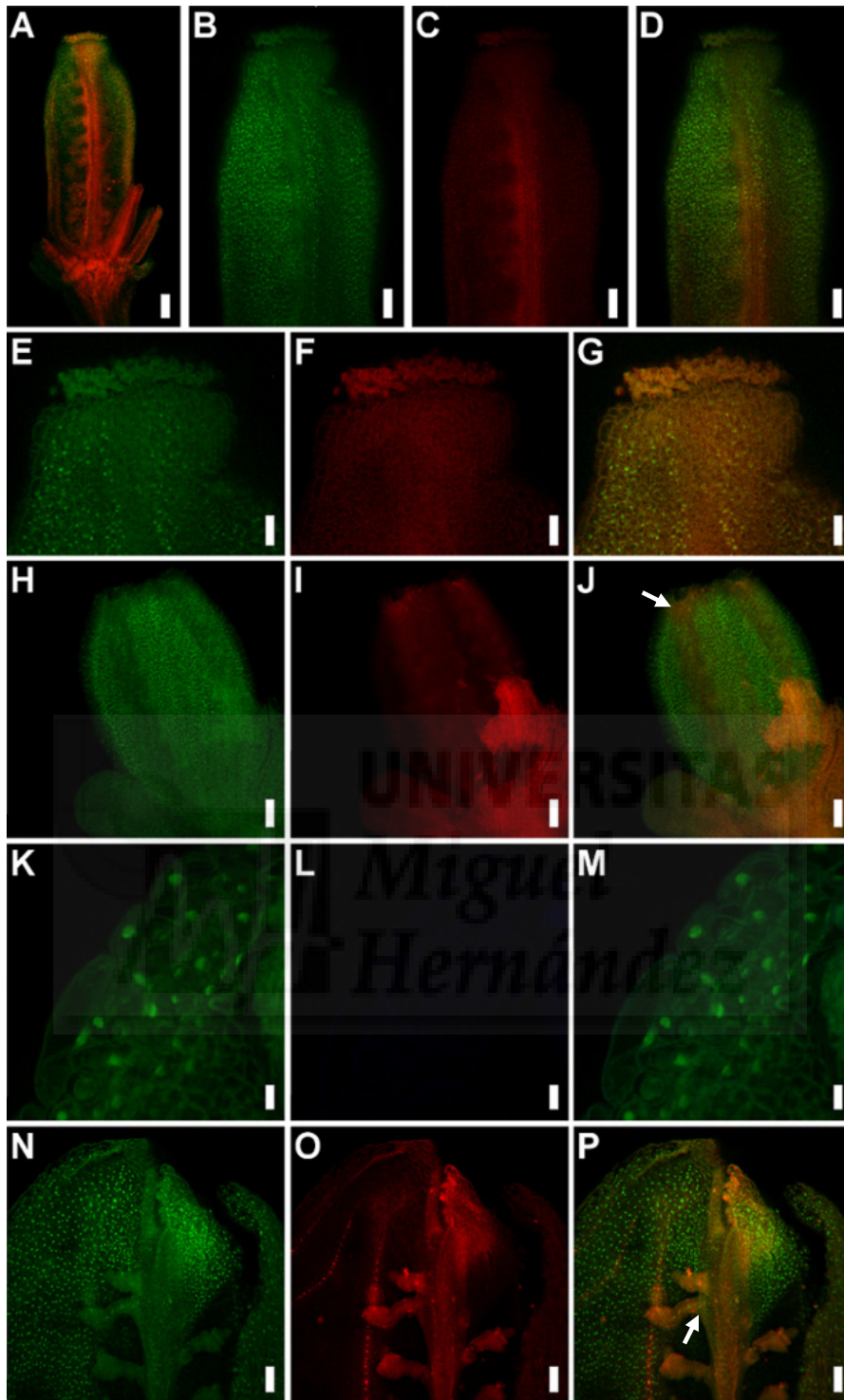


Cheng *et al.*, 2003). Además, refuerzan la autenticidad de las transformaciones homeóticas observadas, así como la noción de que *PEP* contribuye a la correcta ejecución de la función C durante la morfogénesis floral.

Merece destacarse especialmente la presencia ectópica de AP1 en algunos óvulos del mutante *hua1 pep-4* (Fig. 49 N-P), un rasgo molecular muy relevante para explicar los resultados que se exponen más adelante en esta memoria (ver capítulo 3).



**Figura 48.-** Detección de AP1-GFP en plantas silvestres. **A), B) y C)** Inflorescencia donde se observa señal en los sépalos de las distintas flores. **D), E) y F)** Magnificación de una flor de la inflorescencia anterior, con señal específica en los sépalos. **G), H) e I)** Flor preantesis con señal fluorescente específica en los núcleos de los sépalos, donde se advierten núcleos de gran tamaño, correspondientes a las células gigantes de estos órganos (flechas en G e I). **J), K) y L)** Pistilo en el estadio 12 en el cual no hay señal de AP1-GFP. **M)** Óvulo en el que no se advierte ninguna expresión de AP1-GFP. Detección específica de la GFP (A, D, G, J), autofluorescencia (B, E, H, K), imágenes combinadas (C, F, I, L, M). La autofluorescencia de la muestra se destaca arbitrariamente en azul o en rojo. Fotografías tomadas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 75  $\mu$ m (A, B, C, J, K y L), 25  $\mu$ m (D, E, F, G, H e I) y 10  $\mu$ m (M).



**Figura 49.-** Detección de la proteína AP1-GFP en pistilos del mutante *hua1 pep-4*. **A)** Pistilo en el estadio 12 con señal en las valvas, estilo y estigma. **B), C) y D)** Porción apical de la imagen mostrada en (A). **E), F) y G)** Detalle de la región apical mostrada en (A). **H), I) y J)** Gineceo u órganos del cuarto verticilo de una flor en un estadio muy temprano con un fenotipo fuerte de transformación sepaloide, donde se observa señal en sus hipotéticas valvas supernumerarias, aunque en mucha menor medida en los presuntos repla y en el escaso territorio de estilo (flecha). **K), L) y M)** Detalle de un órgano del cuarto verticilo (teórico carpelo) de un pistilo con fuertes rasgos de conversión a sépalo, en el que se advierte la ubicación nuclear de la señal de AP1-GFP. **N), O) y P)** Visión adaxial (interna) de un supuesto pistilo abierto, donde se observa señal por todas las células de la valva, así como en la placenta (flecha). Detección de la GFP (B, E, H, K, N), autofluorescencia (C, F, I, L, O), imágenes combinadas (A, D, G, J, M, P). Fotografías obtenidas mediante microscopía confocal. Barras de escala: 75  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B, C, D, H, I, J, N, O y P), 25  $\mu\text{m}$  (E, F y G) y 10  $\mu\text{m}$  (K, L y M).



#### IV.2.2.8.- La actividad *HUA-PEP* en el desarrollo floral de *Arabidopsis*. Efecto de dosis génica y redundancia funcional entre los genes *HUA-PEP*

Los resultados hasta aquí expuestos, junto con otros previos, ponen de relieve el efecto acumulativo de las mutaciones *hua1*, *hua2*, *hen4* y *pep* respecto a los fenotipos florales morfológicos y moleculares (Cheng *et al.*, 2003; Ripoll *et al.*, 2009; esta Tesis; resultados no mostrados). Al margen de los fenotipos de los dobles homocigotos *hua1 hua2* y *hua1 pep-4*, se ha comprobado el profundo impacto fenotípico de la reducción de dosis de *PEP* en las estirpes *hua1 hen4 pep-4/+* y *hua1 hua2 pep-4/+* (secciones IV.2.2.3 y IV.2.2.5). Además, se obtuvieron resultados equivalentes en otras combinaciones sesquimutantes (*hen4 hua2 pep-4/+*, *hen4 pep-4 hua1/+*, etc., datos no mostrados). A pesar de la diversa naturaleza molecular de sus productos, los genes *HUA1*, *HUA2*, *HEN4* (*HUA ENHANCER4*) y *PEP* despliegan evidentes rasgos de redundancia funcional, generando sus combinaciones mutantes un repertorio muy similar de rasgos fenotípicos. Esto nos induce a proponer la existencia de una actividad génica global, compuesta al menos por los anteriores genes, que hemos dado en denominar como actividad *HUA-PEP*, concepto que utilizaremos a partir de este punto.



**Figura 50.-** Fenotipos florales del sesquimutante *hen4 hua1 hua2-1/+ pep-4/+*. **A)** Flor en la que los órganos del tercer verticilo tienen identidad petaloide. **B)** Flor donde se han eliminado manualmente incluso órganos del cuarto verticilo para evidenciar la presencia de nuevos verticilos compuestos por pétalos y un presunto gineceo sepaloide con un ginóforo largo (flecha). **C)** Pistilo con un gran ginóforo al que se ha eliminado una valva, dejando a la vista nuevos órganos que surgen en su interior. **D)** Pistilo muy sepaloide con un estilo y un estigma muy reducido, y con órganos supernumerarios (presuntas valvas extra). **E)** El mismo pistilo mostrado en (D), al que se ha retirado una valva para mostrar nuevos verticilos internos. **F)** Ejemplo de fenotipo severo de “flor dentro de flor” de manera reiterada, apareciendo las nuevas flores sustentadas por ginóforos muy largos. Barras de escala: 1 mm.

Para ilustrar aún más el efecto de dosis entre los genes *HUA-PEP* objeto de estudio, decidimos construir la estirpe *hen4 hua1 hua2/+ pep/+*, dada la limitación impuesta por la inviabilidad de determinadas combinaciones mutantes en homocigosis. Como se observa en la Fig. 50, los individuos *hen4 hua1 hua2-1/+ pep-4/+* presentan

fenotipos florales exacerbados respecto al mutante *hen4 hua1 pep-4/+* e incluso respecto a las estirpes *hua1 hua2 pep-4/+*, considerando tanto la intensidad como la frecuencia de los rasgos observados (secciones IV.2.2.3 y IV.2.2.5, y resultados no mostrados).

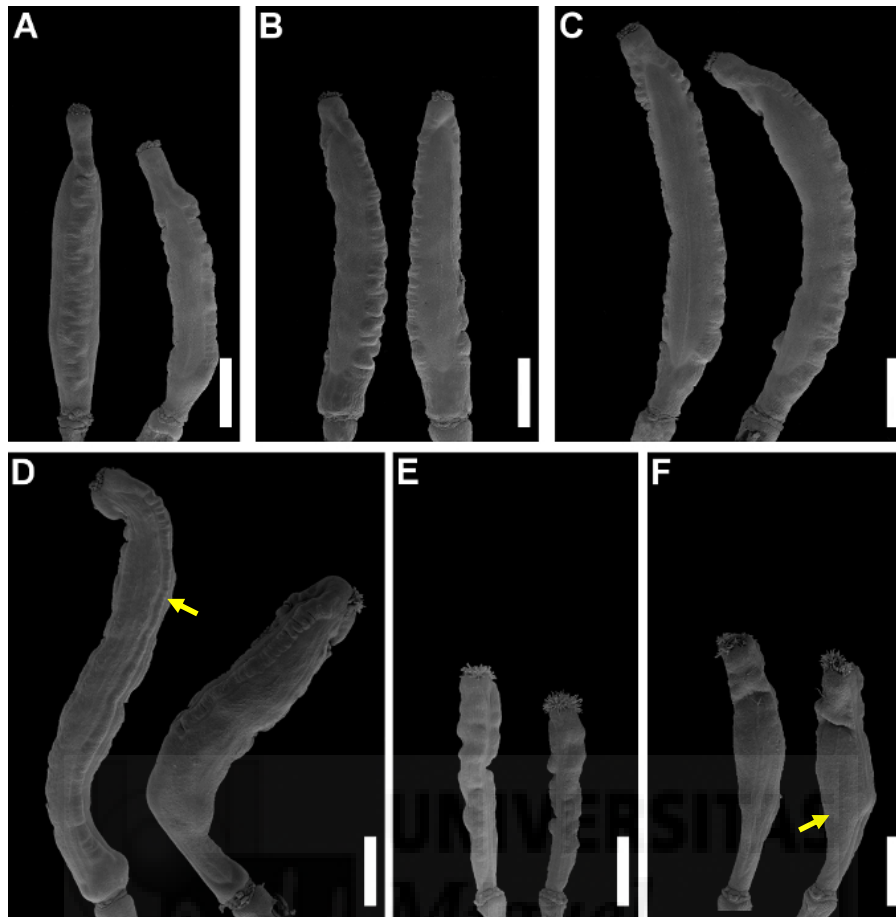
Estos resultados indican que, por ejemplo, el fondo *hen4 hua1 pep-4/+* es muy sensible al nivel de actividad *HUA2* disponible y refuerza la noción de redundancia funcional entre los elementos de la actividad *HUA-PEP*, sin menoscabo de la diversidad estructural de sus productos génicos (Chen y Meyerowitz, 1999; Li *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003; Ripoll *et al.*, 2006).

#### **IV.2.2.9.- La actividad *HUA-PEP* en otro contexto del desarrollo floral. El mutante *fruitfull (ful)***

En este punto resulta sumamente sólido el carácter de las transformaciones homeóticas causadas por el debilitamiento de la función C como consecuencia de las mutaciones en genes de la actividad *HUA-PEP*. Con el objetivo de clarificar aún más su papel e importancia en este proceso, nos propusimos estudiar su efecto en un contexto de desarrollo floral absolutamente distinto. Para este fin empleamos el fondo mutante debido al alelo nulo *ful-1* (Gu *et al.*, 1998).

##### **IV.2.2.9.1.- La aparición del fenotipo *Ful* precisa de la actividad *HUA-PEP***

Las flores *ful* no presentan alteraciones en la identidad de sus órganos. Sin embargo, el gen *FUL* es necesario para el desarrollo de la valva en el gineceo maduro. La actividad *FUL* resulta crucial en el establecimiento del patrón medio-lateral del fruto, realizando una labor antagónica respecto a los genes de identidad de margen de valva, por lo que previene su expresión en el territorio de valva y la consiguiente lignificación ectópica de esta estructura (Ferrándiz *et al.*, 2000 b; Dinneny *et al.*, 2005; Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007; González-Reig *et al.*, 2012). Las silicuas *ful* presentan un gran estilo y no se alargan tras la fertilización, ya que las células de la valva cesan en su crecimiento, permaneciendo como pequeñas células más o menos redondeadas que, además, no desarrollan nuevos tipos celulares, como células estomáticas. No obstante, como las células del replum continúan alargándose, éste adopta una disposición en zigzag característica (Fig. 51 A; Gu *et al.*, 1998).



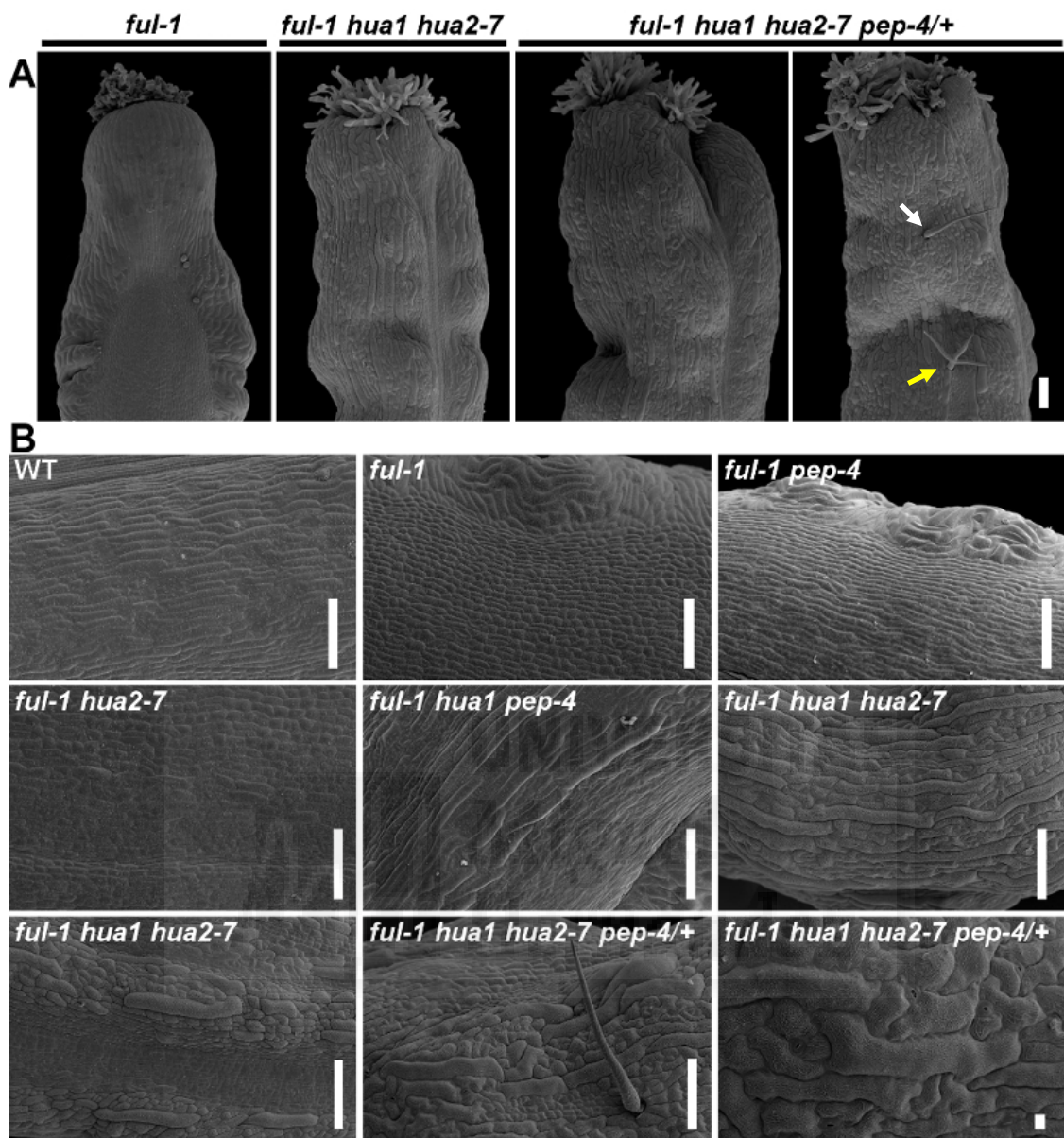
**Figura 51.-** Las mutaciones en los genes de la actividad *HUA-PEP* modifican el fenotipo  $Ful^+$ . **A)** Frutos *ful-1*. **B)** Frutos del doble mutante *ful-1 pep-4*, con un estilo más corto que en el mutante *ful-1*. **C)** Frutos *ful-1 hua2-7*, de una longitud mayor a la de los mutantes simples *ful-1*, y cuyos estilos son más cortos que los de éstos. **D)** Los frutos del triple mutante *ful-1 hua1 pep-4* poseen un estilo bastante más reducido que el de los mutantes mostrados en (A), (B) y (C), además su replum es comparativamente muy estrecho (flecha). **E)** Pistilos del triple mutante *ful-1 hua1 hua2-7* en los que no se advierte ningún fenotipo  $Ful^+$  y apenas persiste tejido estilar. **F)** Pistilos del sesquimutante *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*, sin apariencia de fenotipo  $Ful^+$ , y que además poseen un ginóforo alargado y signos de indeterminación del meristemo floral, como es el abultamiento del gineceo (flecha) debido a la presencia de órganos florales adicionales en su interior. Las imágenes han sido obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Barras de escala: 1 mm.

Estos rasgos no variaron en el doble mutante *ful-1 hua1* (datos no mostrados). Sin embargo, la introducción en el fondo *ful* de mutaciones *pep* o *hua2* sí que condujo a modificaciones más o menos sutiles del fenotipo  $Ful^+$ . Así, en los dobles mutantes *ful-1 hua2-7* o *ful-1 pep-4* se aprecia una reducción de la longitud del estilo (Figs. 51 B y C), y en el territorio de valva aparecen parches de células más grandes (*ful-1 hua2-7*) o, como promedio, las células son algo más largas (*ful-1 pep-4*; Fig. 52 B). Este último rasgo se intensifica y se hace patente en los frutos triples mutantes *ful-1 hua1 pep-4*, donde incluso se pueden apreciar ya estomas y células muy alargadas que evocan, de nuevo, a grandes células propias de sépalo (Fig. 52 B). Además, en este genotipo se aprecia una reducción del estilo aún más acusada que en el caso de *ful-1 pep-4* o *ful-1 hua2-7* (Fig. 51 D). Mientras en los frutos *ful-1* los repla en zigzag son

amplios y recorren la práctica totalidad del ovario (Fig. 51 A), en los frutos *ful-1 hua1 pep-4* el replum aparece notoriamente disminuido en grosor y el efecto zigzag se ve, de algún modo, atenuado (Fig. 51 D). Incluso en algunos frutos se aprecia cómo se ve reducido en longitud, no alcanzando el límite basal del ovario (Fig. 51 D). Por otra parte, en este genotipo se registraron casos de pérdida de determinación del meristemo floral así como transformaciones petaloides en los estambres (no mostrado), tal como describimos en la sección IV.2.2.2 para el caso del doble mutante *hua1 pep-4*.

Los frutos *ful-1 pep-4*, *ful-1 hua2-7* y *ful-1 hua1 pep-4* muestran como promedio una mayor longitud que los frutos *ful* (Figs. 51 A, B, C y D), en consonancia con el progresivo aumento de las células del territorio de valva, presumiblemente por su cambio de identidad hacia tipos celulares sepaloideos. Estos tipos celulares se aprecian de manera aún más nítida en los individuos *ful-1 hua1 hua2-7*, ya que muestran teóricos gineceos o cuartos verticilos esencialmente indistinguibles de los de las plantas *hua1 hua2* (Fig. 52 B). El territorio de estilo se retrae en el fondo *ful-1 hua1 hua2-7*. En los casos más extremos llega a quedar reducido a un pequeño vestigio de tejido, tal como se había constatado previamente en los dobles mutantes *hua1 hua2* (Fig. 52 A; ver sección IV.2.2.5). De forma similar, el tejido estigmático también disminuye, aunque en menor medida que el estilo (Fig. 52 A). Además, la anchura del replum disminuye drásticamente, desapareciendo la disposición en zigzag y recuperando un aspecto silvestre o próximo a éste, dado el grado de transformación global de este mutante (Fig. 52 B). De hecho, su aspecto se asemeja a la estructura que encontraríamos en un pistilo sin polinizar, donde las células precursoras del replum permanecen con un tamaño reducido (Fig. 13; Bowman *et al.*, 1999). A este respecto, se debe destacar que los “gineceos” *ful-1 hua1 hua2-7* suelen presentar un tamaño menor que los mutantes precedentes en fondo *ful-1*, a pesar del elevado grado de transformación de los tipos celulares que lo componen (Fig. 51 F). Este hecho ocurre, más que probablemente, como consecuencia de su muy escasa fertilidad. Esta circunstancia también es común al fondo *hua1 hua2-7* con una actividad *FUL* intacta (sección IV.2.2.5)

En conjunto, los resultados expuestos hasta ahora en esta sección sugieren que la reducción de la actividad *HUA-PEP* es epistática sobre las consecuencias fenotípicas de la mutación *ful-1*. El estudio de las plantas *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*, de hecho, refuerza esta idea. Efectivamente, de manera semejante a como sucede en presencia de actividad *FUL* (sección IV.2.2.5), la eliminación de una dosis alélica de *PEP* para crear plantas *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+* provoca un aumento en intensidad y frecuencia de los rasgos observados en los individuos *ful-1 hua1 hua2-7*.



**Figura 52.-** Las mutaciones en los genes de la actividad *HUA-PEP* modifican el fenotipo *Ful*. **A)** Frutos *ful-1* con un estilo largo y un ancho replum en zigzag, y gineceos o frutos *ful-1 hua1 hua2-7* y *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*. En estos dos últimos genotipos, ambas rasgos se ven muy reducidos. En algunos pistilos *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+* se pueden observar tricomas simples y ramificados en la superficie de las valvas (flechas blanca y amarilla, respectivamente). **B)** Superficie abaxial de las valvas de distintos fondos mutantes. Las valvas de *ful-1* poseen células pequeñas y redondeadas. En *ful-1 pep-4* y *ful-1 hua2-7* se observan células más alargadas. En las valvas del triple mutante *ful-1 hua1 pep-4* aparecen células sensiblemente más largas que en el silvestre (WT), recordando a las células gigantes de sépalo. Estos rasgos aumentan en el triple mutante *ful-1 hua1 hua2-7*, donde también aumenta la presencia de estrías de ceras. Sus repla se ven muy reducidos y sin disposición en zigzag, y la zona de dehiscencia no aparece definida. El sesquimutante *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+* es muy similar al genotipo anterior, aunque las valvas además presentan tricomas ocasionalmente. Obsérvese la presencia de abundantes estomas, ausentes en las valvas del mutante simple *ful-1*. Fotografías tomadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Barras de escala: 100 µm, excepto 10 µm en la última foto del panel B (genotipo *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*).

Los gineceos *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+* carecen también de un replum de tipo *ful*, muestran grandes células con estrías de ceras y drástica reducción de tejidos



apicales propios de pistilo (Figs. 52 A y B). Además, muestran ocasionalmente tricomas simples, o incluso compuestos, en su superficie (Figs. 52 A y B), y surgen ginóforos alargados (Fig. 51 F). Al igual que en el caso de los individuos *ful-1 hua1 hua2-7*, los “gineceos” son de menor tamaño que en otras combinaciones precedentes con la mutación *ful* (Fig. 51) en consonancia con su esterilidad. No obstante, los gineceos *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+* no son tan pequeños como en *ful-1 hua1 hua2-7* (Figs. 51 E y F). Ello es debido a la elevada incidencia de la indeterminación del meristemo floral, lo que ocasiona, además de mayor número de órganos en el cuarto verticilo (supuestas valvas extra), la aparición de nuevos órganos florales en el interior del teórico gineceo (Fig. 54 D). Esto le otorga un cierto aspecto abultado (Fig. 51 F). Estos nuevos verticilos surgen también, a su vez, sustentados sobre largos ginóforos (Fig. 54 D). Se debe resaltar que se observaron transformaciones petaloides en el tercer verticilo, similares en intensidad y frecuencia a las registradas en los correspondientes genotipos en fondo *FUL* (Fig. 53 D y resultados no mostrados).

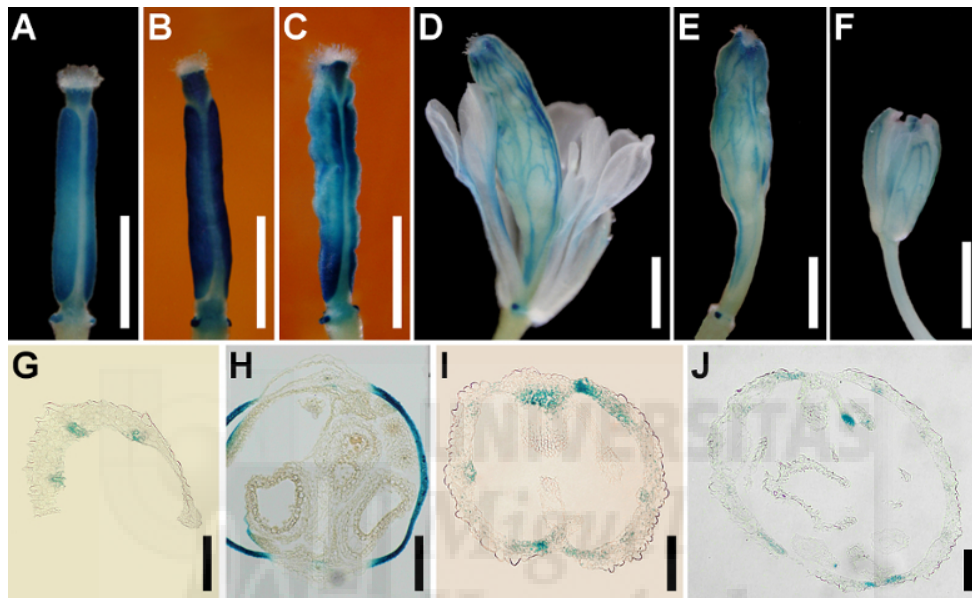
Todo sugiere, por consiguiente, que la pérdida de la actividad *HUA-PEP* es epistática sobre la mutación *ful*. La función *PEP* aparece como un componente crítico de esta interacción, quedando reflejado su impacto particularmente en los individuos mutantes *ful-1 hua1 pep-4* y, sobre todo, en las plantas *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*, estableciéndose un paralelismo con los correspondientes genotipos sin la mutación *ful* presentados con anterioridad (secciones IV.2.2.2 y IV.2.2.5).

#### **IV.2.2.9.2.- La pérdida de la función *HUA-PEP* modifica el patrón de expresión de *FUL***

El alelo *ful* empleado en el presente estudio (*ful-1*; ver Materiales y Métodos) está causado por la inserción de un transposón que contiene el gen testigo *GUS*, promoviendo su expresión (*enhancer-trap*) bajo un patrón espacio-temporal que refleja de manera fidedigna el del propio gen *FUL* endógeno. Por tanto, la tinción histoquímica en el mutante *ful-1* retiene su territorio de expresión, lo que resulta útil como indicador de la identidad de los tejidos donde tiene lugar, tanto en el pistilo y el fruto, como en otras estructuras en las que *FUL* se expresa (Gu *et al.*, 1998).

Consiguientemente, los pistilos o frutos *ful-1/+*, de fenotipo silvestre dado el carácter recesivo simple de la mutación, presentan una tinción característica en el territorio de valva, así como en el estilo y los nectarios (Fig. 53 A; Gu *et al.*, 1998). Los gineceos *ful-1* muestran esencialmente el mismo patrón de expresión (Fig. 53 B y H). En el caso del triple mutante *ful-1 hua1 hua2-7*, también se observa una señal intensa

en los nectarios y en aquel territorio que aún preserva identidad de estilo (Fig. 53 C). En el territorio supuestamente de valva, se observa una distribución más irregular de la señal, manteniendo un mayor grado de tinción en algunas zonas basales y en porciones próximas a la zona media del gineceo (Figs. 53 C e I). Esta distribución parece concordante con el hecho de que suelen ser estas zonas, precisamente, aquéllas en las que los pistilos o frutos con mutaciones múltiples en los genes *HUA-PEP* son más proclives a mantener células de valva de apariencia silvestre (Fig. 52 B).



**Figura 53.-** Patrón de expresión de *FUL* mediante tinción GUS en distintos fondos mutantes. Los frutos *ful1/+* de fenotipo silvestre (A) y mutantes *ful-1* (B y H) presentan una intensa señal GUS en las valvas, en el estilo y en los nectarios. C) En *ful-1 hua1 hua2-7* se observa una reducción de la tinción GUS en las valvas, aunque persiste en las secciones más próximas a la zona media, en la zona basal y en los nectarios. D) y E) Pistilos *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+* en los que se observa una gran reducción de la tinción, advirtiéndose principalmente en los nectarios y también en la vasculatura, cuyo patrón recuerda al de los sépalos. F) Patrón de expresión de *FUL* en un sépalo silvestre (*ful-1/+*). G-J) Detección de actividad GUS en cortes histológicos transversales. G) Sépalo silvestre (*ful-1/+*). H) Fruto *ful-1* con amplios repla e intensa señal en las valvas. I) y J) Cortes transversales de un gineceo *ful-1 hua1 hu2-7 pep-4/+*, donde se aprecian órganos florales internos y una escasa señal GUS que se corresponde, esencialmente, con la presencia de haces vasculares. Barras de escala: 1 mm (A, B, C, D, E y F) y 100 μm (G, H, I y J).

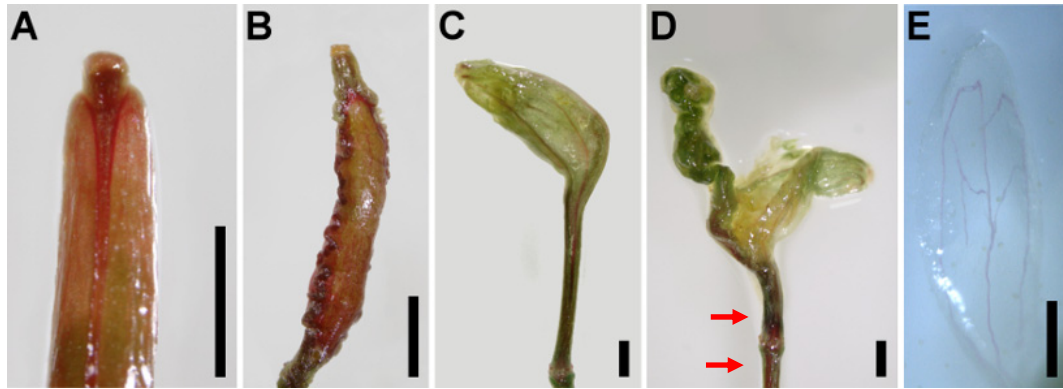
Por tanto, parece muy verosímil que el cambio registrado en el patrón de tinción GUS refleje una conversión homeótica parcial desde gineceo a sépalo. Este efecto se hizo aún más patente en los individuos *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*. En este caso, los órganos del cuarto verticilo presentan una distribución de la señal GUS que poco recuerda a la de un gineceo, salvo en los nectarios, así como en vestigios de territorio estilar y algún remanente de valva anexo a la zona media (Figs. 53 D, E y J). Muy al contrario, el patrón de expresión GUS evoca de manera muy clara la vasculatura típica de un sépalo (Figs. 53 F y G; Gu *et al.*, 1998). Estos resultados corroboran de nuevo el carácter de dichas transformaciones homeóticas.

#### IV.2.2.9.3.- La pérdida de la función *HUA-PEP* modifica el patrón de lignificación en el mutante *ful*

Hemos observado cómo la pérdida de actividad *HUA-PEP* anula el fenotipo *Ful* en el gineceo, y altera el patrón de expresión de *FUL* como consecuencia de una progresiva transformación de territorios de identidad carpelar hacia otra supuestamente de sépalo. El fenotipo *Ful* se origina en gran medida como resultado de la expansión de genes de margen de valva, lo que provoca la expansión de los territorios que experimentan lignificación como consecuencia de la maduración del fruto (Ferrándiz *et al.*, 2000 b; Liljegren *et al.*, 2004). Por tanto, decidimos examinar esta característica mediante tinción con floroglucinol, que tiñe específicamente de rojo las ligninas. En el fruto silvestre maduro se observa tinción preferentemente en los territorios de estilo y las zonas medias del fruto, donde tendrá lugar la separación de las valvas (Fig. 54 A). Esta situación se intensifica en los frutos *ful-1* debido a la lignificación ectópica de las valvas (Fig. 54 B). La eliminación de genes de margen de valva, inductores de la lignificación de la valva en el fondo *ful*, también provoca el rescate parcial del fenotipo (Liljegren *et al.*, 2004). Entre ellos se encuentran los genes *SHP*, los cuales disminuyen su expresión en los mutantes *hua-pep* (ver sección IV.3.2), por lo que no descartamos su influencia. No obstante, en flores equivalentes de plantas *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+* la lignificación se circunscribe a pequeñas áreas en la parte apical, con probable identidad residual de estilo (Fig. 54 C). También se observan delgadas líneas teñidas que parecen corresponderse con vasculatura lignificada, precisamente como sucede en los sépalos donde se observa lignificación en los haces vasculares (Figs. 54 C y D). Estos dominios parecen tener continuidad con regiones más basales y de carácter más vegetativo, como son el ginóforo y el pedúnculo floral (Figs. 54 C y D). Este resultado demuestra la supresión de una característica funcional muy representativa de los mutantes *ful* y es congruente, de nuevo, con una situación de transformación homeótica de carpelo a sépalo propiciada por la disminución de la actividad *HUA-PEP*.

En suma, los datos acumulados de este estudio indican que la pérdida de la función *HUA-PEP* es esencialmente epistática respecto a las alteraciones del desarrollo del gineceo causadas por la mutación *ful-1*. Aun en dicha situación, la actividad de los genes *HUA-PEP* es fundamental para el mantenimiento de la identidad carpelar.





**Figura 54.-** Tinción de ligninas con floroglucinol en el silvestre, el mutante simple *ful-1* y el sesquimutante *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*. **A)** Tinción silvestre con floroglucinol de las zonas de dehiscencia en un fruto maduro. **B)** Tinción de las ligninas en el mutante *ful-1*, donde se colorea también la región de valva. **C)** y **D)** Pistilos del sesquimutante *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*, donde la tinción en el gineceo queda limitada a la vasculatura. Tras diseccionar el cuarto verticilo, se observan en (D) nuevos órganos florales que surgen en su interior. Obsérvese la intensa tinción en el largo ginóforo y el pedúnculo floral (flechas). **E)** Tinción con floroglucinol de un sépalo silvestre. Barras de escala: 1 mm (A, B, C y D) y 500  $\mu\text{m}$  (E).

#### IV.2.3.- Efecto de la sobreexpresión de *PEP* durante la morfogénesis floral

Hasta el momento hemos abordado el impacto de la disminución o eliminación de la actividad *PEP* con relación a la morfogénesis floral. Esta tarea se ha llevado a cabo realizando un estudio de su interrelación con otras actividades génicas, cuya pérdida también contribuye al debilitamiento de la función C. Por tanto, nos preguntamos cuál sería el efecto de la ganancia de función de *PEP* en este contexto. Como hemos expuesto con anterioridad, los datos recabados respaldan la hipótesis de que los genes de la actividad *HUA-PEP* muestran redundancia funcional entre ellos. Por consiguiente, resultaba atractiva la perspectiva de que la sobreexpresión de *PEP* pudiera compensar la deficiencia de las otras funciones génicas involucradas.

Las plantas *35S::PEP* manifiestan una floración tardía que se corresponde con altos niveles de *FLC*, pero que no se distinguen por alteraciones morfológicas reseñables (Ripoll *et al.* 2009; sección IV.1.2 de esta Tesis). Decidimos comprobar su efecto en distintos fondos mutantes. Con este propósito se introdujo la construcción *35S::PEP*, mediante polinización, en fondos *hen4*, *hua1*, y *hua2*. Estos mutantes simples son esencialmente silvestres en su morfología (Chen y Meyerowitz, 1999; Cheng *et al.*, 2003; sección IV.2.2), por lo que no son el sustrato adecuado para evaluar un presunto rescate por sobreexpresión de *PEP*. De hecho, las plantas *hen4 35S::PEP*, *hua1 35S::PEP* y *hua2 35S::PEP* son también morfológicamente silvestres (resultados no mostrados). La combinación doble mutante *hua1 hua2*, por el contrario, muestra un fenotipo floral consistente, con penetrancia completa, y contrastado por

otros autores (Chen y Meyerowitz, 1999; sección IV.2.2.5). Todo ello lo convierte en un fondo genético idóneo para evaluar el efecto de la ganancia de función de *PEP* durante la morfogénesis floral.

#### IV.2.3.1.- Sobreexpresión de *PEP* en el fondo mutante *hua1 hua2*

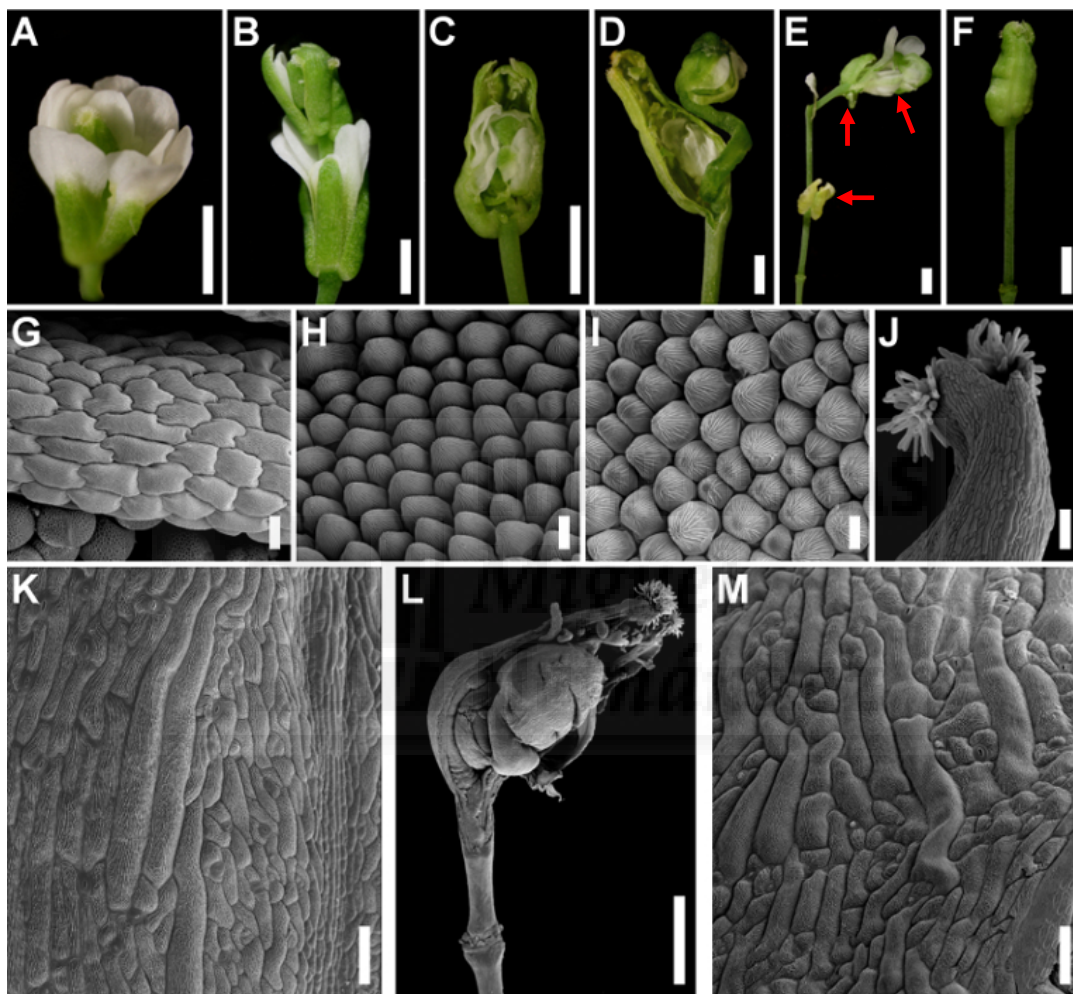
Generamos triples homocigotos *hua1 hua2-7 35S::PEP*. Estas plantas se asemejan en su hábito de crecimiento vegetativo a los individuos *hua1 hua2-7*, siendo de menor porte que el silvestre (datos no mostrados). Sin embargo, los fenotipos registrados en las flores resultaron sorprendentes.

GENOTIPO		<i>hua1 hua2-7</i>	<i>hua1 hua2-7 35S::PEP</i>
<b>Transformaciones petaloides del tercer verticilo</b>	<b>Suave</b>	62%	14%
	<b>Medio</b>	36%	32%
	<b>Fuerte</b>	2%	54%
	<b>Total</b>	100%	100%
<b>Fallo del cierre apical en el gineceo</b>		54%	100%
<b>Órganos en un quinto verticilo</b>		0%	63,9%
<b>Valvas supernumerarias</b>		4%	55,5%
<b>Ginóforo largo</b>		0%	72,2%

**Tabla 3.-** Recuento de distintos rasgos fenotípicos florales *hua1 hua2-7 35S::PEP*. En la columna del genotipo *hua1 hua2-7* se muestran datos procedentes del mismo recuento que en la Tabla 2, además de datos correspondientes a un nuevo rasgo fenotípico (ginóforo largo). Las categorías en la intensidad de las transformaciones petaloides del tercer verticilo son las mismas que las descritas en la Tabla 2. Número de flores observadas en cada genotipo: 50; número de plantas: 20.

Contrariamente a nuestra conjetura inicial, la sobreexpresión de *PEP* en el fondo *hua1 hua2-7* no sólo no rescató su fenotipo sino que aumentó la intensidad y la frecuencia de sus rasgos mutantes, recordando a las plantas *hua1 hua2-7 pep-4/+* (Fig. 55; Tabla 3; ver Figs. 43 y 44). En el fondo mutante *hua1 hua2-7* la sobreexpresión de *PEP* produce un efecto análogo al de su reducción. En ambos casos se observa el mismo repertorio de rasgos anómalos, como son transformaciones petaloides de estambres, marcadas transiciones de carpelo a sépalo en el cuarto verticilo, así como pérdida de determinación floral (Fig. 55; Tabla 3). Al igual que sucede tras la reducción a la mitad de la dosis de *PEP*, no sólo se intensifican los rasgos ya presentes en las flores *hua1 hua2-7*, sino que aparecen rasgos inexistentes (o extraordinariamente infrecuentes) en dicho genotipo, como es la aparición reiterada de nuevas flores o nuevos órganos florales en el interior del cuarto

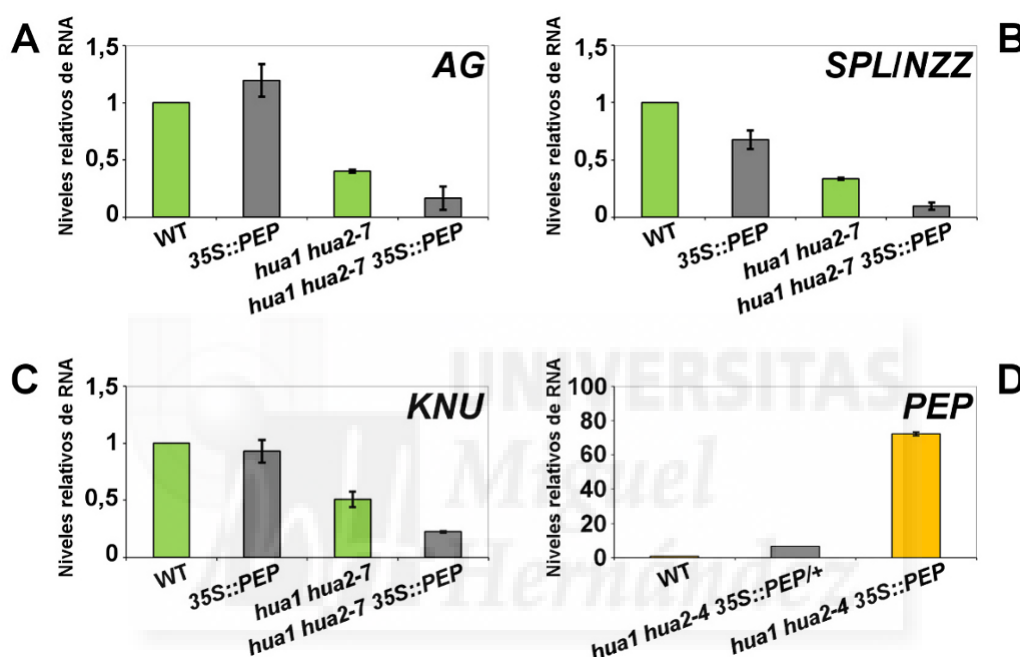
verticilo (Fig. 55 E). De hecho, este tipo de manifestaciones fenotípicas, relacionadas con la pérdida de determinación del meristemo floral, son más abundantes en las plantas *hua1 hua2-7 35S::PEP* que en los individuos *hua1 hua2-7 pep-4/+* (Tablas 2 y 3). Cabe resaltar que en las flores *hua1 hua2-7 35S::PEP* (así como en *hua1 pep-4* y *hua1 hua2-7 pep-4/+*) los verticilos adicionales también están compuestos por pétalos y órganos que poseen largos ginóforos y características sepaloides (Figs. 55 B-E y L).



**Figura 55.-** Fenotipos de las flores *hua1 hua2-7 35S::PEP*. **A)** Flor en la que todos los órganos del tercer verticilo se han transformado en pétalos. **B)** Flor en la que el cuarto verticilo, formado por más de 2 teóricas valvas y abierto en su ápice, sobresale al estar sustentado por un ginóforo alargado. **C)** y **D)** Pistilos con indeterminación del meristemo floral, en los que se observan nuevos órganos que surgen del centro de la flor. **E)** Fenotipo reiterado de “flor dentro de flor”. Las flechas indican las nuevas flores que han surgido del centro del gineceo. **F)** Pistilo con un ginóforo muy largo. **G-M)** Fotografías de microscopio electrónico de barrido (SEM). **G)** Superficie adaxial de una antera silvestre. **H)** Pétalo silvestre. **I)** Órgano del tercer verticilo del mutante *hua1 hua2-7 35S::PEP*. **J)** Imagen de la porción apical de un pistilo *hua1 hua2-7 35S::PEP*, con un fallo del cierre apical, y con los tejidos estilar y estigmático muy reducidos. **K)** Superficie abaxial de una valva del mutante *hua1 hua2-7 35S::PEP*, con células gigantes y estrías epicuticulares. **L)** Pistilo con indeterminación del meristemo floral. **M)** Ampliación de la fotografía anterior en la que se observa la superficie del órgano que surge en el interior del cuarto verticilo, cuyo fenotipo es muy similar al mostrado en (K). Barras de escala: 1 mm (A, B, C, D, E, F y L), 10  $\mu$ m (G, H e I), y 100  $\mu$ m (J, K y M).

#### IV.2.3.2.- Expresión de *AG* en las plantas *hua1 hua2 35S::PEP*

Mediante qPCR, medimos los niveles del transcrito efectivo de *AG* en inflorescencias de plantas con la construcción *35S::PEP*. Las plantas *35S::PEP* en un fondo silvestre presentan niveles de *AG* similares al de su ancestro Col-0 (Fig. 56). Sin embargo, en el triple homocigoto *hua1 hua2-7 35S::PEP* se registraron niveles de *AG* muy inferiores, menores que en el doble mutante *hua1 hua2-7* (Figs. 56) y comparables al de las plantas *hua1 hua2-7 pep-4/+* (Fig. 46).



**Figura 56.-** Estudio de la expresión de RNA mediante qPCR de los genes *AG*, *SPLINZZ*, *KNU* y *PEP* en inflorescencias silvestres (WT) y de distintos fondos mutantes. **A)**, **B)** y **C)** Niveles relativos del mRNA de *AG*, *SPLINZZ* y *KNU* en inflorescencias de diversos genotipos. **D)** Niveles relativos del mRNA de *PEP* en plantas *hua1 hua2-4* con una copia o dos copias de *35S::PEP*. Barras de error: DE.

Estos resultados resultan coherentes con los fenotipos morfológicos de las plantas correspondientes. La importante reducción de los niveles de transcritos de los genes *KNU* y *SPLINZZ* en las plantas *hua1 hua2-7 35S::PEP* también se encuentra en sintonía con los fenotipos observados (Fig. 56).

#### IV.2.3.3.- El fenotipo de las flores *hua1 hua2 35S::PEP* no se debe a un efecto de silenciamiento de *PEP*

Circunstancialmente, los resultados de combinaciones mutantes que implican múltiples inserciones de T-DNA han de ser interpretados con cautela, en ocasiones debido a

fenómenos de silenciamiento de los genes sobreexpresados (Daxinger *et al.*, 2008). En principio ésta no debería ser la causa de los fenotipos observados en las plantas *hua1 hua2 35S::PEP* por varias razones. En primer lugar, porque se obtienen esencialmente los mismos resultados con alelos de *hua2* de distintas colecciones de T-DNA (*hua2-4* y *hua2-7*; ver Materiales y Métodos). Además, resultaría paradójico que, siendo inviables las plantas *hua1 hua2 pep*, la función *PEP* se pudiera anular mediante este mecanismo.

No obstante, comprobamos los niveles relativos del mRNA de *PEP* mediante qPCR en plantas silvestres y *hua1 hua2-4* portadoras de una copia (hemicigotos *hua1 hua2-4 35S::PEP/+*) o dos (homocigotos *hua1 hua2-4 35S::PEP*) de la inserción transgénica de sobreexpresión. En ambos casos, se pudo comprobar un notable incremento de los niveles de *PEP* respecto al silvestre, sobre todo con dos dosis de la inserción (Fig. 56). Este dato demuestra que el fenotipo de las plantas *hua1 hua2-4 35S::PEP* no se debe a un proceso de silenciamiento de *PEP*.

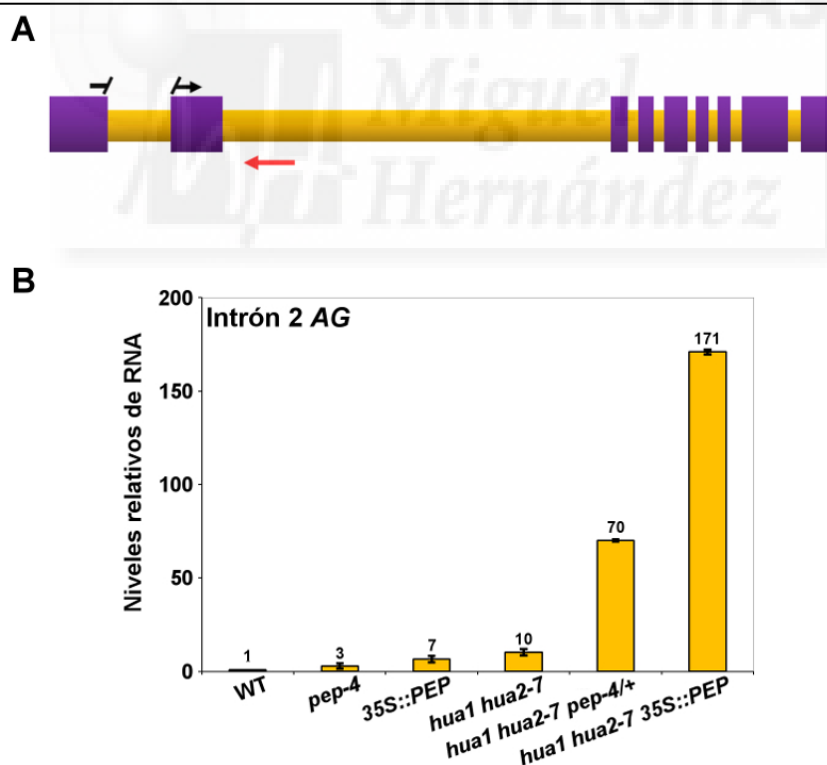
Además, estos experimentos arrojaron un dato adicional muy interesante. Curiosamente, las plantas *hua1 hua2-4 35S::PEP/+*, con niveles de *PEP* superiores al silvestre, son indistinguibles de las plantas *hua1 hua2-4*. En cambio, los triples homocigotos *hua1 hua2-4 35S::PEP*, que contienen niveles muy superiores de *PEP*, sí que muestran el conjunto de fenotipos que distingue a este tipo de plantas (Fig. 55; sección IV.2.3.1 y datos no mostrados). La correlación entre niveles de *PEP* y la fuerza del fenotipo registrado sugiere que, en lugar de fenómenos de silenciamiento, una dosis excesiva de *PEP* pudiera ser la causa de estas observaciones.

#### **IV.2.3.4.- Disminución del mRNA efectivo de AG e incremento de transcritos con retención de secuencias intrónicas**

Tanto la pérdida como la ganancia de función de *PEP*, en conjunción con mutaciones en otros genes de la actividad *HUA-PEP*, conducen a diversos grados de aparente debilitamiento de las atribuciones de la función C. Esto se corresponde con niveles inferiores del mRNA efectivo de AG (secciones IV.2.2.6 y IV.2.3.2). Con anterioridad, otros autores observaron que la acumulación de las mutaciones *hen4*, *hua1* y *hua2* provoca la disminución del mRNA efectivo de AG, junto con un incremento de la producción de transcritos prematuramente poliadenilados en el intrón 2 (Cheng *et al.*, 2003). Con el objetivo de investigar la implicación de *PEP*, examinamos mediante qPCR la posible existencia de tales transcritos, utilizando parejas de cebadores

convergentes que hibridan en el segundo exón y el segundo intrón, respectivamente (Fig. 57 A).

El nivel de estos productos en el silvestre es muy escaso, lo que dificulta su detección, por lo que los aumentos registrados en los mutantes simples *pep-4* y *35S::PEP*, aunque sugerentes, hay que considerarlos con cautela (Fig. 57 B y resultados no mostrados). Sin embargo, en inflorescencias del doble mutante *hua1 hua2-7* se observó un importante incremento de este producto, del orden de 10 veces con respecto al silvestre (Fig. 57 B). Significativamente, la eliminación de un alelo *PEP* en los individuos *hua1 hua2-7 pep-4/+* provocó un cuantioso aumento respecto al genotipo anterior (70 veces, Fig. 57 B). Pero el resultado más sorprendente se obtuvo en las plantas *hua1 hua2-7 35S::PEP*, donde se alcanzaron niveles muy superiores (170 veces, Fig. 57 B). Estos valores, aun no guardando proporcionalidad, sí parecen establecer una correlación inversa con los niveles del mRNA efectivo de AG en los diversos genotipos. Además, muestran cierto paralelismo con los fenotipos correspondientes e ilustran, de manera clara, el impacto que tanto la pérdida como el exceso de *PEP* tienen en la acumulación de este tipo de transcritos.



**Figura 57.-** Las mutaciones en los genes de la actividad *HUA-PEP* conducen a un incremento de transcritos aberrantes de AG con retención de secuencias intrónicas. **A)** Esquema de la estructura del gen AG, con los cebadores utilizados para realizar los experimentos de qPCR mostrados en (B). Los rectángulos morados representan los exones, y los espacios en naranja simbolizan los intrones. Flecha negra: cebador directo (*forward*). Flecha roja: cebador inverso (*reverse*). Obsérvese que, para mayor especificidad, el cebador directo hibrida con secuencias de los exones 1 y 2, adyacentes tras el correcto procesamiento del intrón 1. **B)** Expresión relativa del mRNA de AG con secuencias del intrón 2 en plantas silvestres (WT) y diversos fondos mutantes. Barras de error: DE.



Nos preguntamos cuál sería la estructura de estos RNA con secuencias intrónicas. Para responder a este interrogante procedimos a su clonación mediante aislamiento de RNA poliadenilado de plantas *hua1 hua2-7 35S::PEP*, por ser donde más abundan estos transcritos, seguido de la técnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*; ver Materiales y Métodos).

---

```

ACGGCGTACCAATCGGAGCTAGGAGGAGATTCTCTCCCTTGAGGAAATCTGGGAGAGGAAAGATC
GAAATCAAACGGATCGAGAACACACGAATCGTCAAGTCACTTTTTTGCAAACGTAGAAATGGTTTTG
CTCAAGAAAGCTTACGAGCTCTCTGTTCTTTTGTGATGCTGAAGTCGCACTCATCGTCTTCTCTAGC
CGTGGTCGTCTCTATGAGTACTCTAACAACAGgtttcttcttcttctctctgctgctctgttcttacttt
attaataattaaattatTTTTAAAGTCCGATTTAGGGTTTTATGTTTATGTTAAAGCATAAATCTT
ttacgagggTTTTCGATCTTCTAAGCTAGATTTGATCTCTCTCTTGAATGCTCTTATGGGTAG
gattatTTTTCACTTTTTCTTCAATTTCCACACATATATATAAACACACTAACATTAGTG
ggaataTTTgTTgatatgTTTATTTTACTTCGGGGTTTTGTAACAATTTGtagatcta
atTTCTgttcttcatgtgtatattaatTTTCCCTTAAGACTTaaataaaagagagaaTTTgttta
tatA

```

**Figura 58.-** Esquema parcial de la secuencia del gen AG en el que se muestra la región donde se produce corte y poliadenilación prematura en el intrón 2. La secuencia correspondiente al exón 2 aparece como letras mayúsculas sombreadas en negro. La secuencia intrónica que forma parte del producto identificado mediante RACE 3' se representa con letras minúsculas hasta el punto de corte (A marcada en rojo). Los presuntos elementos de secuencia asociados al corte y poliadenilación aparecen sombreados en color (FUE en azul, NUE en verde y CE en amarillo).

A pesar de nuestros esfuerzos sólo obtuvimos un único producto, aunque muy consistente por su reiteración. Sin embargo, la estructura de este transcrito resulta muy sugerente. Efectivamente, el producto clonado se corresponde con un RNA que incluiría los dos primeros exones, seguidos de los primeros 363 nucleótidos de los 2999 que componen el intrón 2, donde aparentemente se produjo un proceso de poliadenilación prematura (Fig. 58). Ello conlleva la formación de un transcrito que, además de incluir secuencias intrónicas, carece de los 6 últimos exones, lo que con toda probabilidad le impediría actuar como mensajero para la síntesis de un polipéptido funcional.

Curiosamente, no existe coincidencia con los tamaños de los transcritos poliadenilados en secuencias del intrón 2 de AG, previamente identificados por otros autores (Cheng *et al.*, 2003). El origen de dicha discrepancia puede residir en polimorfismos de secuencia o en diferencias en la estabilidad de este tipo de transcritos en los distintos accesos usados en ambos trabajos (Ler, Cheng *et al.*, 2003; Col-0, esta Tesis).

En los eucariotas, el mecanismo de maduración de numerosos transcritos en su extremo 3' implica que un precursor sea sometido a corte endonucleolítico y

poliadenilación en puntos específicos (Tian y Manley, 2013). El estudio de este proceso ha conducido a la identificación de elementos de secuencia asociados, tanto en los eucariotas en general como específicos de las plantas, que actúan de guía de la maquinaria de procesamiento correspondiente (Millevoi y Vagner, 2010). En las plantas se han definido tres grupos de señales de poliadenilación, los elementos lejano (FUE, *Far Upstream Element*) y cercano (NUE, *Near Upstream Element*), así como la secuencia de corte (CE, *Cleavage Element*; Loke *et al.*, 2005).

Un examen detallado del transcrito de *AG* prematuramente poliadenilado nos revela la presencia de este tipo de elementos adecuadamente situados respecto al lugar de procesamiento (Fig. 58). Encontramos un punto de corte UA (TA en la Fig. 58) en un entorno rico en U (CE) acompañado de un elemento NUE rico en A, a la distancia apropiada (-18). De hecho, este último responde a la secuencia canónica de referencia AAUAAA (Fig. 58; Proudfoot, 2011). Además, el motivo UUUGUU (TTTGTT en la Fig. 58), situado también correctamente, representa la secuencia más abundante en las plantas para el elemento FUE, un módulo de control y de potenciación (Fig. 58; Loke *et al.*, 2005). En definitiva, por sus secuencias y disposición respecto al punto de poliadenilación, resulta muy verosímil la implicación de estos elementos críticos en el origen de este transcrito.

#### **IV.2.3.5.- La sobreexpresión de *PEP* podría perturbar el equilibrio entre los componentes de la actividad *HUA-PEP***

En secciones precedentes hemos comprobado que la sobreexpresión de *PEP* en un fondo genético silvestre carece de efectos fenotípicos perceptibles respecto a la morfogénesis floral, así como tampoco conduce a alteraciones de consideración en los niveles de *AG*. Sin embargo, en un fondo *hua1 hua2* sus efectos morfológicos y moleculares son cualitativamente similares a la reducción de *PEP* en ese mismo fondo, siendo su intensidad aún mayor (secciones IV.2.2.5 y IV.2.3.1). Este comportamiento inesperado nos condujo a considerar una dosis excesiva de la proteína *PEP* como la presunta causa del fenotipo de las plantas *hua1 hua2 35S::PEP*.

Puesto que las proteínas *HEN4* y *HUA1* interactúan físicamente (Cheng *et al.*, 2003), nos planteamos la posible participación de *PEP* en complejos proteicos compartidos con, al menos, algunos de los otros miembros de la actividad *HUA-PEP*. Razonamos que en un fondo con actividades *HUA1* y *HUA2* intactas, como el de las plantas *35S::PEP*, la homeostasis celular podría tolerar el exceso de *PEP*. Por el contrario, la sobreproducción de *PEP* en ausencia de *HUA1* y *HUA2* (*hua1 hua2*



35S::PEP), comprometería la capacidad de amortiguación del sistema, posiblemente perturbando equilibrios estequiométricos entre los productos de los genes *HUA-PEP*. Esta situación conduciría a alteraciones en la regulación de sus genes diana, como *AG*. Es congruente con esta hipótesis el hecho de que las plantas hemicigóticas *hua1 hua2 35S::PEP/+*, con niveles de *PEP* superiores al silvestre pero muy inferiores a los de las plantas *hua1 hua2 35S::PEP*, no muestren los fenotipos florales de estas últimas.

#### IV.2.3.6.- Sobreexpresión de *PEP* en el fondo mutante *hen4 hua1*

En un intento de reforzar la hipótesis formulada en la sección anterior, decidimos sobreexpresar *PEP* en el fondo doble mutante *hen4 hua1*. Como quedó reflejado en la sección IV.2.2.3, las flores *hen4 hua1* son esencialmente silvestres (Cheng *et al.*, 2003; esta Tesis). En cambio, los individuos *hen4 hua1 pep-4/+* muestran rasgos inequívocos de debilitamiento de la función floral C en estambres y carpelos (sección IV.2.2.3). De ser cierta nuestra presunción, la sobreexpresión de *PEP* en el fondo mutante *hen4 hua1* podría conducir a la aparición de anomalías similares a las registradas en otras combinaciones, como *hua1 hua2 35S::PEP*. Esta sospecha se vio debidamente confirmada tras el examen de las plantas *hen4 hua1 35S::PEP*.



**Figura 59.-** Fenotipos del mutante *hen4 hua1 35S::PEP*. **A)** y **B)** Flores con transformaciones petaloides en todos sus órganos del tercer verticilo y fenotipo de “flor dentro de flor”. **C)** Pistilo con un estilo y un estigma muy reducidos, del que se ha retirado una valva extra pudiéndose observar nuevos órganos florales en su interior. **D)** Pistilo carente de estilo y estigma residual, con valvas supernumerarias separadas en su porción apical y con morfología sepaloide. **E)** Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie abaxial de una valva, con células gigantes típicas de sépalo. Barras de escala: 1 mm (A, B, C y D) y 100  $\mu$ m (E).

Las flores de los triples homocigotos *hen4 hua1 35S::PEP* muestran de nuevo toda la variedad de rasgos que venimos describiendo a lo largo de esta memoria. Así, todas las flores presentan transformaciones petaloides de distinta consideración en el

tercer verticilo, casi siempre intermedias o severas (Fig. 59 A). De hecho, este mutante produce una cantidad ínfima de semillas. A su esterilidad debe contribuir también el elevado grado de transformaciones sepaloideas en el cuarto verticilo (Figs. 59 A-C). Además, en aquellos casos en los que se retienen algunas características carpelares, esto se acompaña de diversos defectos estructurales como reducción de estilo y estigma y fallos de cierre apical (Figs. 59 C y D).

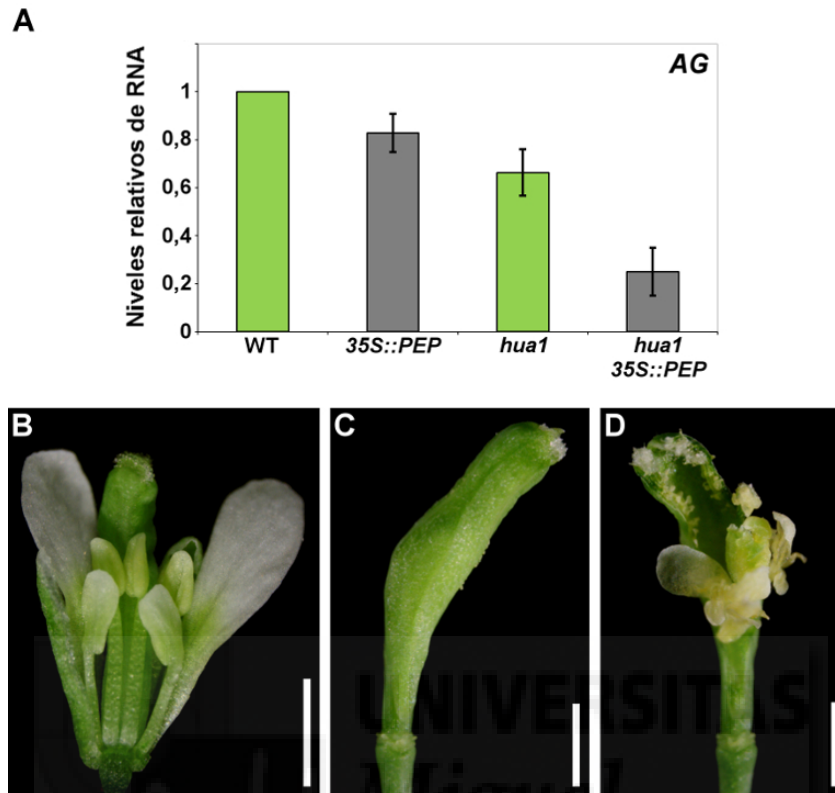
Pero sobre todo, hay que destacar que numerosas flores *hen4 hua1 35S::PEP* (~ 65%) muestran fuertes síntomas de pérdida de determinación del meristemo floral, como el típico fenotipo “flor dentro de flor”, con estructuras florales reiterativas sustentadas por largos ginóforos. La sucesión de verticilos compuestos por sépalos y pétalos claramente recuerda a los alelos mutantes *ag*, aunque también aparecen en estas flores órganos con rasgos carpeloides (Figs. 59). Si bien en el mutante *hen4 hua1 pep-4/+* ya registramos carpelos supernumerarios (sección IV.2.2.3), nunca advertimos este fenotipo, lo que indica que la sobreexpresión de *PEP* en *hen4 hua1* causa un grado de indeterminación floral superior al de su reducción. Esto también es así respecto a las otras características fenotípicas descritas, lo que guarda un paralelismo con lo sucedido en el fondo *hua1 hua2* (sección IV.2.2.5). Nuestros resultados sugieren, por tanto, que los efectos de la sobreexpresión de *PEP* sobre la morfogénesis floral dependen de la integridad relativa de la función *HUA-PEP*.

#### **IV.2.3.7.- Sobreexpresión de *PEP* en el fondo mutante *hua1 ag/+***

La actividad *HUA-PEP* actúa como salvaguarda de los niveles de transcrito efectivo de *AG*. Consideramos que en un fondo heterocigótico *ag/+*, donde la dosis de *AG* está reducida a la mitad, un nivel menor de perturbación de la actividad *HUA-PEP* podría conducir a alteraciones del desarrollo floral derivadas de un nivel de *AG* insuficiente.

Realizamos un ensayo preliminar para ilustrar este supuesto. Mediante qPCR medimos los niveles del mRNA de *AG* en las plantas *35S::PEP*, *hua1* y *hua1 35S::PEP*. Las primeras no difieren significativamente del silvestre, mientras que los individuos *hua1* presentan niveles inferiores como vimos anteriormente (secciones IV.2.2.6 y IV.2.3.2, y Figs. 46 y 56). Todavía menor es el nivel del mRNA de *AG* registrado en las plantas *hua1 35S::PEP* (Fig. 60 A), a pesar de que en ambos casos sus flores son normales, al igual que en las plantas *hua1 ag-12/+* (sección IV.3.5.2 y resultados no mostrados). En cambio, en las plantas *hua1 35S::PEP ag-12/+* observamos nuevamente flores con transformaciones homeóticas y determinación floral defectuosa (estambres petaloideos, pistilos con valvas extra, rasgos sepaloideos,

reducción de estilo, órganos florales internos) lo que hace plausible nuestra interpretación (Figs. 60 B-D).



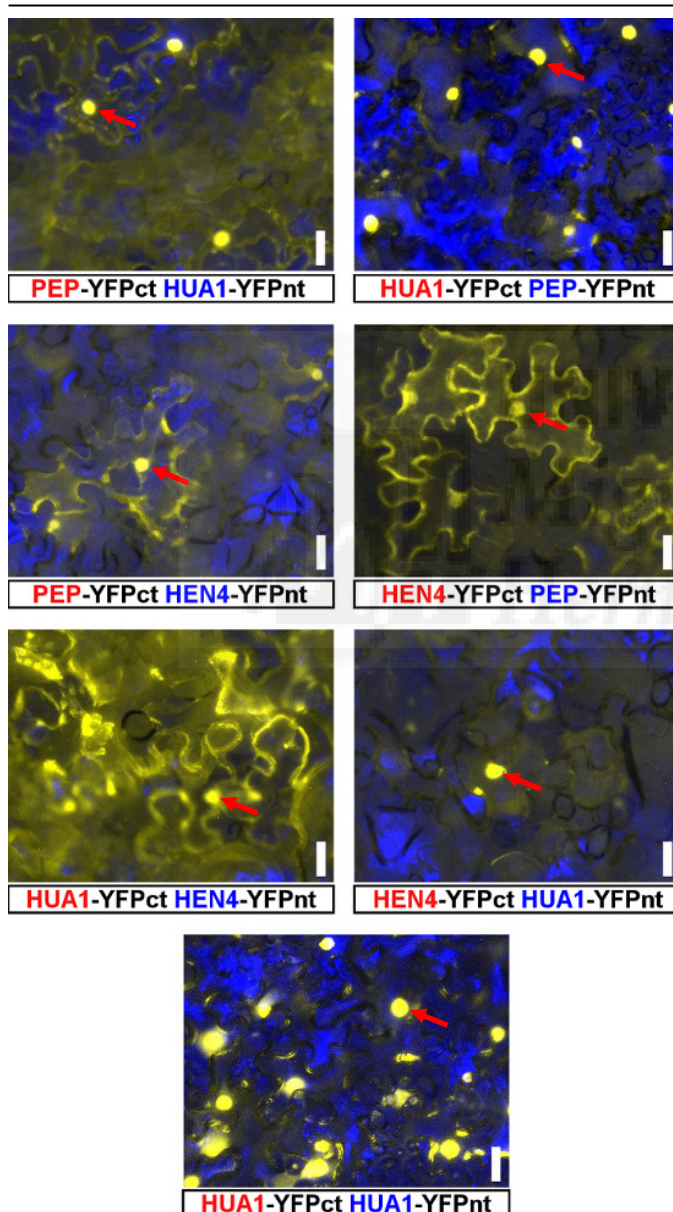
**Figura 60.-** Efecto de la sobreexpresión de *PEP* en un fondo *hua1 ag/+*. **A)** Niveles relativos del mRNA de *AG* en inflorescencias de plantas silvestres (WT) y diversos genotipos mutantes. Barras de error: DE. **B-D)** Fenotipos de flores del sesquimutante *hua1 35S::PEP ag-12/+*. **B)** Flor con estambres con rasgos petaloides en el tercer verticilo. **C)** Pistilo con una gran reducción del estilo y el estigma. **D)** Pistilo abierto manualmente, con nuevos órganos surgiendo en su interior. Barras de escala: 1 mm.

#### IV.2.3.8.- *PEP* interacciona físicamente con *HUA1* y *HEN4*

¿Cómo interacciona molecularmente *PEP* con otros genes de la actividad *HUA-PEP*? Los resultados expuestos en las secciones precedentes son congruentes con la participación de la proteína *PEP* en complejos polipeptídicos comunes con otros componentes de dicha actividad, que también codifican presuntas proteínas de unión a RNA y comparten localización nuclear. Y, como ya se ha indicado, se cuenta con el precedente de *HUA1* y *HEN4*, cuya interacción física ya se ha verificado (Cheng *et al.*, 2003).

Por tanto, decidimos estudiar, mediante ensayos de fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC) si alguna de las proteínas *HUA1* o *HEN4* es capaz de interaccionar físicamente con *PEP*. Para ello procedimos como se describe en la sección IV.1.6, introduciendo las secuencias codificantes de ambos genes en los

plásmidos pBJ36-SPYNE y pBJ36SPYCE (Walter *et al.*, 2004), en la región N-terminal de cada mitad de la YFP. A continuación, se agroinfiltraron con estas construcciones hojas de *Nicotiana benthamiana* junto con las construcciones complementarias de PEP descritas en la sección IV.1.6, para ser observadas mediante microscopía de fluorescencia (ver sección VII.9). Como controles negativos se usaron versiones vacías de los plásmidos pBJ36-SPYNE y pBJ36SPYCE, que no rindieron ninguna señal (no mostrado). Como control positivo se usó la interacción entre HUA1 y HEN4, ya establecida con anterioridad (Fig. 61; Cheng *et al.*, 2003).



**Figura 61.-** La proteína PEP interacciona físicamente con HUA1 y HEN4. Ensayos de detección de la fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC). Imágenes de microscopía de fluorescencia de hojas de tabaco en las que se expresan distintas proteínas de fusión con ambas mitades de la proteína amarilla fluorescente (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*). Todos los ensayos se realizaron en ambos sentidos. En rojo se señalan las proteínas fusionadas a la mitad C-terminal de la YFP, y en azul aquellas proteínas fusionadas a la mitad N-terminal de la YFP. Algunos de los núcleos en los que se aprecia fluorescencia nítida e intensa están indicados con flechas. La autofluorescencia inespecífica de las muestras aparece de color azul. Las fotografías se tomaron a las 72 h de la agroinfiltración. Barras de escala: 40 µm.

La cotransformación transitoria con estas construcciones permitió verificar que PEP interacciona físicamente *in planta* con ambas proteínas (Fig. 61). Una proporción significativa de núcleos de hojas de *Nicotiana benthamiana* cotransformadas con PEP-

YFPct y HUA1-YFPnt o HEN4-YFPnt, o bien PEP-YFPnt junto a HUA1-YFP-ct o HEN4-YFPct, permitió la reconstitución de la YFP y la detección de su señal (Fig. 61). Estos resultados indican que PEP es capaz de formar heterodímeros *in vivo*, tanto con HUA1 como con HEN4, reforzando la idea de que estas proteínas podrían actuar, muy probablemente, formando parte de complejos multiprotéicos comunes. Además, pudimos comprobar que HUA1, como PEP (sección IV.1.6), tiene la capacidad de formar homodímeros (Fig. 61). Por el contrario HEN4 carece aparentemente de esta potencialidad, dado que la cotransformación con HEN4-YFPct y HEN4-YFPnt no rindió señal fluorescente específica alguna (no mostrado).



### **IV.3.- CAPÍTULO 3. LOS GENES *HUA-PEP* REGULAN EL DESARROLLO DE LOS ÓVULOS Y EL GAMETÓFITO FEMENINO**

En favor de una mayor claridad expositiva, se han omitido deliberadamente otras consecuencias fenotípicas de las estirpes mutantes objeto de estudio en esta Tesis y que, entendemos, merecen mención aparte. Se ha indicado la imposibilidad de crear diversas combinaciones mutantes por su inviabilidad, así como la reducida fertilidad e incluso esterilidad de otras, sin analizar sus causas.

Indudablemente y como se muestra en el capítulo 2, las conversiones homeóticas más acentuadas que respectivamente transforman estambres en pétalos o carpelos en sépalos, forzosamente han de reducir la fertilidad. En los gineceos, hemos mostrado otras alteraciones estructurales, como defectos de cierre apical, reducción de tejidos estilar y estigmático, discontinuidad del septum, etc., que, a pesar de no haberse analizado sistemáticamente, a buen seguro que comprometen la polinización y la fertilización.

No obstante, en este capítulo se tratarán alteraciones inherentes al desarrollo de los óvulos, estructuras diploides esporofíticas que albergan el gametófito haploide femenino. Abordaremos estos aspectos, aunque no de forma exhaustiva por tratarse de un esfuerzo preliminar llevado a cabo durante el último periodo de este trabajo. Asimismo, tan sólo se expondrán algunos casos representativos ya que, al igual que respecto a lo tratado en el capítulo anterior, las distintas combinaciones mutantes de los genes *HUA-PEP* tienden a generar consecuencias similares. De hecho, un análisis más pormenorizado de las estirpes *hua-pep* examinadas durante esta Tesis reveló que prácticamente todas ellas presentan una fertilidad disminuida, incluidos algunos mutantes simples que no presentan ningún problema para su propagación (ver más adelante y resultados no mostrados).

#### **IV.3.1.- La actividad *HUA-PEP* controla la identidad de los óvulos**

La disección de gineceos en estirpes como el doble mutante *hua1 pep-4* permitió la observación de defectos en la determinación del meristemo floral, con aparición de nuevos verticilos de órganos florales en el interior del cuarto verticilo (sección IV.2.2.2). Además, se advirtió un nuevo rasgo fenotípico, la conversión homeótica de óvulos en órganos florales (Fig. 62). En este genotipo estas transformaciones aparecen con una frecuencia moderada (20% de las flores examinadas).



El examen de otros genotipos mutantes *hua-pep* permitió comprobar que estos cambios de identidad de órgano son abundantes en *hua1 hua2-7* (40% de las flores examinadas), aunque no tanto como en *hua1 hua2-7 pep-4/+* (93%) y en *hua1 hua2-7 35S::PEP* (100%), donde se observan en la práctica totalidad de las flores. También se detectaron conversiones homeóticas de óvulos en los genotipos *hen4 hua1 hua2/+ pep-4/+*, *hen4 hua2 pep-4/+* y *hen4 hua1 35S::PEP*, donde son abundantes, aunque no se efectuó el recuento correspondiente de manera sistemática. En cambio, no se apreciaron en los mutantes simples, en los dobles mutantes *hen4 hua1* y *hen4 hua2*, ni en las flores *hen4 hua1 pep-4/+* o *hua2 pep-4/+*.

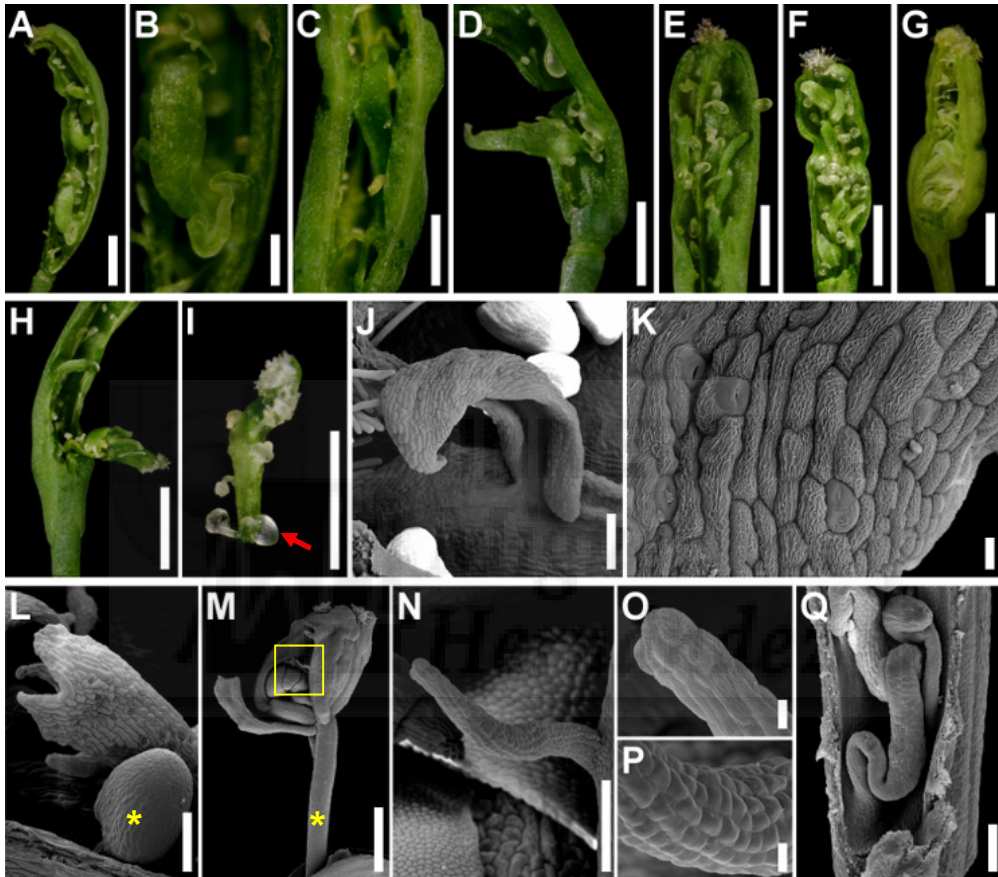
Al margen de su incidencia, los fenotipos observados no difieren entre los distintos genotipos estudiados, por lo que la siguiente descripción es conjunta, basada en los genotipos *hua1 pep-4*, *hua1 hua2-7 pep-4/+* y *hua1 hua2-7 35S::PEP*. En una abrumadora mayoría de los casos, estos órganos manifiestan características que recuerdan rasgos sepaloideos tales como apariencia filoide, extremo distal puntiagudo y blanquecino, presencia de estomas (no exclusivo de sépalos), e incluso células proporcionalmente alargadas o con estrías, etc. (Figs. 62 A-H y J-L). Sin embargo, y aun persistiendo los rasgos sepaloideos, la conversión homeótica da lugar ocasionalmente a órganos también con algunos atributos carpeloideos, como papilas estigmáticas o incluso más raramente óvulos secundarios (Figs. 62 H e I).

Por otro lado, no se habían descrito con anterioridad mutantes o combinaciones mutantes con pérdida de todas las facetas que definen a un óvulo, como son el funículo, los integumentos y la nucela, lo que sugería que quedaban por identificar nuevos factores importantes para la identidad del óvulo (Skinner *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestras estirpes mutantes algunos órganos ectópicos surgen directamente desde el tejido placentario, sin funículo alguno y sin el resto de los rasgos definitorios anteriormente mencionados (Figs. 62 J). No obstante, también es frecuente que aparezcan conectados a la placenta mediante lo que parecen funículos anormalmente largos con histología variable (Figs. 62 N-Q). A menudo presentan una histología funicular normal en su porción proximal, surgiendo de la placenta, dando paso posteriormente a células estriadas (Figs. 62 N-P). A este respecto cabe destacar que también se producen, en lugar de óvulos, protuberancias cilíndricas con estas características tisulares sin dar lugar a ningún tipo de órgano concreto (Fig. 62 N y Q). Estos resultados, en su conjunto, indican claramente que la identidad del óvulo es regulada por la actividad *HUA-PEP*, y subraya su importancia durante el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*.

Experimentos de tinción GUS e hibridación *in situ* indican que *PEP* se expresa en los óvulos (Fig. 27; Ripoll *et al.*, 2006). Además, en un reciente estudio

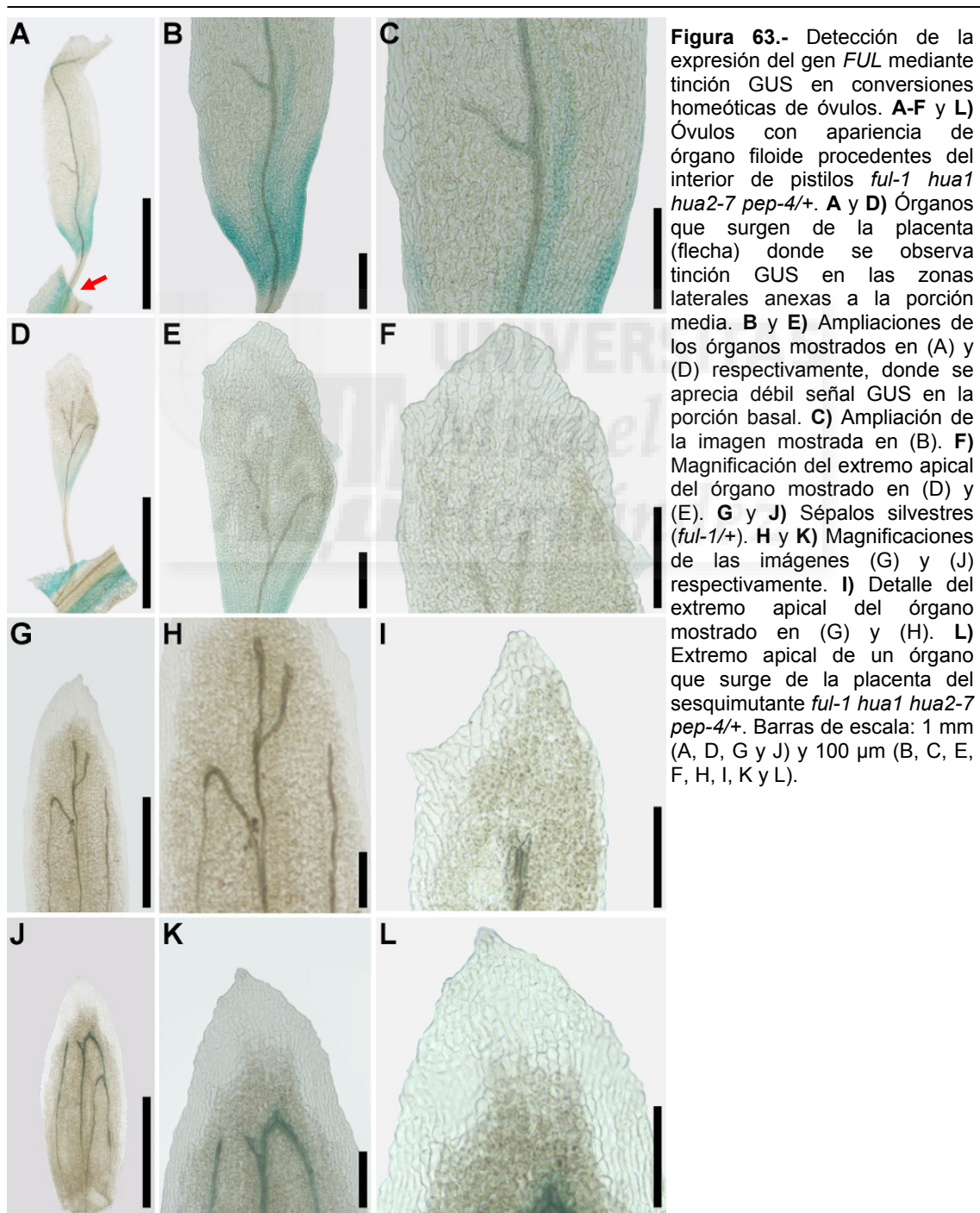


transcriptómico se ha comprobado la expresión en óvulos de los genes *PEP*, *HEN4*, *HUA1* y *HUA2* (Matias-Hernandez *et al.*, 2010), por lo que se podría concebir un papel de la actividad *HUA-PEP* análogo al desempeñado durante la formación de los verticilos florales. Otra cuestión a tener en cuenta es el carácter de las transformaciones homeóticas producidas. A pesar de los rasgos carpeloides en algunas conversiones de óvulos en nuestras combinaciones mutantes *hua-pep*, estimamos que las facetas sepaloideas son manifiestas (Figs. 62 D y 63).



**Figura 62.-** Defectos de la identidad de óvulo en diversos genotipos. **A)** Pistilo *hua1 pep-4* con distintos órganos surgiendo de la placenta. **B)** Magnificación de uno de los órganos mostrados en (A). **C)** Órgano filioide que surge de la placenta de un pistilo *hua1 pep-4*. **D)** Imagen de un órgano ectópico donde se intuye una venación de carácter filioide o sepaloide (*hua1 pep-4*). **E, F y G)** Pistilos en los que se observan óvulos y otras estructuras verdes, con apariencia cilíndrica o foliar, de plantas *hua1 hua2-1 pep-4/+* (E), *hua1 hua2-7 pep-4/+* (F) y *hua1 hua2-7 35S::PEP* (G). **H)** Pistilo *hua1 pep-4* en el que se observa una transformación de un óvulo hacia una estructura cilíndrica con tejido estigmático (flecha). **I)** Órgano extirpado de la placenta de un pistilo *hua1 pep-4*, que presenta óvulos secundarios (flecha) y papilas estigmáticas en su extremo distal. **J-Q)** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). **J)** Órgano muy semejante a un sépalo que surge directamente de la placenta, sin funículo alguno, en un pistilo *hua1 hua2-7 35S::PEP*. **K)** Detalle de las células de la superficie del órgano mostrado en (J), cubiertas con estrías de ceras y con estomas intercalados entre ellas. **L)** Óvulo con fenotipo silvestre (asterisco) y óvulo transformado en un órgano de márgenes picudos y con abundantes estomas, en un pistilo del sesquimutante *hua1 hua2-7 pep-4/+*. **M)** Órganos adicionales que surgen del interior del cuarto verticilo de un pistilo *hua1 hua2-7 35S::PEP*, sustentados por un largo ginóforo (asterisco). **N)** Ampliación de la zona resaltada con un cuadro amarillo en (M), donde se observa un óvulo transformado en una estructura cilíndrica protuberante, cuya superficie celular distal muestra células estriadas (**O**), mientras que en su zona proximal presenta células típicas de funículo (**P**). **Q)** Imagen del interior de un pistilo *hua1 pep-4* con algunos órganos cilíndricos que surgen de su placenta. Barras de escala: 1 mm (A, D, E, F, G, H, I y M), 500  $\mu$ m (B y C), 100  $\mu$ m (J, L, N y Q) y 10  $\mu$ m (K, O y P).

Aprovechando las combinaciones mutantes *hua-pep* en el fondo genético *ful-1* descritas en el apartado IV.2.2.9, decidimos examinar la presencia de conversiones homeóticas de óvulo en supuestos órganos florales en el genotipo *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*. Estas plantas son pródigas en este tipo de alteraciones, comparables a los individuos *hua1 hua2-7 pep-4/+*. De esta manera, podíamos no sólo examinar la morfología de los órganos sino usar también la señal GUS derivada de la expresión del promotor de *FUL* como marcador histológico y contribuir a esclarecer si estos órganos presentan carácter carpeloide, sepaloide o mixto.



Como se muestra en la Fig. 63, algunos de estos órganos recuerdan a hojas o sépalos, unidas por una estructura umbilical al territorio de placenta, evocando a un peciolo foliar más que a un funículo, dado el aspecto global del órgano transformado. La señal GUS se aprecia en el territorio de supuesto ovario, aunque no en lo que parece ser la zona media (Fig. 63 D), lo que sería coherente con la expresión territorial normal de *FUL* (Gu *et al.*, 1998). También se detecta alguna tinción GUS en la zona más basal de dichos órganos, lo que podría interpretarse como un signo de identidad de valva (Fig. 63 B y E). No obstante, dicha actividad GUS se detecta también en una vasculatura conspicua que muestra evidentes ramificaciones, reminiscentes de lo que ocurre en los sépalos (Figs. 63 G, H y J). Igualmente, la histología del ápice de algunos de estos órganos resulta muy similar a la de los sépalos (Figs. 63 F, I y K-L).

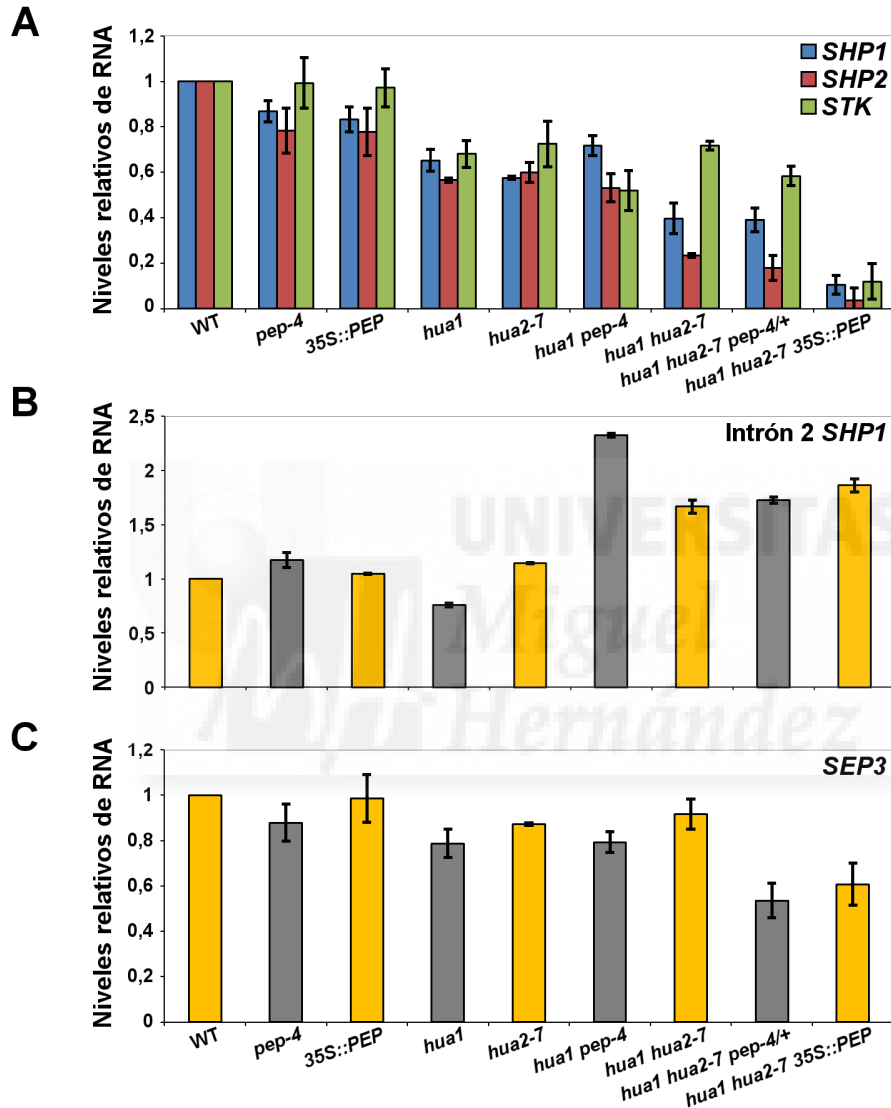
Otros autores han asignado identidad pistilar a órganos ectópicos resultantes de transformaciones homeóticas de óvulos basándose, entre otros criterios, en la aparición y supuesto carácter estilar de células estriadas (Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003). En los auténticos pistilos, la expresión de *FUL* suele persistir en el estilo cuando remite en las valvas (Gu *et al.*, 1998), algo que no se refleja en los órganos ectópicos mostrados en la Fig. 63. Aunque sería conveniente realizar ensayos con marcadores adicionales, nuestros resultados apuntan de nuevo a una orientación sepaloide de estas transformaciones, o de carácter mixto sépalo-carpelo en grado variable.

#### **IV.3.2.- La actividad *HUA-PEP* afecta a la expresión de genes de la función D (identidad de óvulo)**

Los fenotipos mostrados en la sección anterior guardan similitud con los de otras estirpes mutantes anteriormente descritas, como *bel1*, *shp1 shp2 stk*, o *knu*, aunque casi siempre las estructuras generadas en lugar de óvulos se definieron como carpeloides. Se debe tener en consideración que en todos esos mutantes se contaba con una actividad AG intacta (Robinson-Beers *et al.*, 1992; Pinyopich *et al.*, 2003; Payne *et al.*, 2004). Junto a AG, los tres genes MADS-box *SHP1*, *SHP2* y *STK* constituyen un grupo monofilético. Confieren identidad carpelar en ciertos contextos genéticos y promueven conjuntamente la identidad de óvulo (integrantes de la función D; Pinyopich *et al.*, 2003). Por tanto, decidimos examinar su expresión en inflorescencias mediante qPCR.

La expresión neta conjunta de los tres genes tiende a disminuir en todas las combinaciones mutantes *hua-pep* utilizadas, siendo mínimo su nivel en las plantas

*hua1 hua2-7 35S::PEP* (Fig. 64 A), muy consistente con el hecho de que este genotipo sea el más prolijo en conversiones homeóticas de óvulos en órganos florales (sección IV.3.1). La acción de *STK* limita el crecimiento excesivo del funículo (Pinyopich *et al.*, 2003), por lo que su reducción también es coherente con la presencia de funículos más largos de lo normal en algunas de estas estructuras.



**Figura 64.-** Expresión relativa de RNA cuantificada mediante qPCR en inflorescencias silvestres y de distintas estirpes mutantes. **A)** Medida de los mRNA de los genes *SHP1*, *SHP2* y *STK*. **B)** Expresión relativa del mRNA de *SHP1* con secuencias del intrón. 2. **C).** Medida del mRNA de *SEP3*. Barras de error: DE.

Nos planteamos que, dada su similitud estructural, la disminución de la expresión de los genes *SHP* y *STK* en los diferentes mutantes *hua-pep* podría tener un reflejo en la acumulación de transcritos aberrantes como se comprobó en el caso de *AG* (sección IV.2.3.4). Para una verificación preliminar de este supuesto, medimos la cantidad relativa de transcritos del gen *SHP1* con secuencias de su intrón 2, siguiendo



un esquema equivalente al adoptado para el gen *AG* (sección IV.2.3.4 y Materiales y Métodos). Aunque en los mutantes simples no detectamos cambios importantes, en combinaciones de orden superior sí se observó un incremento de entre 1,5 y 2 veces los valores silvestres (Fig. 64 B), sugiriendo que el mantenimiento del mRNA efectivo de estos genes podría ser similar al de *AG*.

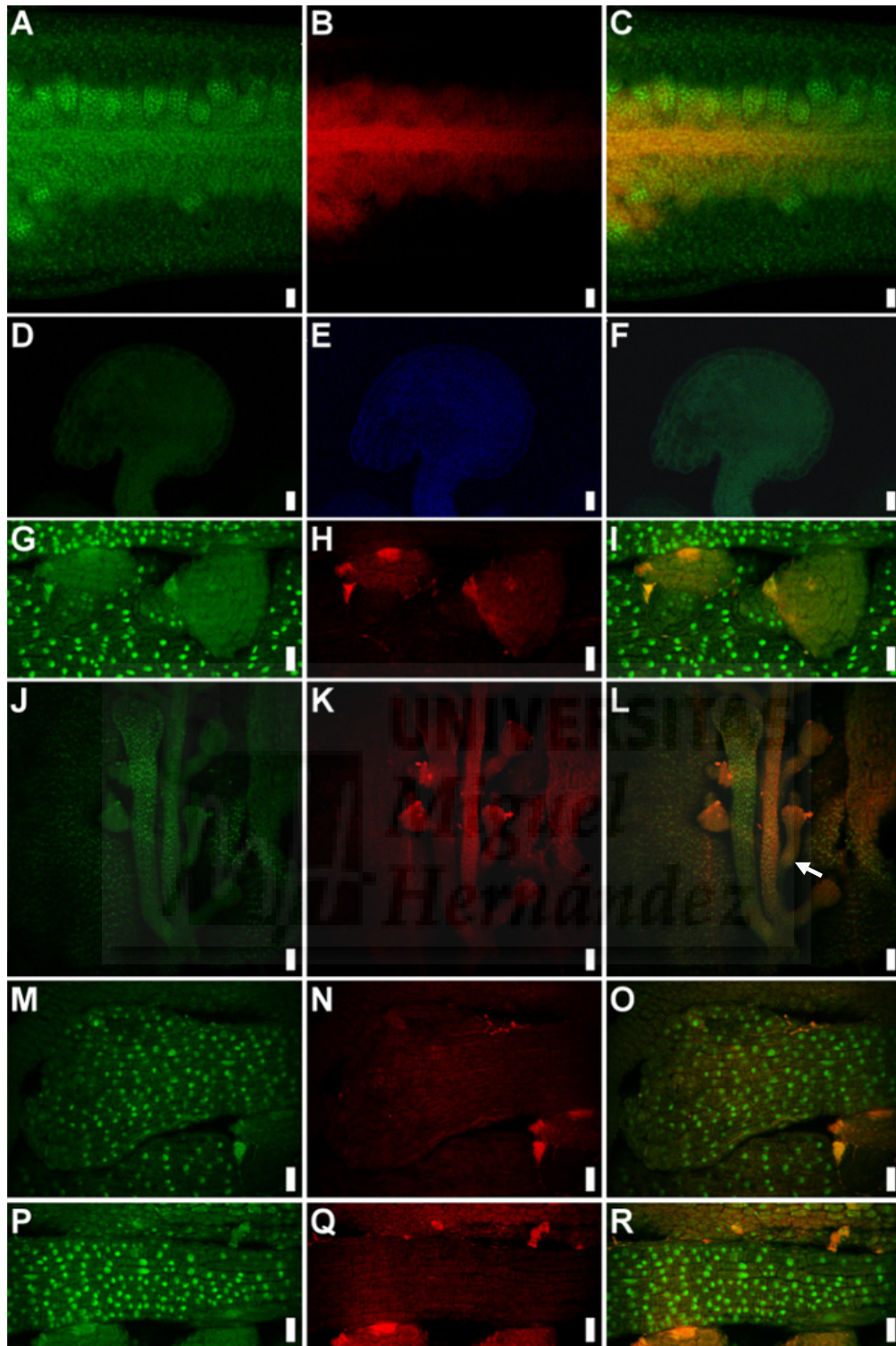
En experimentos de interacción física en levaduras, se demostró que las proteínas STK, SHP1, SHP2 y *AG* no pueden interaccionar entre sí, sino que requieren de la presencia de *SEP3* para generar complejos de orden superior (Favaro *et al.*, 2003; Bataglia *et al.*, 2009). Además, las combinaciones múltiples de mutantes *sep* también provocan pérdida de identidad de óvulo (Favaro *et al.*, 2003). Por tanto, medimos también la expresión de *SEP3* en nuestros mutantes, constatando una clara disminución en las estirpes *hua1 hua2-7 pep/+* y *hua1 hua2-7 35::PEP*. (Fig. 64 C).

En resumen, estos resultados favorecen la interpretación de que la perturbación de la actividad *HUA-PEP* afecta la identidad de los óvulos mediante la alteración de la expresión de los genes MADS-box implicados en el proceso. La disminución de sus actividades conduciría a una transformación de carácter sepaloide o con carácter mixto sépalo-carpelo, dado que el remanente de actividad *AG* podría ser responsable de la no conversión total de los óvulos en sépalos y la aparición de rasgos pistilares.

#### **IV.3.3.- Expresión de *AP1* en óvulos *hua1 pep***

La placenta y los óvulos sólo se forman en el contexto de la identidad carpelar. Por tanto, si la actividad *HUA-PEP* mantiene los niveles de *AG*, el cual promueve la formación de todas las estructuras del gineceo (Ferrándiz *et al.*, 1999), el efecto de las mutaciones *hua-pep* sobre los óvulos podría ser indirecto. No obstante, la persistente expresión de *AG* en la placenta y en los óvulos silvestres, así como distintas evidencias genéticas, indican que *AG*, junto a los genes de función D, contribuye específicamente a la formación de los óvulos (Figs. 65 A-C; Western y Haughn, 1999; Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003; Skinner *et al.*, 2004; Urbanus *et al.*, 2009).

Consideramos, pues, el principio de mutua exclusión de las funciones A y C durante la adquisición de identidad de los órganos florales. De manera similar, la retracción o debilitamiento de la actividad *AG* en la placenta y los óvulos podría dar lugar a la expansión de la actividad A en estos territorios, contribuyendo a la transformación de los óvulos en órganos sepaloideos o de características mixtas sépalo-carpelo.



**Figura 65.-** Detección de las proteínas AG-GFP y AP1-GFP en plantas silvestres y dobles mutantes *hua1 pep-4*, mediante microscopía confocal. **A), B) y C)** Señal de AG-GFP en los óvulos y la placenta de un pistilo silvestre. **D), E) y F)** Ausencia de la fluorescencia de AP1-GFP en un óvulo silvestre. **G), H) e I)** Óvulos del doble mutante *hua1 pep-4* con señal de AP1-GFP localizada en los núcleos. **J), K) y L)** Señal de AP1-GFP en los funículos (flecha) y en un presunto órgano floral que surge de la placenta de un pistilo *hua1 pep-4*. Ampliaciones de la porción apical (**M, N y O**) y basal (**P, Q y R**) de la estructura mostrada en J, K y L, donde se observa la fluorescencia de AP1-GFP en todas las células. Detección de la GFP (A, D, G, J, M, P), autofluorescencia (B, E, H, K, N, Q), imágenes combinadas (C, F, I, L, O, R). La autofluorescencia de la muestra se destaca arbitrariamente en azul o en rojo. Barras de escala: 25  $\mu$ m (A, B, C, J, K y L) y 10  $\mu$ m (D, E, F, G, H, I, M, N, O, P, Q y R).

Para sustentar esta idea, estudiamos la expresión de la proteína de fusión AP1-GFP (Urbanus *et al.*, 2009) en el silvestre y en el fondo mutante *hua1 pep-4*. Como cabría esperar, en pistilos y óvulos silvestres no se detecta señal específica alguna, al igual que en muchos gineceos *hua1 pep-4* con aspecto relativamente silvestre (Figs. 65 D-F y datos no mostrados). En cambio, en otros gineceos *hua1 pep-4* detectamos una potente y nítida señal fluorescente en núcleos de zonas de placenta y en óvulos, lo que encaja con nuestra hipótesis (Figs. 65 G-L).

No obstante, la mayoría de los óvulos *hua1 pep-4* con señal de AP1-GFP muestran morfologías reconocibles como tales (Figs. 65 G-I), aunque no se puede establecer si afecta a su funcionalidad. Las flores *hua1 pep-4* muestran diversidad de fenotipos, desde gineceos con aspecto relativamente silvestre hasta otros visiblemente alterados o transformados (ver sección IV.2.2.2). En estos últimos, además de una señal fluorescente de AP1-GFP más fuerte, es más fácil localizar defectos de identidad de óvulos. Así, en las Figs. 65 J-L se muestra una conversión homeótica de óvulo en un órgano de apariencia foliar en su porción distal, conectado a la placenta a través de un funículo. Resulta muy destacable la señal nítida e intensa de AP1-GFP en los núcleos de las células de este órgano, incluyendo las del funículo que contactan con la placenta, donde también se observa una señal conspicua. Se observan células con gran heterogeneidad de tamaño y disposición irregular (Figs. 65 M-R).

Estos resultados, además de apoyar la orientación hacia sépalo de las conversiones homeóticas, confirman nuestra suposición y suponen un apoyo firme a la idea de que el antagonismo entre las funciones A y C también pudiera desempeñar un papel crítico en la correcta adquisición de identidad de los óvulos.

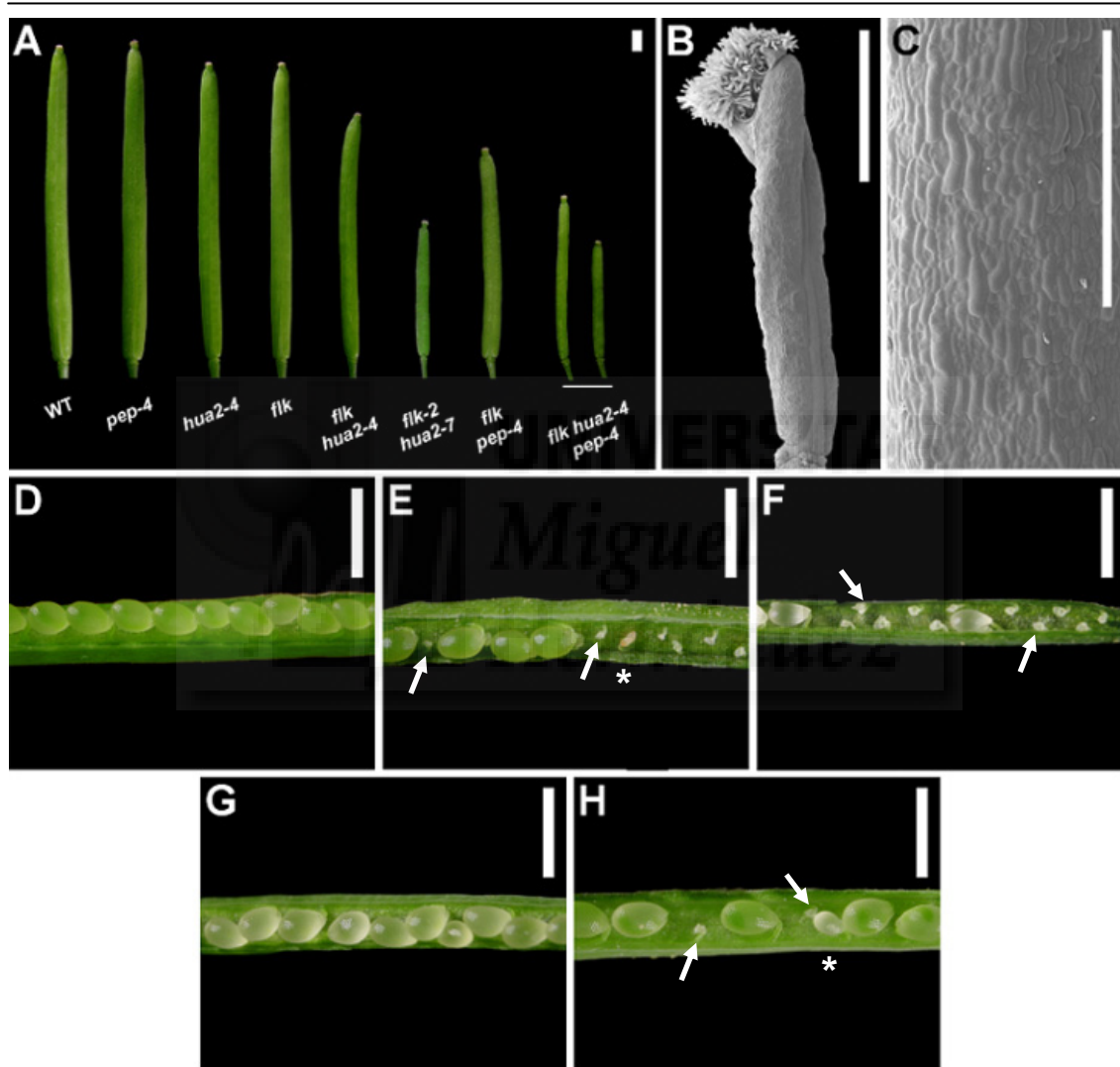
#### **IV.3.4.- *FLK*: un nuevo integrante de la actividad *HUA-PEP***

El gen *FLK* antagoniza la acción de *PEP* y *HUA2* durante la regulación de la transición floral (Ripoll *et al.*, 2009; esta Tesis). Sin embargo, otras evidencias experimentales indican que *FLK* y *PEP* actúan en la misma dirección en otros procesos del desarrollo de *Arabidopsis* (ver más adelante). Además, entre los genes representados en el transcriptoma del óvulo de *Arabidopsis* también se detectó la expresión de *FLK* (Matias-Hernandez *et al.*, 2010). Estos hechos nos indujeron a explorar un posible papel de *FLK* en el desarrollo de los óvulos, en conjunción o en oposición a los integrantes de la actividad *HUA-PEP*.



#### IV.3.4.1.- *FLK* actúa junto a *PEP* y *HUA2* regulando el desarrollo de los óvulos

Inicialmente, decidimos estudiar las posibles interacciones de *FLK* con *PEP* y *HUA2*. Dado que nuestro alelo *hua2* de referencia (*hua2-7*) no se puede combinar en homocigosis con *pep* (sección IV.2.2.4), incluimos también *hua2-4* en nuestro análisis. A tal fin, examinamos cada mutante simple, así como los dobles, el triple mutante *flk hua2-4 pep-4* y el sesquimutante *hua2-7 pep-4/+*.



**Figura 66.-** Fenotipos en el fruto provocados por la interacción de mutaciones *flk*, *hua2* y *pep*. **A)** Frutos silvestres (WT) y de diversas estirpes mutantes. En todos los casos se muestran los frutos de mayor tamaño en el momento de su recogida. Los frutos fotografiados son representativos de cada genotipo excepto para las silicuas *flk hua2-7* y *flk hua2-4 pep-4*, en cuyos casos suelen ser menores que los ejemplos mostrados en la figura. **B)** Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de un pistilo *flk hua2-4 pep-4* abierto en la zona apical. **C)** Detalle de la superficie abaxial de una valva del pistilo mostrado en (B), con cierta heterogeneidad celular. **D-H)** Secciones representativas de frutos de distintos genotipos de los que se ha eliminado una valva. **D)** Fruto silvestre. **E)** Fruto del doble mutante *flk hua2-4*. **F)** Fruto del triple mutante *flk hua2-4 pep-4*. **G)** Fruto del mutante simple *hua2-7*. **H)** Fruto del sesquimutante *hua2-7 pep-4/+*. Algunos abortos de óvulos (pequeños rudimentos blancos que se corresponden con los huecos sin semillas) están indicados con flechas, y los abortos de semillas (de color marrón o amarillento, y menores que una semilla normal) con asteriscos. Barras de escala: 1 mm (A, B, D, E, F, G y H) y 200  $\mu$ m (C).

Advertimos importantes diferencias en la longitud de las silicuas entre los distintos genotipos estudiados. Los frutos de los cuatro mutantes simples *pep-4*, *hua2-4*, *hua2-7* y *flk* alcanzaron tamaños equivalentes a los de las plantas silvestres Col-0 de la misma edad, mientras que los frutos *flk hua2-4* y *flk pep-4* eran más cortos (Fig. 66 A y datos no mostrados). Sin embargo, el triple mutante *flk hua2-4 pep-4* aún generó silicuas mucho más cortas y delgadas (Fig. 66 A). En algunos casos, pudimos detectar en este genotipo alteraciones del pistilo comentadas con anterioridad, como apertura apical, estilo reducido y disposición irregular de las células del ovario (Figs. 66 B y C). Merece la pena destacar que las silicuas del doble mutante *flk hua2-7*, también incluido en este ensayo, son más cortas que las de las plantas *flk hua2-4*, y comparables a los frutos *flk hua2-4 pep-4*, reflejando claramente la distinta fuerza de ambos alelos *hua2* (Fig. 66 A). Se permitió que las plantas completaran su ciclo y se secaran completamente antes de recolectar su progenie, verificando entonces importantes variaciones entre distintos genotipos en la producción de semillas por planta. *Grosso modo*, mientras que la cantidad de semillas producidas por los mutantes simples no difirió sustancialmente del silvestre, algunos mutantes de orden superior fueron notoriamente más parcios en su producción, particularmente el doble *flk hua2-7* y el triple mutante *flk hua2-4 pep-4*, como claro signo de su reducida fecundidad (no mostrado).

La disección de las silicuas durante la maduración reveló que contenían menos semillas, principalmente debido a la presencia de óvulos abortados. Éstos aparecen como pequeños cuerpos blancos en espacios vacíos, lo que indica una interrupción de su desarrollo (Figs. 66 D-H; Tabla 4). También aparecen abortos de semilla, aunque en mucha menor proporción (Figs. 66 E y H; Tabla 4). Además, como era previsible, se observó una considerable variación entre los distintos genotipos (Figs. 66 D-H; Tabla 4). En el silvestre y los mutantes simples *hua2*, la incidencia de óvulos abortados es muy escasa (Figs. 66 D y G; Tabla 4), mientras que en silicuas de plantas *pep-4* o *flk* éstos suponían entre un 10 y un 15% de todo el recuento de óvulos/semillas. Resulta interesante que el doble mutante *flk pep-4* no muestre un aumento importante respecto a cualquiera de los dos mutantes simples. Sin embargo, la incidencia de óvulos abortados se incrementó abruptamente en los dobles mutantes *hua2-4 pep-4* (45%) y *flk hua2-4* (33%), siendo extraordinariamente elevada en las plantas *flk hua2-4 pep-4* (77%; Tabla 4). Este efecto sinérgico contrasta sorprendentemente con los valores silvestres de los mutantes simples *hua2*, quizá indicativo de cierto solapamiento funcional entre *HUA2* de un lado, y una actividad genética representada por *PEP* y *FLK*, por otro. En consonancia con esta idea, la proporción de óvulos abortados aumentó excepcionalmente cuando *flk* se combinó con

el alelo más fuerte *hua2-7* (77% frente a un 33% en *flk hua2-4*), resaltando de nuevo la diferencia entre ambos alelos *hua2* (Tabla 4).

GENOTIPOS	Semillas	Óvulos abortados	Semillas abortadas (%)	% óvulos abortados	Nº de plantas
<b>Col-0</b>	677	22	2 (0,3)	3,1	7
<b><i>pep-4</i></b>	817	100	5 (0,6)	10,8	4
<b><i>hua2-4</i></b>	240	9	0 (0)	3,6	4
<b><i>hua2-7</i></b>	495	20	1 (0,2)	3,9	4
<b><i>flk</i></b>	419	90	4 (0,9)	15,4	4
<b><i>flk pep-4</i></b>	470	44	2 (0,4)	8,1	5
<b><i>flk hua2-4</i></b>	423	210	2 (0,5)	33,1	3
<b><i>flk-2 hua2-7</i></b>	96	324	1 (1)	76,9	3
<b><i>hua2-4 pep-4</i></b>	281	242	12 (4,1)	45,2	6
<b><i>hua2-7 pep-4/+</i></b>	214	273	31 (12,7)	53	5
<b><i>flk hua2-4 pep-4</i></b>	122	533	14 (10,3)	77,5	5

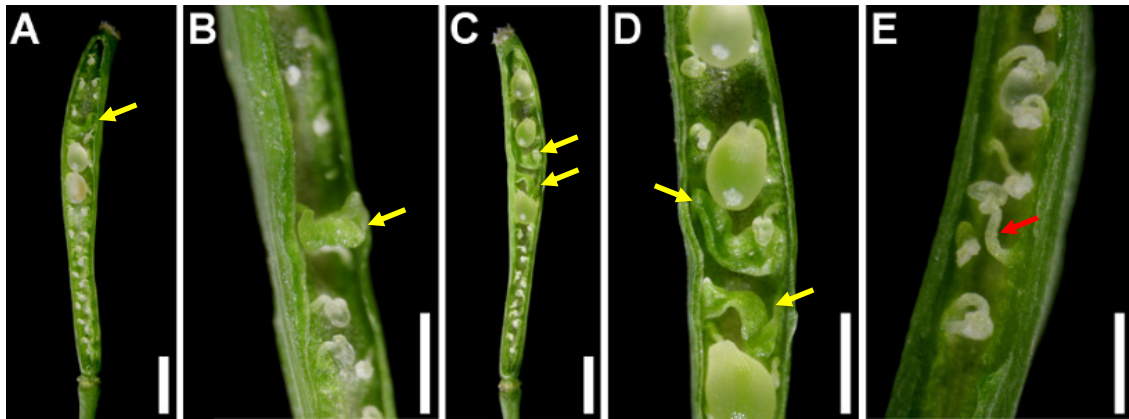
**Tabla 4.-** Abortos de óvulos y semillas en combinaciones mutantes entre *flk*, *hua2* y *pep*. Se analizaron al menos 9-10 silicuas por cada genotipo, excepto del mutante simple *hua2-4*, donde el recuento fue sobre 5 frutos.

La inviabilidad del doble homocigoto *hua2-7 pep-4* impide una comparación directa con el fondo mutante *flk hua2-7*. Pero incluso así, las silicuas del sesquimutante *hua2-7 pep-4/+* mostraron una proporción sorprendentemente alta de óvulos fallidos (53%; Fig. 66 H; Tabla 4), indicativo de una gran sensibilidad del fondo genético *hua2* frente a la dosis de *PEP*. En resumen, estos resultados muestran que una interrupción en el desarrollo de los óvulos es la principal causa de la fertilidad reducida en las estirpes mutantes analizadas y, por consiguiente, identifica a ambas proteínas KH, PEP y FLK, así como a HUA2, como elementos clave en este proceso.

#### IV.3.4.2.- *FLK* también afecta a la adquisición de identidad de óvulo

Durante el análisis de las combinaciones mutantes entre *flk*, *pep* y *hua2*, reseñadas en la sección anterior, descubrimos también casos de transformaciones homeóticas de óvulo. Éstas se observaron únicamente en el triple mutante *flk hua2-4 pep-4* (Fig. 67), nunca en *hua2-4 pep-4* o *hua2-7 pep-4/+*. Se debe indicar que la aparición de defectos de identidad de óvulo en *flk hua2-4 pep-4* es menos abundante que en los genotipos citados en la sección IV.3.1 En cualquier caso, como sucede en las conversiones de óvulo anteriormente descritas, los órganos resultantes parecen tener aspecto sepaloide o mixto carpelo-sépalo (Figs. 67 B y D). Estas observaciones apuntan a que

el gen *FLK* ejerce algún tipo de función que, no sólo es importante para la progresión normal del desarrollo del óvulo sino ya para la especificación de su identidad como órgano.



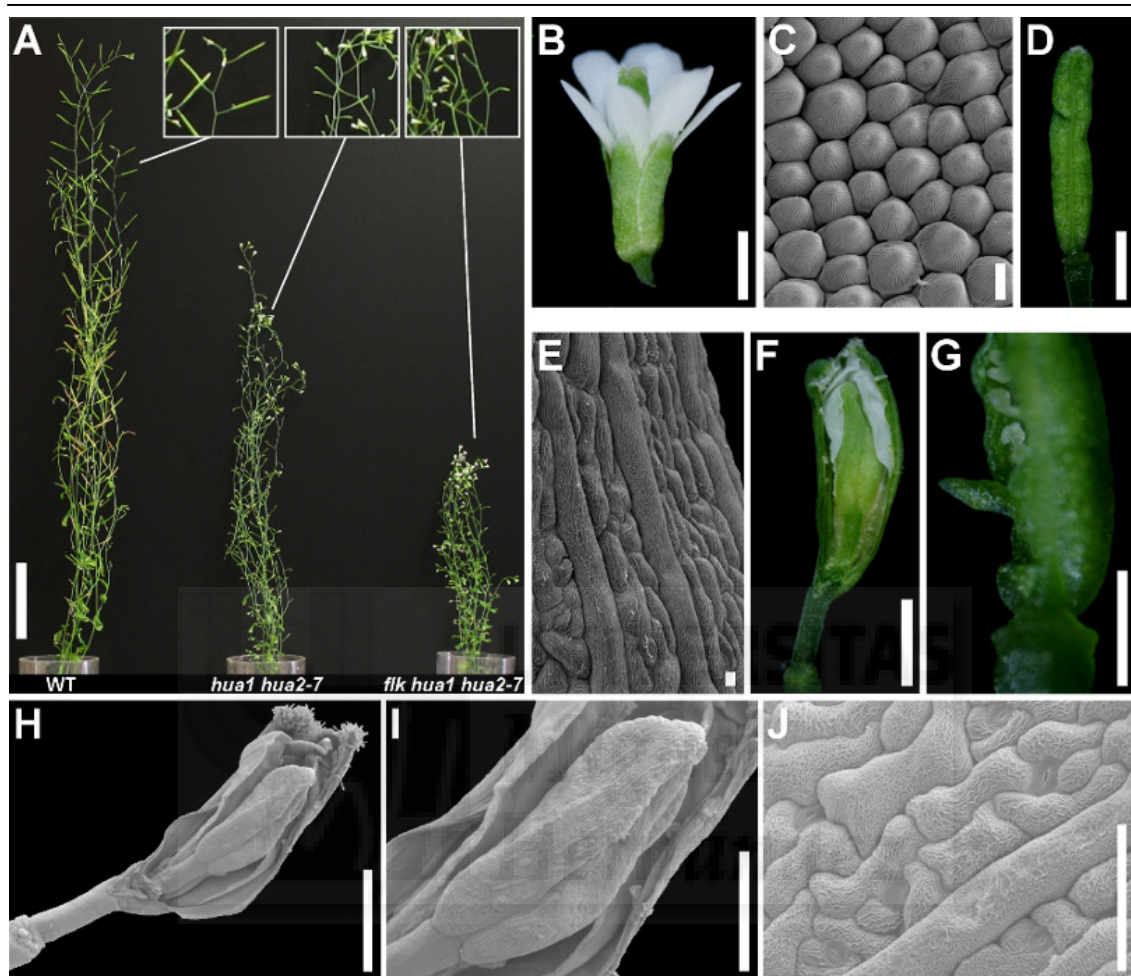
**Figura 67.-** Fenotipos de pérdida de la identidad de óvulo en el triple mutante *flk hua2-4 pep-4*. **A), B), C) y D)** Pistilos en el que uno o más de los óvulos se ha transformado en un órgano verde de morfología cilíndrica o filoide (flechas amarillas). **(D)** es una magnificación de **(C)**. **E)** Interior de un pistilo donde los óvulos no han sufrido transformaciones homeóticas, pero se observan algunos funículos más largos que los silvestres (flecha roja). Barras de escala: 1 mm (A y C) y 500  $\mu$ m (B, D y E).

#### IV.3.4.3.- El triple mutante *flk hua1 hua2* revela funciones de *FLK* en la morfogénesis floral

Con la intención de corroborar el carácter de *FLK* como presunto integrante de la actividad *HUA-PEP*, decidimos estudiar también si su falta de función tiene algún efecto en el desarrollo floral. Ya que *flk* carece de fenotipos morfológicos externos en la flor como mutante simple, analizamos su impacto en el fondo *hua1 hua2*. A diferencia de lo que sucede con la mutación *pep-4* (sección IV.2.2.2), el doble *flk hua1* no mostró ningún fenotipo aparente de consideración y se pudo construir el triple homocigoto mutante *flk hua1 hua2-7* sin dificultad. Sin embargo, éste presentó unas características fenotípicas muy interesantes. Las plantas *flk hua1 hua2-7* alcanzaron una estatura muy inferior al silvestre y al doble mutante *hua1 hua2-7* (Fig. 68 A), en consonancia con la reducción del porte vegetativo que tiene lugar con la acumulación de mutaciones *hua-pep* (Cheng *et al.*, 2003; datos sin publicar de nuestro laboratorio).

Pero un atributo muy conspicuo de las plantas *flk hua1 hua2-7* es la presencia de transformaciones petaloides muy severas en todas sus flores, afectando a la totalidad de los órganos del tercer verticilo, de manera que presentan dos conjuntos de pétalos y carecen de estambres (Figs. 68 B y C). A este respecto, esto supone un incremento muy fuerte del fenotipo mostrado por las plantas *hua1 hua2-7* (ver Tabla 2

en sección IV.2.2.5). Por tanto, no resultó sorprendente que los individuos *flk hua1 hua2-7* fueran estériles y hubiera que propagarlos a partir de un progenitor *flk hua1 hua2-7/+*.



**Figura 68.-** Fenotipos del triple mutante *flk hua1 hua2-7*. **A)** Porte de plantas de 51 días representativas de los genotipos señalados en la imagen. En los cuadros de arriba a la derecha se muestra una ampliación de los tallos de cada una de las plantas. **B-G)** Diversos fenotipos florales del triple mutante *flk hua1 hua2-7*. **B)** Flor del triple mutante *flk hua1 hua2-7* cuyos órganos del tercer verticilo tienen identidad de pétalo. **C)** Fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie adaxial de un órgano del tercer verticilo, con células cónicas típicas de pétalo. **D)** Pistilo con una gran reducción del estilo y el estigma. **E)** Imagen de SEM de la superficie abaxial de una valva, con células gigantes y estrías epicuticulares de ceras. **F)** Pistilo con un ginóforo alargado al que se ha eliminado una valva, dejando al descubierto nuevos verticilos de órganos florales que reproducen las mismas características que el anterior. **G)** Óvulo que ha sufrido una transformación homeótica hacia un órgano de tipo filioide. **H)** Imagen de SEM del pistilo mostrado en (F). **I)** Ampliación de los órganos que surgen del centro del pistilo mostrado en (H). **J)** Detalle de la superficie de los órganos del panel (I), cuyas células recuerdan a un sépalo silvestre. Barras de escala: 10 mm (A), 1 mm (B, D, F y H), 10  $\mu$ m (C y E), 500  $\mu$ m (G y I) y 50  $\mu$ m (J).

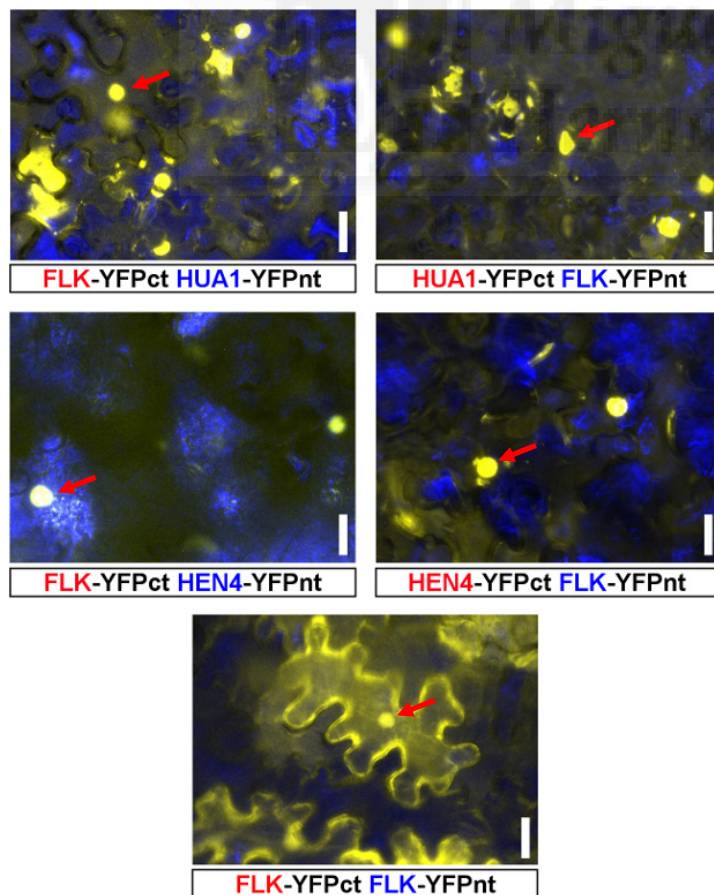
La carencia de polinización, por tanto, podría contribuir a explicar el reducido tamaño de los gineceos. No obstante, una inspección más detallada de éstos reveló también importantes perturbaciones en su morfología. En los supuestos gineceos detectamos el conjunto de alteraciones habituales en otras combinaciones mutantes *hua-pep* expuestas a lo largo de este trabajo, como son defectos de cierre apical,



reducción de estilo y estigma, células gigantes y estriadas y presencia de órganos supernumerarios (Figs. 68 D y E; ver capítulo 2). Lo más definitorio, sin embargo, fue la presencia de flores adicionales dentro del cuarto verticilo, reproduciendo los rasgos anteriores (Figs. 68 F y H-J tal). Como se indicó (sección IV.2.2.5), las flores *hua1 hua2-7* no muestran este fuerte síntoma de indeterminación del meristemo floral, por lo que resulta patente la contribución de la mutación *flk* al debilitamiento de la función C.

#### IV.3.4.4.- Interacción física de FLK con proteínas HUA-PEP (HUA1 y HEN4)

*FLK* interacciona genéticamente con *PEP* y *HUA2* durante el desarrollo de los óvulos. Además, la proteína *FLK* interacciona físicamente con *PEP* (sección IV.1.6), que a su vez interacciona con los productos *HUA1* y *HEN4* (sección IV.2.3.8). Estos resultados encajan con la concepción de que *FLK* pueda ser considerado un nuevo elemento de la actividad *HUA-PEP*. De ahí que decidiéramos explorar la posibilidad de que *FLK* también establezca interacciones proteína-proteína con *HUA1* y *HEN4*. Con este fin realizamos nuevamente experimentos BiFC en células de *Nicotiana benthamiana*.



**Figura 69.-** La proteína *FLK* interacciona físicamente con *HUA1* y *HEN4*. Ensayos de detección de la fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC). Imágenes de microscopía de fluorescencia de hojas de tabaco en las que se expresan distintas proteínas de fusión con ambas mitades de la proteína amarilla fluorescente (YFP, *Yellow Fluorescent Protein*). Todos los ensayos se realizaron en ambos sentidos. En rojo se señalan las proteínas fusionadas a la mitad C-terminal de la YFP, y en azul aquellas proteínas fusionadas a la mitad N-terminal de la YFP. Algunos de los núcleos en los que se aprecia fluorescencia nítida e intensa están indicados con flechas. La autofluorescencia inespecífica de las muestras aparece de color azul. Las imágenes se tomaron a las 72 h de la agroinfiltración. Barras de escala: 40 µm.

Al igual que en casos anteriores (secciones IV.1.6 y IV.2.3.8), los experimentos de BiFC se llevaron a cabo en ambas orientaciones, cotransformando transitoriamente las hojas de *Nicotiana benthamiana* con las construcciones que expresan FLK-YFPct o FLK-YFPnt (sección IV.1.6) junto a las respectivas construcciones complementarias de HUA1 o HEN4 (sección IV.2.3.8). Utilizamos los mismos controles positivos y negativos que en las secciones IV.1.6 y IV.2.3. Confirmando nuestra presunción, comprobamos que FLK interacciona *in vivo* con HEN4 y aún más sólidamente con HUA1 (Fig. 69). La capacidad de FLK de formar heterodímeros *in planta*, tanto con HUA1 como con HEN4, avala la validez de incluir a *FLK* entre los genes *HUA-PEP*. Asimismo, verificamos que FLK también puede formar homodímeros *in vivo* (Fig. 69), como PEP y HUA1 (secciones IV.1.6 y IV.2.3.8).

### **IV.3.5.- La actividad *HUA-PEP* y la viabilidad del gametófito femenino**

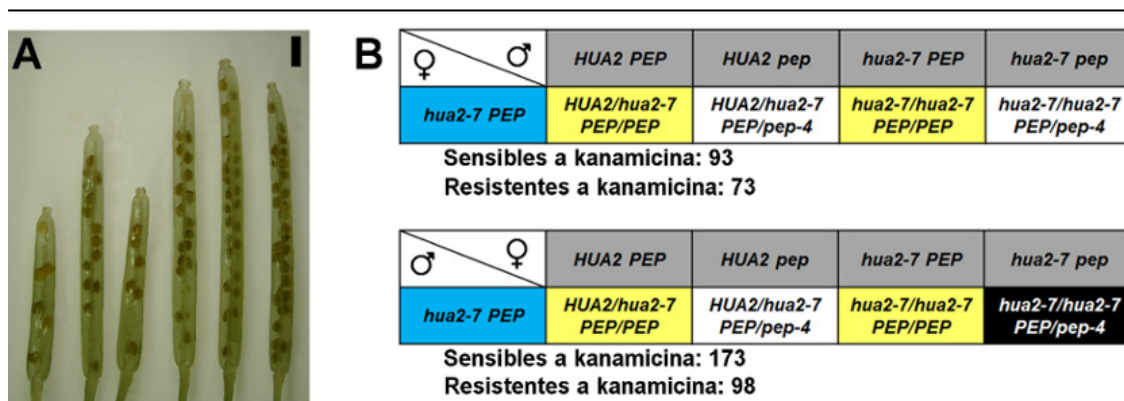
#### **IV.3.5.1.- *PEP* y *HUA2* desempeñan funciones cruciales para el desarrollo del gametófito femenino**

En las angiospermas, los gametos femeninos se generan mediante la formación de un gametófito multicelular haploide (el saco embrionario) rodeado por tejido diploide esporofítico, los integumentos del óvulo. La coordinación entre ambos tipos de tejido es fundamental para su fertilidad (Chevalier *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2013). A partir de nuestro análisis de los genes *FLK*, *HUA2* y *PEP* respecto al desarrollo de los óvulos (sección IV.3.4.1), no se puede distinguir entre un defecto gametofítico y un defecto en los tejidos maternos que pudiera interferir con el desarrollo del saco embrionario. Ello es debido a que todas las estirpes analizadas eran homocigóticas, compartiendo ambos tipos de tejido (gametofítico y esporofítico) los mismos genotipos. La única excepción la constituye el sesquimutante *hua2-7 pep-4/+*, por lo que lo usamos para discriminar entre ambas posibilidades y obtener más información acerca del papel de estos genes durante el desarrollo reproductivo.

Como se ha indicado, *hua2-7* y *pep-4* representan alelos nulos que imposibilitan la obtención del doble homocigoto mutante *hua2-7 pep-4*. Inicialmente analizamos mediante genotipado molecular (Materiales y Métodos) la progenie de plantas segregantes *hua2-7 pep-4/+* como fuente potencial de dobles mutantes. Repararnos en que, además de la reducción de fertilidad en relación con los óvulos (Fig. 66 H, Tabla 4), la letalidad cigótica no podía explicar las desviaciones observadas en las proporciones mendelianas esperables, ya que se observaban proporciones próximas a

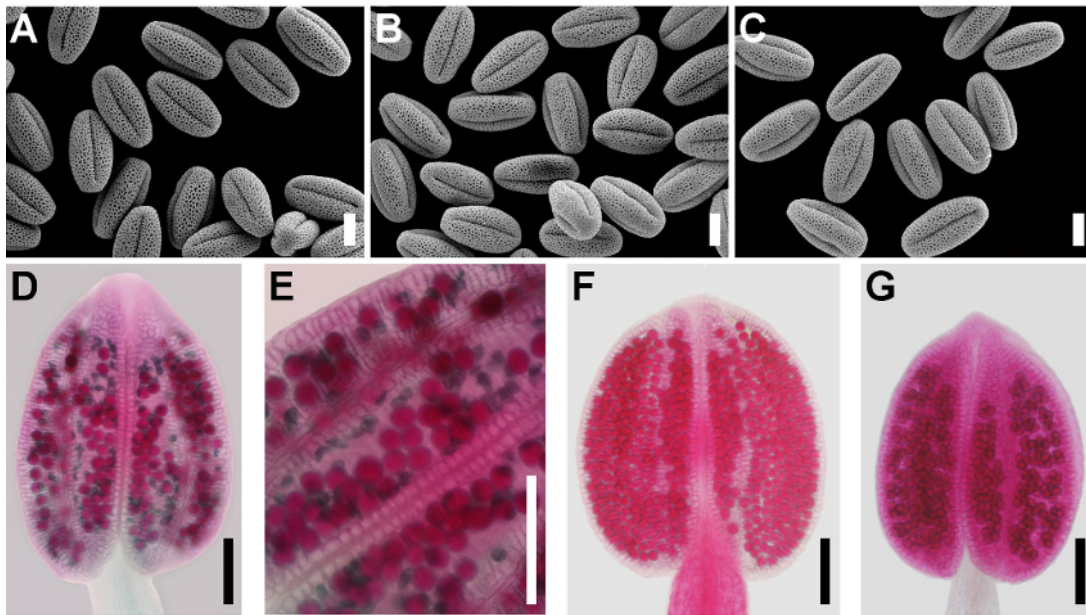


1:1 en lugar de una segregación 2:1. Analizando la descendencia de plantas *hua2-7/+ pep-4/+* llegamos a la misma conclusión (no mostrado), sugiriendo un posible defecto gametofítico, masculino o femenino.



**Figura 70.-** *HUA2* y *PEP* son importantes para la viabilidad del gametofito femenino. **A)** Varios frutos del sesquimutante *hua2-7 pep-4/+* aclarados en los que se pueden ver las semillas alojadas en su interior. En algunos de ellos la producción de semillas es muy reducida como consecuencia de los abortos de óvulo. **B)** Resultados de los cruces recíprocos efectuados entre el doble heterocigoto *HUA2/hua2-7 PEP/pep-4* y el mutante simple *hua2-7/hua2-7*. En las tablas de doble entrada se muestran los gametos formados por las plantas *HUA2/hua2-7 PEP/pep-4* (gris) y *hua2-7/hua2-7* (azul). La germinación de semillas resultantes se efectuó en presencia de kanamicina (*pep-4*, kan<sup>R</sup>). En amarillo y blanco se muestran las combinaciones cigóticas sensibles y resistentes al antibiótico, respectivamente. En negro, combinaciones inviables. Barra de escala: 1 mm.

Para abordar este punto, efectuamos cruces recíprocos entre el mutante simple *hua2-7* y plantas doble heterocigóticas *hua2-7/+ pep-4/+*. Para simplificar el análisis de la descendencia aprovechamos el hecho de que el alelo *pep-4* porta en su T-DNA un marcador de resistencia a kanamicina (Ripoll *et al.*, 2006). Así, las plantas *hua2-7* sólo producen un tipo de gameto que no proporciona resistencia al antibiótico, mientras que las plantas *hua2-7/+ pep-4/+* producen cuatro tipos de gametos, la mitad de los cuales no transmite la resistencia (Fig. 70 B). Cuando las plantas *hua2-7/+ pep-4/+* actuaron como parental masculino, constatamos la transmisión del gameto *hua2-7 pep-4* a través del polen. Las semillas resultantes germinaron en placas de agar con kanamicina, por lo que sólo sobrevivieron los individuos que recibieron gametos paternos *HUA2 pep-4* o *hua2-7 pep-4*. Mediante genotipado molecular confirmamos que sólo se obtienen plántulas *hua2-7/+ pep-4/+* y *hua2-7 pep-4/+* en una proporción cercana a 1:1 (Fig. 70 B). Existe un pequeño sesgo en contra de la combinación alélica *hua2-7 pep-4*, por lo que debe existir cierta reducción de viabilidad gametofítica en el polen. En cualquier caso, los granos de polen liberados por las anteras *hua2-7 pep-4/+* no mostraron ninguna irregularidad morfológica (Fig. 71 C). Además, el estudio de las anteras *hua2-7 pep-4/+* tampoco reveló la presencia de granos de polen anormales (Fig. 71 G). Todo ello sugiere que una deficiencia gametofítica masculina no es la causa principal de su baja fertilidad.



**Figura 71.-** El polen del sesquimutante *hua2-7 pep-4/+* es viable. **A-C)** Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de granos de polen de una planta silvestre (**A**), del mutante simple *hua2-7* (**B**) y del sesquimutante *hua2-7 pep-4/+* (**C**). **D-G)** Anteras teñidas con la solución de Alexander fotografiadas con microscopía óptica. **D)** Antera de una planta *ag-12/+* donde se observan granos de polen viables (esferas de color fucsia) y otros inviables (puntos verde-azulados). **E)** Ampliación de la imagen anterior. **F)** Antera silvestre donde todos los granos son viables. **G)** Antera del sesquimutante *hua2-7 pep-4/+*, en la que no se advierten defectos en los granos de polen, aunque sí tal vez una producción algo reducida. Barras de escala: 10  $\mu$ m (A, B y C) y 100  $\mu$ m (D, E, F y G).

Siguiendo la misma estrategia, las plantas *hua2-7/+ pep-4/+* actuaron como progenitor femenino para verificar si los gametos *hua2-7 pep-4* eran transmisibles a través de los óvulos. Tras selección en kanamicina, se genotiparon las plántulas descendientes. Todos los supervivientes resultaron ser dobles heterocigotos *hua2-7/+ pep-4/+*, resaltando la ausencia de plantas *hua2-7 pep-4/+* e indicando que *HUA2 pep-4* era la única combinación gamética producida en los óvulos capaz de conferir resistencia al antibiótico (Fig. 70 B). Estos resultados son una clara evidencia de que el parental femenino no puede transmitir gametos *hua2-7 pep-4*.

Se alcanzaron las mismas conclusiones en cruces recíprocos entre el silvestre e individuos *hua2-7/+ pep-4/+*, así como reemplazando *hua2-7* por el alelo *hua2-1* (resultados no mostrados). Por tanto, nuestros datos sugieren que un defecto en el desarrollo del gametófito femenino es el origen más probable del defecto de los óvulos y la mayor causa de la escasa fecundidad de las silicuas *hua2-7 pep-4/+*. Además, estas plantas produjeron un 52% de óvulos aberrantes (Fig. 66 H; Tabla 4), adecuándose perfectamente a las proporciones 1:1 esperables entre óvulos viables y no viables derivadas de ambos tipos de gametos femeninos. La carencia absoluta de transmisión simultánea de los alelos *pep-4* y *hua2-7* a través de los gametos

femeninos indica que *HUA2* y *PEP* desempeñan funciones, posiblemente redundantes, que resultan cruciales para la viabilidad del gametófito femenino.

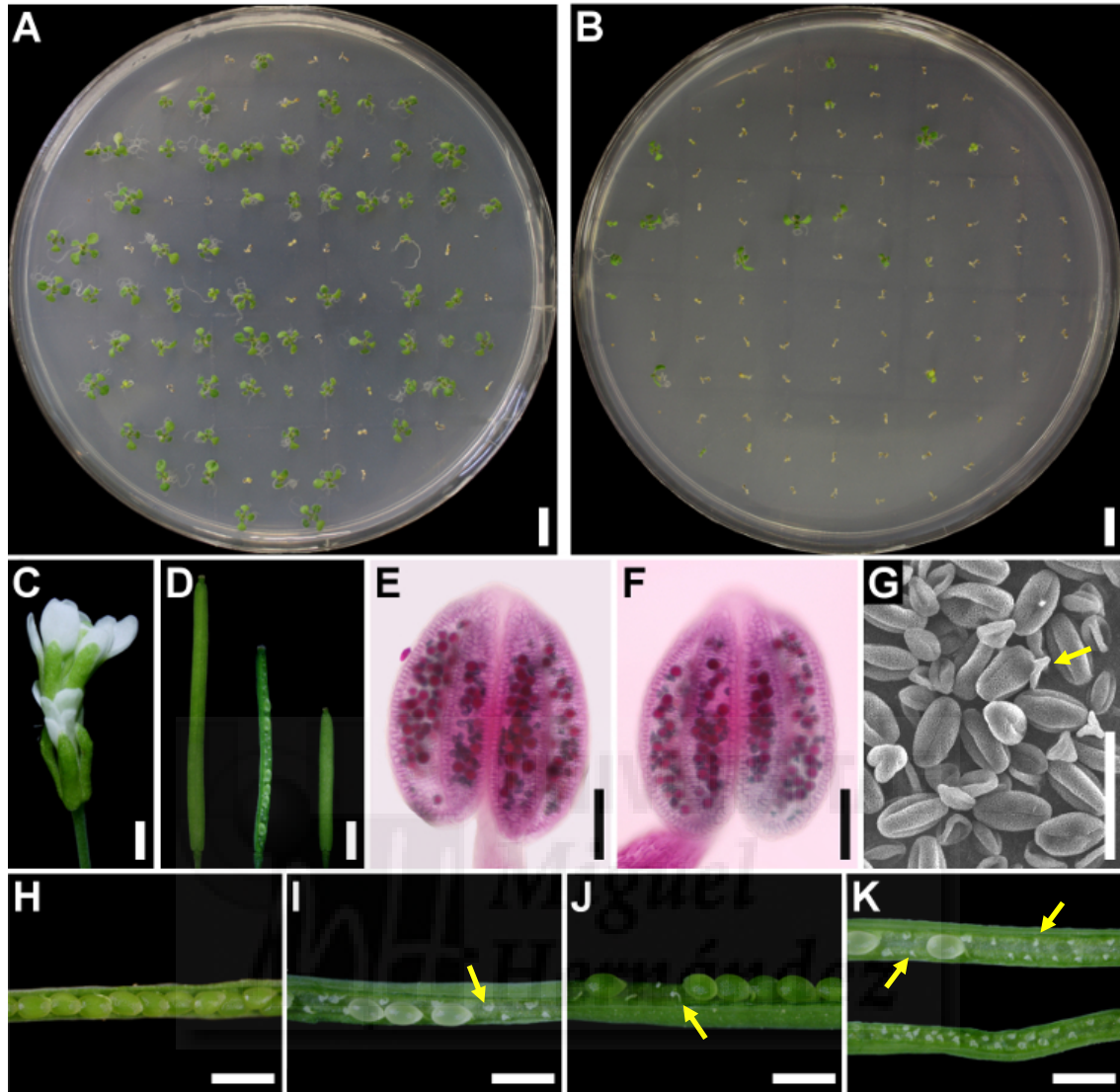
#### **IV.3.5.2.- La interacción genética con *AG* revela un papel crítico de *PEP* en la viabilidad de los óvulos**

La combinación de mutaciones *hua1*, *hua2* y *hen4* provoca fenotipos  $Ag^-$  severos en plantas heterocigóticas *ag/+*, que de otro modo mostrarían un fenotipo esencialmente silvestre (Chen y Meyerowitz, 1999; Li *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003). *PEP* interviene en el mantenimiento de la función C ayudando a sostener, junto a dichos elementos de la actividad *HUA-PEP*, el nivel de mRNA efectivo de *AG* (esta Tesis). Lógicamente, nos interesaba observar el efecto de la mutación *pep* en un fondo *ag/+*.

Los loci *AG* y *PEP* se encuentran muy próximos en el cromosoma IV de *Arabidopsis*. Con objeto de facilitar la búsqueda de individuos recombinantes, utilizamos inicialmente un alelo fuerte *ag* en fondo Col-0 (*ag-12*), portador de una inserción de T-DNA con un gen que confiere resistencia al antibiótico sulfadiazina (ver sección VII.1.1.1). Tras selección en presencia de antibiótico, los hipotéticos recombinantes *pep-4 ag-12/+* se verificaron mediante genotipado molecular (Materiales y Métodos).

Cuando se sembró la progenie de plantas *ag-12/+* en placas con sulfadiazina, se obtuvo alrededor de un 75% de individuos resistentes (203 resistentes frente a 71 sensibles,  $\chi^2 = 0,102$ ), lo esperable de un progenitor hemicingótico para un marcador dominante (Fig. 72 A). Entre éstos, encontramos un tercio con fenotipo  $Ag^-$  (no mostrado). Resultados equivalentes se obtuvieron a partir de plantas *hua1 ag-12/+*, usadas como control adicional, y donde no hubo dificultad en obtener plantas *hua1 ag-12* con fenotipo  $Ag^-$ , cuyas flores son indistinguibles de las del mutante simple *ag-12* (Fig. 72 C).

Por contra, entre los descendientes de plantas *pep-4 ag-12/+* se observó una bajísima proporción de plantas supervivientes (15%; Fig. 72 B) entre las que ninguna manifestó el fenotipo  $Ag^-$ . Estas observaciones se repitieron tras varias generaciones de plantas *pep-4 ag-12/+*, indicando que la ausencia de función *PEP* en el fondo genético *ag-12/+* compromete la transmisión del alelo mutante *ag-12*, insinuando la posible existencia de alteraciones en los gametos, además de provocar una drástica reducción de la fertilidad. De hecho, las plantas *pep-4 ag-12/+* producen una cantidad de semillas mucho menor que los individuos silvestres o que el heterocigoto *ag-12/+*.



**Figura 72.-** Interacción de *pep-4* con *ag-12*. **A)** y **B)** Placas con medio sólido suplementado con sulfadiazina en las que sobreviven de manera selectiva las plantas con el alelo *ag-12*. En **(A)** se sembró la progenie del hemigigoto *ag-12/+*, y en **(B)** la del sesquimutante *pep-4 ag-12/+*. La supervivencia en **(B)** es muy inferior a la observada en **(A)**. **C)** Flor del doble mutante *hua1 ag-12* con fenotipo  $Ag^-$ . **D)** Comparación de la longitud típica de silicuas silvestre (izquierda), *ag-12/+* (centro) y *pep-4 ag-12/+* (derecha). La eliminación de una valva en la silicua central (*ag-12/+*) permite apreciar abortos de óvulo en su interior. **E)** y **F)** Anteras teñidas con solución de Alexander y observadas bajo microscopía óptica, de los genotipos *ag-12/+* (**E**) y *pep-4 ag-12/+* (**F**). No se advierten diferencias en la producción de polen viable entre ambos genotipos. **G)** Imagen tomada con microscopía electrónica de barrido (SEM) de *ag-12/+* donde se observan granos de polen viables y otros inviables (flecha). **H-K)** Porciones de silicuas representativas de distintos genotipos a las que se les ha eliminado manualmente una valva. **H)** Silicua silvestre. **I)** Silicua del hemigigoto *ag-12/+*, con semillas y algunos óvulos abortados (flecha). **J)** Fruto *hua1 ag-12/+* donde se observan semillas y algunos óvulos inviables (flecha). **K)** Frutos del sesquimutante *pep-4 ag-12/+* con una producción de semillas muy reducida y numerosos óvulos abortados (flechas). Barras de escala: 1 mm (**A**, **B**, **C**, **D**, **H**, **I**, **J** y **K**), 100  $\mu$ m (**E** y **F**) y 50  $\mu$ m (**G**).

En un esfuerzo preliminar para determinar las causas de la baja fertilidad de los individuos *pep-4 ag-12/+*, examinamos sus pistilos y anteras. Los comparamos con los de plantas *ag-12/+* y *hua1 ag-12/+*. En ninguno de los genotipos se advirtieron alteraciones visibles en la morfología de los pistilos, salvo en *pep-4 ag-12/+* por su



menor longitud y grosor (Fig. 72 D). El examen de las anteras *pep-4 ag-12/+* reveló gran número de granos de polen anormales en su interior (Fig. 72 F). Sin embargo, respecto a este fenotipo, *pep-4 ag-12/+* no difiere ni de las plantas *hua1 ag-12/+* ni de *ag-12/+* (Fig. 72 E), lo que dificulta su interpretación.

GENOTIPOS	Semillas	Óvulos abortados	% óvulos abortados	Nº de plantas	Nº de silicuas
<b>Col-0</b>	521	3	0,6	5	9
<b><i>ag-12/+</i></b>	308	272	46,9	8	12
<b><i>hua1 ag-12/+</i></b>	303	241	44,3	10	12
<b><i>pep-4 ag-12/+</i></b>	133	925	87,4	9	20

**Tabla 5.-** Abortos de óvulos en *ag-12* y otros mutantes. La mutación *pep-4* provoca un gran aumento del número de abortos de óvulo en el fondo *ag-12/+*. Los datos indicados para las plantas Col-0 proceden de un recuento diferente al mostrado en la Tabla 4.

Dados los precedentes de abortos de óvulos en otros genotipos analizados anteriormente, examinamos el interior de las silicuas. Pudimos registrar un elevado número de óvulos abortados en las silicuas *ag-12/+*, que no varió sustancialmente en el caso de *hua1 ag-12/+* (Fig. 72 I y J; Tabla 5). Sin embargo, la eliminación de *PEP* en el fondo *ag-12/+* provocó un enorme aumento en la proporción de óvulos abortados con relación a los otros genotipos (Fig. 72 K; Tabla 5). Este aumento alcanzaba más del 93% de las posiciones en el interior de la silicua en los primeros frutos de la planta, atenuándose esta proporción en frutos posteriores (Tabla 5). Este notorio incremento en la perturbación del desarrollo de los óvulos permite explicar el bajo rendimiento en semillas de las plantas *pep-4 ag-12/+* y, muy probablemente, podría estar relacionado con la imposibilidad de obtener plantas homocigóticas *pep-4 ag-12*.

Debido a la existencia de polen inviable en las plantas *ag-12/+* (Fig. 72 E), los defectos en los óvulos formalmente podrían estar ocasionados por defectos gametofíticos masculinos o de progresión del tubo polínico, etc. En principio, esto parecía improbable puesto que las plantas *ag-12/+* o *hua1 ag-12/+* presentan las mismas alteraciones del polen y dan lugar a plantas con fenotipo  $Ag^-$  en las proporciones esperadas. Además, las semillas en *pep-4 ag-12/+* no aparecen agrupadas preferentemente en la parte apical de las silicuas, sino que pueden aparecer intercaladas con óvulos abortados a lo largo de todo el fruto (Fig. 72 K) por lo que resultaba poco probable que se debiera a defectos en la progresión del tubo polínico. No obstante, no se puede excluir la existencia de defectos gametofíticos masculinos en las plantas *pep-4 ag-12/+*, por lo que realizamos cruces recíprocos con la estirpe silvestre para resolver esta cuestión. Se fertilizaron plantas *pep-4 ag-12/+*

con polen silvestre y las semillas resultantes (tan sólo 50 a partir de varias silicuas) se sembraron en placas con el antibiótico sulfadiazina. Ninguna de ellas mostró resistencia, sugiriendo que los gametos *pep-4 ag-12* no son transmisibles a través del gametófito femenino. En cruces recíprocos, el parental silvestre Col-0 fue polinizado con polen *pep-4 ag-12/+*, obteniéndose 187 semillas, de las cuales tan sólo 5 sobrevivieron a la presencia del antibiótico. Estos datos indican que el gameto *pep-4 ag-12* es transmisible a través del parental masculino. No obstante, la bajísima proporción en la transmisión sugiere que este genotipo también perturba el desarrollo del gametófito masculino, aunque con penetrancia incompleta.

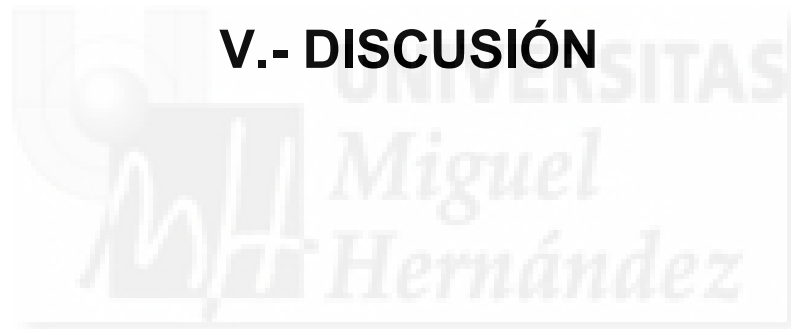
En resumen, nuestros resultados encajan con que *PEP* desempeña funciones en el desarrollo de ambos gametófitos, presumiblemente en parte a través de su influencia sobre *AG*, pero también de manera independiente a *AG*. La incompatibilidad gametofítica entre las mutaciones *ag* y *pep* refuerza nuestras observaciones anteriores respecto a *pep* y *hua2* (sección IV.3.5.1) y subraya de nuevo la importancia de la actividad *HUA-PEP* durante el desarrollo reproductivo.







## **V.- DISCUSIÓN**





## V.- DISCUSIÓN

En todos los organismos el control de la regulación génica es fundamental para el desarrollo y la adaptación a los cambios medioambientales. En organismos sésiles como las plantas, durante las distintas fases de su desarrollo el éxito reproductivo depende de la correcta coordinación de los mecanismos de expresión génica y su modulación con respecto a señales endógenas y del entorno. La actividad de genes que codifican factores que intervienen en distintas etapas de su ciclo vital y participan en distintos aspectos del control genético puede ser muy ventajosa para esta finalidad. A este perfil se adecúan las proteínas polifacéticas con dominios de unión a RNA (*RNA Binding*, RNB), capaces de regular la expresión génica desde la transcripción a la traducción y contribuir a la coordinación de numerosos procesos de desarrollo (Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013).

En nuestro trabajo, el punto de referencia primordial es el estudio de las funciones de PEP en la regulación del desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*. PEP es una proteína con tres dominios KH, con una configuración propia de las hnRNP de tipo PCBP, como el miembro tipo hnRNP K, caracterizadas por su enorme versatilidad funcional (Makeyev y Liebhaber, 2002; Mikula y Bomsztyk, 2011). El rango de procesos examinados en este estudio abarca desde el control del tiempo de floración a la formación de flores y gametos. Asimismo, hemos relacionado, genética, molecular y funcionalmente la implicación de PEP en estos procesos con otras proteínas de unión a RNA (HUA1, HUA2, HEN4, FLK), estructuralmente relacionadas o no con PEP, cuya vinculación a algunos de esos programas de desarrollo ya estaba establecida (Cheng *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). En este cometido hemos observado relaciones antagónicas, de solapamiento funcional e incluso la coexistencia de ambas en función del proceso en estudio, corroborando y profundizando en observaciones previas de otros autores, así como desvelando nuevas funciones para los genes RNB referidos.

Además de evidenciar el papel de *PEP*, hemos propuesto la existencia de una actividad conjunta, que hemos dado en denominar como *HUA-PEP*, compuesta al menos por los genes *HUA1*, *HUA2*, *HEN4*, *PEP* y *FLK*, cuya participación no se restringe a la transición reproductiva y la morfogénesis floral, sino que continúa en el desarrollo e identidad de óvulos y la producción de gametos.

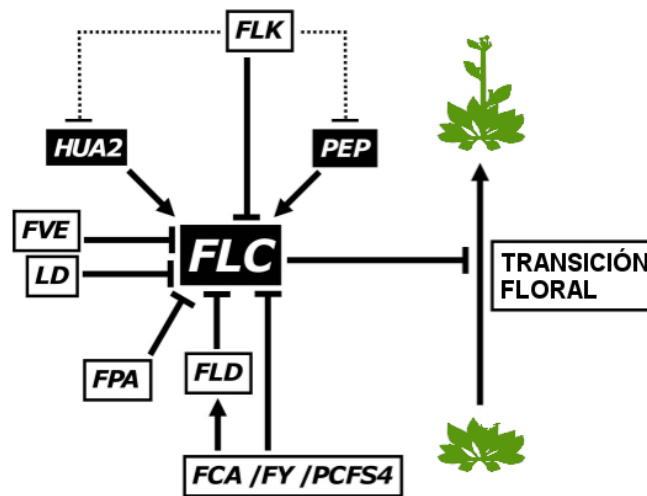
## V.1.- POSICIÓN DE *PEP* EN EL CONTROL DE LA TRANSICIÓN FLORAL

Nuestros datos demuestran que *PEP* ejerce un papel regulando la transición a la etapa reproductiva. Esta función se lleva a cabo aparentemente mediante su contribución al mantenimiento de los niveles de mRNA del gen MADS-box y represor central de la floración *FLC*. Diversas pruebas apoyan estas conclusiones (capítulo 1). Primero, la pérdida de *PEP* aunque provoca una modesta aceleración de la floración, rescata en gran medida al mutante tardío *flk*, tanto en el tiempo de floración como en los niveles del RNA de *FLC*. La sobreexpresión de *PEP* confiere floración tardía en distintos regímenes lumínicos y responde a la vernalización y el tratamiento con GA, recordando a un mutante de pérdida de función de la ruta autónoma (Mouradov *et al.*, 2002). De acuerdo con esto, la sobreexpresión de *PEP* conduce a un aumento del mRNA de *FLC*, siendo la mutación nula *flc-3* epistática respecto a *35S::PEP*, lo que demuestra claramente el requerimiento de *FLC* para los efectos de la sobreexpresión de *PEP* sobre el tiempo de floración.

De esta manera, *PEP* se opone a *FLK*, un parólogo de *PEP* de la ruta autónoma de promoción de la floración (Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004; Ripoll *et al.*, 2006; Ripoll *et al.*, 2009). Los procesos biológicos regulados por proteínas RNB antagonistas no son una novedad. Un proceso de desarrollo crucial en mamíferos, la elección del momento de la transición de una etapa proliferativa a otra de diferenciación neuronal, se regula mediante la relación antagonista entre hnRNP K y la proteína RRM Hu (Yano *et al.*, 2005).

La ruta autónoma dista de ser una vía lineal. Más bien se trata de un conjunto de actividades independientes que, de manera concertada, regulan negativamente la expresión de *FLC*, aunque se han establecido algunas relaciones funcionales entre varios de sus miembros (Fig. 73; Liu *et al.*, 2007; Bäurle y Dean, 2008). El estudio bioquímico de estas actividades génicas está resultando prolífico (Ietswaart *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013), aunque permanecen muchas incógnitas. Una de ellas afecta al modo de acción de *FLK*. Nuestros resultados demuestran que los productos de *PEP* y *FLK* interactúan físicamente, lo cual encaja con los datos genéticos y de expresión molecular (apartado IV.1.6). Así, la represión de *FLC* por parte de *FLK* podría tener lugar impidiendo o limitando la acción de activadores como *PEP* mediante un efecto directo entre polipéptidos (Fig. 73). Es notorio que, en lugar de mostrar fenotipos aditivos, las plantas *flk 35S::PEP* sean muy similares a los mutantes simples *flk* en términos de tiempo de floración y acumulación del mRNA de *FLC* (Fig. 32; apartado IV.1.4). Estos resultados concuerdan con que *FLK* y *PEP* operen en la misma ruta. Asumiendo un papel de la proteína FLK en la regulación postranscripcional de *FLC*, la

existencia de elementos aguas abajo de FLK (como PEP) podría explicar por qué FLK no interacciona *in vitro* con el transcrito de *FLC* (Mockler *et al.*, 2004).



**Figura 73.-** Modelo esquemático de las interacciones de *FLK* y *PEP* en el contexto de la ruta autónoma de floración de *Arabidopsis*. De acuerdo con este modelo, *FLK* reprime a *FLC* parcialmente a través de la regulación negativa de los activadores de *FLC*, como *PEP* y quizás *HUA2*. Asimismo, también se contemplan actividades independientes sobre el gen *FLC*. Por simplificar, se presenta una acción secuencial entre *FLK* e hipotéticos genes intermediarios. Sin embargo también son considerados otros supuestos, donde los productos génicos estarían interaccionando en complejos proteicos. Las activaciones se indican mediante flechas, y las regulaciones negativas con líneas terminadas en T. Las interacciones hipotéticas están representadas con líneas de puntos. *FCA* actúa sobre *FLC* independientemente de *FLD*, y también aguas arriba, mientras que *FPA*, *FCA* y *FLK* presentan funciones paralelas (Bährle *et al.*, 2007; Bährle y Dean, 2008; Ripoll *et al.*, 2009).

Dada la versatilidad funcional y bioquímica de las proteínas PCBP, no podemos descartar otros tipos de interacción entre *PEP* y *FLK*. Aunque sólidos, nuestros resultados no restringen la posibilidad de que *PEP* ejerza una función sobre *FLC* (y otros genes) independientemente de *FLK*. De hecho, ambas situaciones no tienen por qué ser mutuamente excluyentes, como se ha demostrado en el caso de otros integrantes de la ruta autónoma (Fig. 73; Liu *et al.*, 2007; Bährle y Dean, 2008). Asimismo, la interacción entre *PEP* y *FLK* puede ser muy dinámica, no limitándose a una relación antagonista, sino actuando en la misma dirección en otros procesos del desarrollo (apartado IV.3.4; Ripoll, 2004; resultados no publicados; ver más adelante).

*PEP* recuerda en el contexto de la floración a *HUA2*, otro activador de *FLC* (Doyle *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007) que codifica una proteína con un dominio RPR que también regula positivamente a *AG* (Chen y Meyerowitz, 1999; Cheng *et al.*, 2003; apartado IV.2.2.6). Aquí mostramos que *PEP* y *HUA2* actúan en el mismo sentido activando a *FLC*. Así, los mutantes triples *flk hua2 pep* son esencialmente silvestres en cuanto al tiempo de floración e incluso sus niveles de mRNA de *FLC* son inferiores al silvestre (Ripoll *et al.*, 2009). La pérdida de función de *HUA2* mitiga el retardo de las



plantas *FRI*, el mutante de fotoperiodo *co*, y los mutantes de la ruta autónoma *fpa* y *ld* (Doyle *et al.*, 2005). Nosotros extendemos estas observaciones al incluir a *flk* entre los mutantes tardíos rescatados por *hua2* (Ripoll *et al.*, 2009; esta Tesis). Sin embargo, aunque *HUA2* y *PEP* pueden cooperar en la activación de algunos represores florales, ésto no tiene por qué ser siempre así ya que los mutantes *pep* no rescatan al mutante de fotoperiodo *co* (no mostrado). Esta y otras observaciones sugieren que *HUA2* actúa en paralelo respecto a *PEP* y *FLK* (ver más adelante).

*PEP* y *HUA2* colaboran con *HUA1* y *HEN4* en la activación de otros genes MADS-box como *AG*, favoreciendo la formación de estructuras reproductivas (Cheng *et al.*, 2003; esta Tesis). La sobreexpresión de *FLC* en plantas *35S::FLC* genera flores aberrantes con características vegetativas (Wang *et al.*, 2007). Parece un contrasentido, por tanto, estimular el mantenimiento de los niveles de *FLC* (y otros represores de la floración). Pero resulta crítico para garantizar un desarrollo adulto vegetativo suficiente que permita generar, con garantías de éxito y tras el colapso de *FLC*, estructuras reproductivas como flores, óvulos y polen. Tal éxito reproductivo que podría verse comprometido por una transición excesivamente precoz.

## **V.2.- *PEP* INTERVIENE EN LA MORFOGÉNESIS FLORAL COMO REGULADOR POSITIVO DE LA ACTIVIDAD C**

Con anterioridad, se había comprobado en nuestro laboratorio la expresión territorial de *PEP* en el meristemo floral y en los órganos reproductivos de la flor (Fig. 27; Ripoll, 2004; Ripoll *et al.*, 2006). Además, en la mutación original *pep-1*, así como ocasionalmente en otros alelos como *pep-2* y *pep-4*, se constató la presencia de valvas extra. Junto a las interacciones genéticas con genes *CLV*, esto insinuaba un papel de *PEP* en la determinación del meristemo floral que probablemente estaría enmascarado por solapamiento funcional con otros genes (Ripoll, 2004; Ripoll *et al.*, 2006)

Previamente (Chen y Meyerowitz, 1999) se había hipotetizado la existencia de genes adicionales a *HUA1* y *HUA2* en la ruta de procesamiento de *AG*, identificándose *HEN4* como el caso más claro (Cheng *et al.*, 2004). Aquí demostramos que *PEP* se está funcionalmente relacionado con estos genes, y proponemos la existencia de una actividad génica ejecutada por diversas proteínas RNB, la actividad *HUA-PEP*, clave en el mantenimiento de la función C, y en la que *PEP* desempeña un papel muy relevante. Los mutantes simples *hua1*, *hua2*, y *hen4*, así como sus combinaciones dobles carecen de fenotipos florales, a excepción del doble mutante *hua1 hua2*.

Significativamente, los dobles mutantes *hen4 pep* presentan conversiones petaloides en una fracción de sus flores, siendo éstas más fuertes y abundantes en *hua1 pep*. En este genotipo aparecen además numerosos indicios de transformación sepaloide en el cuarto verticilo, destacando la presencia de grandes células gigantes con estrías. Como sucede en los auténticos sépalos (Roeder *et al.*, 2010; Roeder *et al.*, 2012), la irregularidad en los tamaños y disposición de las células conduce a frecuentes curvaturas, torsiones y “arrugas” en los gineceos. Igualmente, observamos rasgos inequívocos de pérdida de determinación del meristemo floral, como la presencia de valvas extra e incluso la aparición de verticilos adicionales.

A pesar de la inviabilidad de dobles homocigotos mutantes *hua2 pep*, así como de los triples homocigotos *hen4 hua1 pep* y *hua1 hua2 pep*, sí pudimos comprobar el profundo impacto de la reducción de la actividad *PEP*, sobre todo en los sesquimutantes *hen4 hua1 pep/+* y *hua1 hua2 pep/+*. La eliminación de un alelo *PEP* genera un fenotipo mutante muy fuerte a partir de una situación de fenotipo silvestre (*hen4 hua1*, Cheng *et al.*, 2003; esta Tesis), o bien intensifica un fenotipo mutante previo (*hua1 hua2*; Chen y Meyerowitz, 1999; esta Tesis). Los fenotipos florales son, de nuevo, indicativos de un debilitamiento de la función C. En sintonía con esta interpretación, la intensidad del fenotipo de nuestras combinaciones mutantes *hua-pep* se correlaciona inversamente con los niveles del mRNA de *AG*, donde se aprecia un impacto muy importante de *PEP* (Fig. 46, apartado IV.2.2.6). Además, esto se refleja igualmente en los niveles de dos genes representativos como dianas de *AG*, *SPL/NZZ* y *KNU*, implicados entre otras funciones, en el desarrollo de los estambres y la determinación del meristemo, respectivamente (Fig. 46; Ito *et al.*, 2004, 2007; Payne *et al.*, 2004).

Uno de los principios básicos del modelo ABCE de identidad de los órganos florales es el antagonismo entre las funciones A y C (Jack, 2004; Krizek y Fletcher, 2005; Causier *et al.*, 2010). Cuando se reduce críticamente la función C, se expande la expresión de genes de la función A, como *AP1*, contribuyendo a la transformación de los estambres en pétalos y de los carpelos en sépalos (Fig. 10; Krizek y Fletcher, 2005; Causier *et al.*, 2010). La presencia de la proteína *AP1* en los órganos del cuarto verticilo de flores *hua1 pep-4* (apartado IV.2.2.7) guarda coherencia con los fenotipos observados y con la relevancia de *PEP* en los mismos.

De igual modo, nuestro análisis de los mutantes *hua-pep* en un contexto de desarrollo del gineceo tan distinto, como es del mutante *ful*, apoya la importancia de la contribución de *PEP* a la actividad *HUA-PEP* en el mantenimiento de la identidad carpelar. En los frutos *ful*, la expresión ectópica de los genes de margen de valva provoca la disminución del tamaño de las células de la valva (Ferrándiz *et al.*, 2000 b).

En las plantas *ful-1 pep-4* y *ful-1 hua1 pep-4* se produce una importante recuperación de la longitud de las células del ovario, particularmente en la valva, que origina, entre otros cambios, un alargamiento del fruto (sección IV.2.2.9.1). La eliminación progresiva de genes de margen de valva en el fondo *ful* también provoca cambios similares, conduciendo a un rescate parcial de la identidad de las células de valva (Liljegren *et al.*, 2004). En nuestras combinaciones mutantes *hua-pep* se registra una disminución de los genes *SHP* (apartado IV.3.2). Por tanto no descartamos que la posible acción sobre genes de margen de valva, como los *SHP*, ejerza cierta influencia en el proceso. No obstante, con independencia de esto (ambas posibilidades no son excluyentes), nuestros resultados apuntan a que las mutaciones *hua-pep* perturban un proceso jerárquicamente superior, como es la propia identidad carpelar del verticilo. De hecho, en el mutante *ful-1 hua1 pep-4* ya se observan células gigantes de tipo sepaloide (Fig. 52). Esto queda del todo patente en las plantas *ful-1 hua1 hua2-7* y sobre todo en *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*, donde aparecen incluso tricomas en la superficie de los órganos y cuyos fenotipos son esencialmente los mismos que en fondo *FUL* (Figs. 51-54), lo que indica que la caída de la actividad *HUA-PEP* es básicamente epistática sobre *ful*. Esta visión se ve reforzada por el seguimiento de expresión de GUS para el gen *FUL*, así como de la lignificación en las flores *ful-1 hua1 hua2-7 pep-4/+*, donde en ambos casos se aprecia en el cuarto verticilo un patrón claramente propio de sépalo (Figs. 53 y 54).

### **V.3.- LA ACTIVIDAD *HUA-PEP*: UN CASO DE REDUNDANCIA FUNCIONAL ENTRE GENES NO RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE**

Se suele atribuir la redundancia funcional a la existencia (presunta o conocida) de genes parálogos, habitualmente surgidos como consecuencia de fenómenos de duplicación génica. Si bien esto es muy común, no deja de ser cierto que puede ocurrir también entre genes estructuralmente no relacionados o en combinaciones de ambos casos. De hecho, los miembros identificados de la actividad *HUA-PEP* son tres proteínas KH, dos de ellos parálogos cercanos (*PEP* y *FLK*) y otra más alejada (*HEN4*), junto a *HUA1* y *HUA2*, carentes de toda relación estructural entre sí y con las anteriores (Chen y Meyerowitz, 1999; Li *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004; Ripoll *et al.*, 2006). Este tipo de redundancia o solapamiento funcional no es excepcional. La correcta formación del margen de valva en *Arabidopsis* tiene lugar gracias a cierto grado de redundancia funcional entre parálogos cercanos como *SHP1* y *SHP2*, junto a factores de tipo bHLH como *IND* y

*ALCATRAZ* (*ALC*; Rajani y Sundaresan, 2001; Liljegren *et al.*, 2004). Asimismo, la denominada actividad *JAG/FIL*, fundamental en la formación de patrón en el eje medio-lateral del fruto incluye a factores de transcripción del grupo YABBY1 (*YAB1*), como *YAB3* y *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*), junto con la proteína con dominio de dedos de zinc *JAGGED* (*JAG*), con los que coopera *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*), un factor de transcripción de tipo MYB (Fig. 16; González-Reig *et al.*, 2012 y referencias ahí incluidas). En *Caenorhabditis elegans*, por ejemplo, el desarrollo inapropiado de la vulva es reprimido por factores de transcripción redundantes sin ninguna relación estructural (Cui *et al.*, 2006; Fay y Yochem, 2007). En *Drosophila melanogaster*, *FMR1* (con dominios KH), *Rasputin* y *Caprin* son tres proteínas RNB no relacionadas que cooperan en la restricción del crecimiento tisular y la promoción del desarrollo neuronal (Baumgartner *et al.*, 2013). Este tipo de compensación funcional se ha reconocido como una estrategia importante para regular las funciones celulares y conferir solidez a los sistemas biológicos frente a las mutaciones y otras alteraciones, y se ha descrito fundamentalmente en circuitos de regulación metabólica y genética (Wagner, 2000). De hecho, Wagner (2000) concluyó que las interacciones entre genes no relacionados en *Saccharomyces cerevisiae* son la causa principal de la robustez frente a las mutaciones.

#### **V.4.- EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE *PEP* ES CRÍTICO EN EL CONTEXTO DE LA ACTIVIDAD *HUA-PEP***

Nuestros ensayos genéticos de pérdida de función, indican claramente que la ausencia o reducción (en ciertos fondos) de la función *PEP* provoca importantes efectos en el fenotipo de las flores de diversas estirpes mutantes *hua-pep*. Resultó muy sorprendente, por tanto, el efecto de su sobreexpresión en los fondos dobles mutantes *hua1 hua2* y *hua1 hen4*. En lugar de compensar la falta de las funciones *HUA1*, *HUA2* y *HEN4*, se registraron cualitativamente los mismos defectos de pérdida de función C (conversiones homeóticas y pérdida de determinación del meristemo floral) que en las combinaciones con alelos *pep* (secciones IV.2.2.3 y IV.2.2.5). De hecho, los fenotipos son incluso bastante más severos. Esto sugiere que los niveles de expresión de *PEP* se deben mantener entre ciertos márgenes.

Las plantas *35S::PEP*, *hua1 35S::PEP*, *hua2 35S::PEP* y *hen4 35S::PEP* no muestran alteraciones en las flores. Sin embargo, en las plantas *hua1 35S::PEP* sí que registramos cierta disminución de los niveles del mRNA de *AG* (Fig. 60), aunque no lo suficiente para generar un fenotipo morfológico. Probablemente, la sobreexpresión de

*PEP* en un fondo silvestre o incluso con alguna otra mutación, puede ser amortiguada por el sistema. No obstante, en situaciones donde la función *HUA-PEP* se halla aún más comprometida (*hua1 hua2* o *hen4 hua1*), el exceso de *PEP* rebasaría cierto umbral, presumiblemente perturbando equilibrios estequiométricos (Veitia *et al.*, 2013). Con esta interpretación encaja el hecho de que los fenotipos de las plantas *hua1 hua2* y a la vez hemicingóticas para la construcción *35S::PEP* sean comunes a las plantas *hua1 hua2*, mientras que los triples homocigotos *hua1 hua2 35S::PEP* (con niveles de expresión de *PEP* más elevados) muestren un fenotipo exacerbado (Fig. 55 y Tabla 3).

La robustez frente a las mutaciones de la actividad *HUA-PEP* podría tener su base en la participación de sus miembros en vías paralelas o en la formación de complejos proteicos comunes, no siendo mutuamente excluyentes ambas posibilidades. Las proteínas que forman los complejos hnRNP no exhiben necesariamente homología entre sí. Con diversos dominios estructurales, muy a menudo muestran solapamiento funcional (Dreyfuss *et al.*, 2002). Hemos demostrado que el producto de *PEP* es capaz de formar heterodímeros *in planta* con HUA1 y HEN4 (Fig. 61). Dado que HUA1 y HEN4 interactúan físicamente, y que HUA1 se une a secuencias de RNA de AG (Cheng *et al.*, 2003), nuestros resultados apuntan a que *PEP* actúa en complejos polipéptidicos junto a HUA1 y HEN4 regulando a AG y probablemente a otros genes diana. *PEP* (como HUA1) puede formar homodímeros (Fig. 61), por lo que la sobreexpresión de *PEP*, ante la alteración de los niveles de otros componentes, podría conducir a un exceso de homodímeros de *PEP*, quizás menos eficaces o generando distinta especificidad de acción.

Son numerosos los genes en los que la pérdida y el exceso de función muestran cualitativamente los mismos fenotipos. Sólo por citar algunos ejemplos, en embriones de *Xenopus laevis*, tanto la reducción como la sobreexpresión de *Mex3b*, que codifica una proteína con dos motivos KH implicada en la formación del patrón anteroposterior de la placa neural, conduce a la reducción del transcrito de *Xbra*, su gen diana (Takada *et al.*, 2009). En *Arabidopsis*, tanto la pérdida como la sobreexpresión de los genes *PHYB* (*PHYTOCHROME B*) y *EFO1* (*EARLY FLOWERING BY OVEREXPRESSION 1*) generan un fenotipo de floración precoz (Bagnall *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2011), y en el caso de *MAP18* se producen anomalías en el crecimiento del tubo polínico y fertilidad reducida (Zhu *et al.*, 2013). El desequilibrio ocasionado en la síntesis de porfirinas por pérdida o exceso de función de *PORPHOBILINOGEN DEAMINASE* (*PBGD*) genera alteraciones y lesiones diversas en *Arabidopsis* (Quesada *et al.*, 2013). Curiosamente, el aumento y la disminución de la expresión de las quinasas *FAB1A/B* de *Arabidopsis* provocan los mismos defectos pleiotrópicos durante el desarrollo, como consecuencia de la

perturbación de la homeostasis de las endomembranas, atribuyéndose este comportamiento a la alteración de los complejos proteicos involucrados. (Hirano *et al.*, 2011).

Cabe destacar que, aun no reflejándose en fenotipos morfológicos, las plantas *pep-4* y *35S::PEP* comparten muchos fenotipos moleculares. Según un reciente estudio transcriptómico, numerosos genes se comportan de igual modo en ambos genotipos, aumentando o disminuyendo su expresión (resultados no publicados), en consonancia con su efecto fenotípico en combinaciones mutantes *hua-pep*.

#### **V.5.- LA ACTIVIDAD *HUA-PEP* AFECTA AL DESARROLLO DE LOS ÓVULOS CONTROLANDO LA ESPECIFICACIÓN DE SU IDENTIDAD**

Con anterioridad, se ha demostrado la implicación de diversos integrantes de lo que aquí hemos dado en llamar actividad *HUA-PEP* en la regulación de la floración (*FLK*, *HUA2*, *PEP*; Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004; Doyle *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Ripoll *et al.*, 2009), así como en la morfogénesis floral (*HEN4*, *HUA1*, *HUA2*; Chen y Meyerowitz, 1999; Li *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003). En este trabajo, además de corroborar tales conclusiones y demostrar la importancia de *PEP* en la organogénesis floral, hemos revelado una contribución adicional de la actividad *HUA-PEP* crítica para el desarrollo reproductivo, como es la de regular el desarrollo de los óvulos. En diversas combinaciones mutantes *hua-pep* comprobamos la incidencia, en proporciones variables, de conversiones homeóticas de óvulos hacia órganos florales (apartado IV.3.1; Fig. 62), un claro signo de que la perturbación de la actividad *HUA-PEP* controla la identidad de este órgano reproductivo. Destacan los genotipos *hua1 hua2 pep/+* y, sobre todo, *hua1 hua2 35S::PEP*, donde aparecen este tipo de transformaciones en la totalidad de las flores, haciendo hincapié de nuevo en la importancia de la función *PEP* y la regulación de su expresión.

En consonancia con la incidencia de óvulos transformados, en los mutantes *hua-pep* se registran disminuciones de los tres genes MADS-box, *SH1*, *SH2* y *STK*, considerados de función D, determinantes de la identidad de óvulo (Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003; Brambilla *et al.*, 2007), en particular en *hua1 hua2 35S::PEP* (Fig. 64 A). Dada la similitud de estos genes con *AG*, es concebible una acción de la actividad *HUA-PEP* en el mantenimiento de la función D por medio de su actuación sobre la transcripción o el procesamiento de los transcritos correspondientes. De hecho, la acumulación de transcritos con secuencias intrónicas, tanto en *AG* como en *SH1* (Fig. 64 B; ver más adelante) encajaría con esta idea.



Además de *AG* y los genes de función D, la actividad redundante de los genes *SEP* también es necesaria para la correcta especificación de los óvulos (Favaro *et al.*, 2003). Por tanto, también es coherente que disminuya *SEP3* (Fig. 64 C), el miembro más activo del grupo (Immink *et al.*, 2009).

En trabajos previos el carácter carpeloide de los órganos que reemplazan a los óvulos en el triple mutante *shp1 shp2 stk*, se puso de relieve atendiendo a consideraciones morfológicas, como el aspecto del órgano en su conjunto (cilíndrico) o tipos celulares con estrías a los que se adjudicó identidad de estilo (Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003). En *bel1 shp1 shp2 stk* pueden incluso surgir óvulos ectópicos a partir de los órganos transformados (Brambilla *et al.*, 2007). No obstante, los resultados con nuestras combinaciones mutantes *hua-pep* difieren de los anteriores. Si bien registramos características carpelares en algunos órganos ectópicos (papilas estigmáticas, óvulos secundarios, estructura cilíndrica), es muy abundante el número de conversiones que evocan un carácter sepaloide manifiesto (Fig. 62). Muchos de ellos presentan una estructura laminar o filoide, incluso con patrones de venación similares a los de sépalo (Figs. 62 y 63). En otros se aprecian células estriadas con una disposición más irregular que las estilares y dispuestas por todo el órgano que, en ocasiones, incluso carece de funículo (Figs. 62 J y K). En plantas *ful-1/+ hua1 hua2 pep/+* pudimos comprobar como la expresión de *FUL* en algunos de estos órganos se corresponde más con un patrón de venación propio de sépalo, sin persistir en la región apical, como suele suceder en la región estilar de los auténticos pistilos (Fig. 63; Gu *et al.*, 1998).

Se debe considerar que el novedoso carácter sepaloide, o al menos inusual, de las transformaciones homeóticas de óvulo en estirpes mutantes *hua-pep*, muy probablemente se debe a que disminuye la expresión de *SHP1*, *SHP2* y *STK*, pero también la de *AG*. La proporción relativa de sus productos resulta crítica. La sobreexpresión de los homólogos de *AG* en los óvulos de tabaco condujo a su conversión en estructuras carpeloides (Mandel *et al.*, 1992). En *Arabidopsis*, la expresión ectópica de *AG* tiene un efecto menor en los óvulos, pero la expresión de *BAG*, el ortólogo de *Brassica*, causa la transformación de los integumentos en estructuras carpeloides (Ray *et al.*, 1994). Por consiguiente, la especificación del primordio requiere discriminar entre identidad de óvulo o de carpelo. La proporción relativa de las proteínas *AG* y de función D, junto a los productos *SEP*, es fundamental para generar tetrámeros con especificidad carpelar o de óvulo (Bataglia *et al.*, 2009). Por ejemplo, *SEP3* puede formar dímeros con *AG*, considerados necesarios para conferir identidad carpelar (Immink *et al.*, 2009). No obstante, también puede formar complejos ternarios con *AG* y *STK* (Favaro *et al.*, 2003), así como facilitar uniones

entre STK, SHP1 y SHP2 presumiblemente para especificar óvulos (Favaro *et al.*, 2003; Bataglia *et al.*, 2009; Immink *et al.*, 2009).

En ciertos contextos genéticos (fondo mutante *ag ap2*) SHP1, SHP2 y STK parecen contribuir a la identidad de carpelo (Pinyopich *et al.*, 2003). La disminución conjunta de la expresión de SHP1, SHP2, STK y AG en los mutantes *hua-pep* permitiría explicar un debilitamiento simultáneo de la especificación de óvulo y de carpelo en beneficio de la identidad de sépalo. Un sólido argumento a favor de esta interpretación parece la expresión ectópica de AP1 en óvulos transformados de *hua1 pep* (apartado IV.3.3; Fig. 65), lo que además conduce a la atractiva hipótesis de que la exclusión mutua entre las funciones florales A y C también sea válida respecto al óvulo. La presencia de la proteína AP1-GFP en óvulos convertidos en órganos de aspecto "foliar" es conspicua en los núcleos de sus células, de dimensiones y disposición irregulares, siendo algunas de ellas y sus núcleos de gran tamaño (Fig. 65 M-R), por lo que sugieren procesos de endoreduplicación, como sucede en los sépalos (Roeder *et al.*, 2010; Roeder *et al.*, 2012) y en las transformaciones de orientación sepaloide en el cuarto verticilo (capítulo 2).

Un aspecto importante del desarrollo del óvulo es el gran solapamiento genético con otros aspectos del desarrollo vegetal. En algunos casos, este solapamiento podría surgir de una predisposición a emplear rutas ya existentes en otros procesos, es decir, procesos homólogos. Por ejemplo, para la formación de los integumentos se requieren mecanismos de polaridad adaxial-abaxial similares a los que operan en las hojas (Kelley y Gasser, 2009 y referencias ahí incluidas). Por tanto, con la aparición de las flores en las angiospermas, además de un sistema para discriminar entre óvulo y pistilo, se habría incorporado al programa de óvulo un mecanismo para limitar a la función A, y con ello prevenir el desarrollo de características de sépalo. De hecho, AG y los genes de función D (SHP y STK) podrían cooperar en esta tarea, dado el carácter "carpeloidizante" anteriormente aludido de estos últimos (Pinyopich *et al.*, 2003). Es verosímil que la reducción extrema de AG, SHP1, SHP2 y STK en genotipos como *hua1 hua2 35::PEP* (Fig. 64 A) permita la expansión del dominio de AP1, explicando que en todas sus flores aparezcan conversiones homeóticas de carácter sepaloide en sus óvulos. En éste y en otros genotipos mutantes *hua-pep*, la actividad de AG no desaparece completamente, generando en ocasiones rasgos carpeloides en óvulos transformados. Esta situación se asemeja a la descrita para el cuarto verticilo en los mutantes *hua-pep* (capítulo 2), donde pueden aparecer en el mismo órgano facetas carpelares (ej. papilas estigmáticas) y sepaloideas (ej. células estriadas gigantes).

## V.6.- LA ACTIVIDAD *HUA-PEP* CONDICIONA LA VIABILIDAD DE LOS ÓVULOS AL MARGEN DE LAS CONVERSIONES HOMEÓTICAS Y AFECTA AL DESARROLLO DEL GAMETÓFITO FEMENINO

El desarrollo de los óvulos se puede perturbar de múltiples maneras. El triple mutante *shp1 shp2 stk* es virtualmente estéril aunque no todos sus óvulos se transforman en estructuras carpelares. Sin embargo, muestra un elevado porcentaje de óvulos abortados (Pinyopich *et al.*, 2003). Esto sucede también en estirpes *hua-pep* como *hua1 pep*, *hua1 hua2*, *hua1 hua2 pep/+* y *hua1 hua2 35S::PEP*, pródigas en conversiones de óvulos. En otra batería de ensayos genéticos con estirpes con nula o escasísima incidencia de conversiones homeóticas (apartado IV.3.4.1), también comprobamos que las mutaciones *pep*, *hua2* y *flk* provocan la interrupción o degeneración del desarrollo de los óvulos. Aunque baja, la incidencia de este fenotipo en los mutantes simples *flk* y *pep*, así como en el doble *flk pep*, es superior a la de los alelos *hua2*, que muestran niveles silvestres. Contrasta, por tanto, el efecto sinérgico de estas mutaciones en el porcentaje de óvulos abortados en combinaciones como *hua2-4 pep-4*, *flk hua2-4*, *flk hua2-7*, *flk hua2-4 pep-4* o *hua2-7 pep-4/+* (Tabla 4). Esto podría ser un indicio de que *HUA2*, junto con alguno de sus homólogos *HULK1*, *HULK2* o *HULK3* (*HUA2-like*; Janakirama, 2013), participa en una vía paralela a *PEP* y *FLK* (ver más adelante).

El gran aumento en la proporción de óvulos abortados tras la eliminación de *PEP* en un fondo *ag/+* (*pep-4 ag-12/+*) es otra importante evidencia de que la actividad *HUA-PEP* puede comprometer la viabilidad de los óvulos sin llegar a alterar su identidad. Las causas pueden ser múltiples, pero nuestros ensayos de cruces recíprocos indican que la fase haploide es particularmente sensible a la perturbación de la actividad *HUA-PEP* (apartado IV.3.5.1). El desarrollo del óvulo en sí y del gametófito que se desarrolla en su seno se encuentran íntimamente interrelacionados (Chevalier *et al.*, 2011; Muralla *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2013). La letalidad gametofítica femenina de combinaciones *hua2 pep*, *ag pep* y otras (datos no mostrados) explica en gran medida la proporción de óvulos abortados.

Que elementos de la actividad *HUA-PEP*, presuntamente relacionados con el procesamiento del RNA, sean críticos para la viabilidad gametofítica recuerda a otros ejemplos de la bibliografía. Así, las plantas heterocigóticas para las mutaciones *lachesis* (*lis*) y *clotho* (*clo*), afectadas en sendos homólogos de factores de *splicing*, producen semillas y óvulos abortados en proporción 1:1, debido a letalidad gametofítica femenina (Groß-Hardt *et al.*, 2007; Moll *et al.*, 2008; Völz *et al.*, 2012). Recientemente, se ha comprobado que los alelos mutantes de *ROOT INITIATION*

*DEFECTIVE1 (RID1)*, que codifica una helicasa implicada en la escisión de intrones, no se transmiten a través del parental femenino y provocan una leve disminución a través del polen (Ohtani *et al.*, 2013), muy similar a lo que ocurre con los gametos *hua2-7 pep-4*, entre otros. Estos estudios sugieren que aspectos específicos del desarrollo, como la organogénesis floral y la formación de gametos, son muy susceptibles a los defectos del procesamiento de RNA.

Las dianas de estos genes y de los elementos de la actividad *HUA-PEP* pueden ser muy diversas. Entre ellos podrían encontrarse algunos factores MADS-box de tipo I, implicados en el desarrollo del gametófito, el embrión y el endospermo (Masiero *et al.*, 2011). Evidentemente, también *AG* y sus dianas son claros candidatos. Uno de ellos, *SPL/NZZ*, ha sido implicado en el control del destino de las células germinales. En los primordios de óvulo de los mutantes *spl* se forman las células precursoras de las células madre de la megaspora (MMC), pero se detiene su desarrollo, generando la ausencia de la línea germinal (Yang *et al.*, 1999). La disminución tanto de *AG* como de *SPL* encajaría con la reducción, total o parcial de la viabilidad gametofítica observada en nuestros mutantes *hua-pep*.

Los gametos *pep-4 ag-12* no son transmisibles a través del gametófito femenino, mientras que los gametos *ag-12* sí lo son (apartado IV.3.5.2). Esto sugiere un efecto adicional sobre otros genes, independiente de *AG*. Estos podrían ser *AGL6*, con un gran intrón 1 con secuencias reguladoras (Schauer *et al.*, 2009) o *SHP1*, *SHP2*, *STK* y los genes *SEP*. El silenciamiento de *SHP1*, *SHP2*, *STK* conduce a la ausencia de expresión de *VERDANDI (VDD)*, un gen importante para la especificación de la identidad celular en el gametófito femenino (Matías-Hernández *et al.*, 2010), aunque recientemente ha sido identificado también como diana directa de *AG* (Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2013 b).

Los defectos del gametófito femenino, los abortos de óvulo y sus conversiones homeóticas pueden ser efectos relacionados. La perturbación de los genes *HUA-PEP* puede conducir a alteraciones en la expresión de genes fundamentales en la adquisición de identidad de óvulo, pero también necesarios para la activación de funciones requeridas posteriormente para su correcto desarrollo, lo que incluye al gametófito. Alteraciones profundas de los niveles de *AG*, genes de función D y *SEP* podrían llegar a generar una conversión homeótica del órgano, mientras que alteraciones menores podrían provocar diversos defectos de maduración, los cuales se manifestarían como abortos.

Probablemente sucede algo similar en los estambres. Algunas estirpes mutantes *hua-pep* en las que nunca se registran conversiones petaloides en el tercer verticilo (*flk pep-4*, *flk hua2-4 pep-4*, *pep-2*) sí muestran rasgos indicativos de retraso

en la maduración de las anteras y el alargamiento de los filamentos. En combinaciones más severas (ej.: *hua1 hua2*, *hua1 hua2 pep/+*), los estambres que no experimentan transformación a pétalo suelen presentar estas características (datos no mostrados). En este sentido, cabe recordar que *AG* coordina el desarrollo de óvulos y estambres y que, como otros genes selectores homeóticos, controla la morfogénesis en distintos niveles (Ito *et al.*, 2007). Así, *AG* activa distintas cascadas transcripcionales para adquirir identidad de estambre y para su posterior diferenciación (Ito *et al.*, 2004, 2007). *SPL* es inducido por *AG* y desempeña un importante papel en la maduración de anteras y la formación de gametos (Ito *et al.*, 2004). Además, *AG* controla el desarrollo tardío del estambre estimulando la vía del ácido jasmónico (Ito *et al.*, 2007), la cual induce a su vez la expresión de múltiples genes involucrados en distintos aspectos de la maduración de los estambres, como *MYB21* y *MYB24*, los cuales inducen el crecimiento del filamento y la dehiscencia de la antera (Wilson y Zhang, 2009). Es muy interesante que tanto en *pep-4* como en *35S::PEP* disminuye notoriamente la expresión de ambos genes (resultados no publicados de nuestro laboratorio).

#### **V.7.- *FLK*, UN MIEMBRO ADICIONAL DE LA ACTIVIDAD *HUA-PEP***

La implicación de *FLK* en la viabilidad de los óvulos, así como su impacto junto a *HUA2* y *PEP* en el desarrollo vegetativo (apartado IV.3.4.1 y resultados no mostrados) sugiere su inclusión en la actividad *HUA-PEP*. Resulta muy elocuente que en el fondo doble mutante *hua2-4 pep-4*, la eliminación de *FLK* eleve de un 45% a un 77% el porcentaje de abortos de óvulo, e incluso conduzca a la aparición ocasional de transformaciones homeóticas de óvulo (sección IV.3.4.2). En lugar de actuar en sentido opuesto a *PEP* y *HUA2*, como en la regulación del tiempo de floración, *FLK* parece mostrar redundancia respecto a otras operaciones del desarrollo. Esta idea se refuerza ostensiblemente en el triple homocigoto mutante *flk hua1 hua2-7* (Fig. 68; sección IV.3.4.3). La inclusión de *flk* genera un intenso fenotipo de pérdida de actividad C respecto a *hua1 hua2-7*, recordando al triple mutante *hen4 hua1 hua2* (Cheng *et al.*, 2003). El fondo doble mutante *hua1 hua2* ha sido utilizado en diversas ocasiones para revelar nuevas actividades génicas involucradas en el desarrollo floral, tanto en la identidad de sus órganos como en la determinación del meristemo floral (Cheng *et al.*, 2003, Ji *et al.*, 2011 a). Estos datos de naturaleza genética se hallan en sintonía con las interacciones físicas de *FLK* con elementos de la actividad *HUA-PEP*, reforzando de nuevo su inclusión en este grupo.

A pesar de su aparente redundancia funcional durante el desarrollo de flores y óvulos, *FLK* ejerce un papel antagonista (al menos respecto a *PEP* y *HUA2*) regulando a *FLC*. Esta disparidad no carece de precedentes. En *Arabidopsis*, presuntos factores de transcripción SR (*serine/arginine rich*) y la hnRNP *AtGRP8* poseen efectos antagonistas y cooperativos (Streitner *et al.*, 2012). *IND* y *HECATE3* (*HEC3*), dos genes bHLH parálogos cercanos, muestran efectos opuestos o solapantes dependiendo del tejido o estructura sobre los que actúan durante el desarrollo reproductivo (Kay *et al.*, 2013). Los genes MADS-box *AGL24* y *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*) también son parálogos muy cercanos con efectos contrapuestos en el tiempo de floración, siendo el primero un activador y el segundo un represor. *AGL24* promueve la identidad de inflorescencia, siendo reprimido por *AP1* y *LFY* para establecer la identidad de meristemo floral. No obstante, posteriormente *AGL24* y *SVP* cooperan con *AP1* regulando negativamente a *AG* durante las primeras etapas del desarrollo floral (Gregis *et al.*, 2006). Este dinamismo funcional entre genes MADS-box puede incluir a las funciones florales B y C. *AG* y *AP3/PI* tienen funciones solapantes especificando los primordios de estambre y pueden formar parte de los mismos complejos, no obstante muchos genes que promueven el desarrollo carpelar son activados por *AG* pero reprimidos por *AP3/PI* (Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2013 b). A su vez, la versatilidad funcional de la actividad *HUA-PEP* puede ser muy conveniente para modular esta complejidad espacio-temporal. *HUA2* y *PEP* activan a represores florales de tipo MADS-box (Doyle *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2009), *SVP* entre ellos (Doyle *et al.*, 2005), para luego activar a genes como *AG*, fundamentales para el desarrollo floral (Cheng *et al.*, 2003; esta Tesis). Será interesante comprobar si *FLK* ejerce efectos moleculares sobre estos genes y si son redundantes respecto a los otros integrantes de la actividad *HUA-PEP*.

## **V.8.- MECANISMO DE ACCIÓN MOLECULAR DE PEP Y EL CONJUNTO DE LA ACTIVIDAD HUA-PEP**

Nuestros resultados indican que *PEP*, junto con otros miembros de la actividad *HUA-PEP*, regula procesos reproductivos como el tiempo de floración, la organogénesis floral y el desarrollo de óvulos. Sus mutaciones generan fenotipos coherentes con las alteraciones de la expresión de genes MADS-box capitales en dichos procesos, como *FLC*, *AG*, *SHP1*, *SHP2* y *STK*, entre otros. Anteriormente se comprobó que la proteína *HUA1* muestra afinidad por el RNA de *AG* e interacciona físicamente con *HEN4* (Cheng *et al.*, 2003). Nosotros corroboramos esta interacción y mostramos que ambas



proteínas son capaces de formar heterodímeros con PEP y FLK. Por todo ello resulta razonable concebir una influencia directa de estas proteínas sobre la producción del transcrito de *AG* y otros genes diana. Además de implicar a *PEP*, también nuestros resultados son coincidentes en cuanto a que en las combinaciones mutantes *hua-pep* la disminución de los niveles del mRNA efectivo de *AG* se ve acompañada por la producción de transcritos que retienen secuencias intrónicas debido a la poliadenilación en posiciones del intrón 2 (Cheng *et al.*, 2003; esta Tesis). Los transcritos detectados mediante RACE no son coincidentes con los de Cheng *et al.* (2003), lo que puede deberse a polimorfismos de secuencia o diferencias de estabilidad entre *Ler* y *Col-0*. El corte y poliadenilación del pre-mRNA depende del reconocimiento de una serie precisa de motivos de secuencia (Millevoi y Vagner, 2010). Nosotros clonamos un transcrito poliadenilado en la posición 363 del intrón 2. Este punto se haya circundado por motivos cuya implicación en el proceso resulta muy verosímil dada su secuencia y disposición (sección IV.2.3.4; Fig. 58; Loke *et al.*, 2005; Proudfoot, 2011).

Una faceta común a diversos genes MADS-box es la presencia de un intrón inusualmente grande en plantas (2-4 Kb) donde, como sucede en *AG*, pueden residir motivos de secuencia determinantes para su correcta expresión espacio-temporal (Sieburth y Meyerowitz, 1997; Sheldon *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003; Kooiker *et al.*, 2005; Causier *et al.*, 2009; Schauer *et al.*, 2009). En el caso de *AG*, se ha constatado que varias secuencias reguladoras intrónicas se mantienen en genes de función C de otras especies (Causier *et al.*, 2009). Esto plantea la necesidad de proteger al transcrito naciente del riesgo de procesamiento prematuro, ocasionado por secuencias crípticas, reconocibles por la maquinaria de *splicing*, corte y poliadenilación, etc. (Kaida *et al.*, 2010). Cada vez disponemos de más evidencias de que la maduración de los transcritos es mayoritariamente cotranscripcional, lo que aumenta la fidelidad de la operación (Singh y Padgett, 2009; Dahan *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011; Albulescu *et al.*, 2012; Elkon *et al.*, 2013; Tian y Manley, 2013).

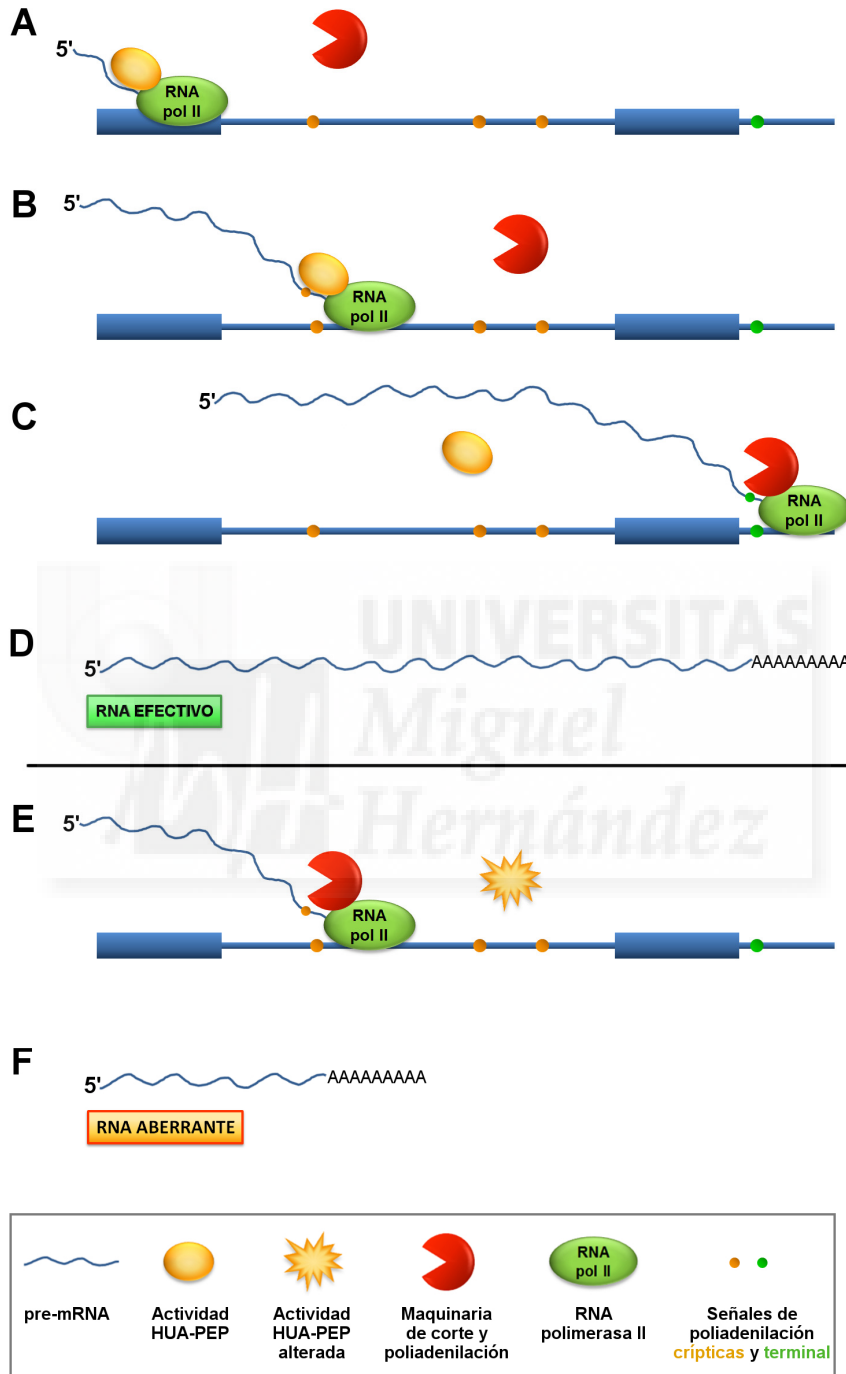
Nuestros resultados genéticos y moleculares indican una fuerte correlación entre la intensidad de los fenotipos mutantes *hua-pep*, los niveles decrecientes del transcrito efectivo de *AG* y el aumento relativo de transcritos de *AG* con secuencias intrónicas. Proponemos que la actividad *HUA-PEP* cumple un papel promoviendo la transcripción de *AG* y “ocultando” señales crípticas de procesamiento en el transcrito naciente (Fig. 74 A-D) que, de otro modo, serían reconocibles por la maquinaria de procesamiento, como ocurre en mayor o menor medida cuando se produce una disfunción de la actividad *HUA-PEP*, produciendo transcritos no efectivos terminados prematuramente (Fig. 74 E-F). En el marco de esta interpretación, la proteína PEP

desempeñaría un destacado papel. Nos basamos en el profundo impacto que la alteración de su expresión provoca en la acumulación de transcritos con secuencias intrónicas de AG en el fondo mutante *hua1 hua2* (Fig. 57; sección IV.2.3.4), así como efectos similares en otros genes como *SHP1* (Fig. 64; sección IV.3.2) y *FLC* (Ripoll *et al.*, 2009 y datos no mostrados de nuestro laboratorio). Además, nuestra hipótesis guarda gran coherencia con la reciente caracterización de las PCBP de mamíferos como reguladores globales de la poliadenilación alternativa, donde su reducción conduce a la utilización de posiciones intrónicas crípticas con una secuencia AAUAAA inmediatamente anterior (Ji *et al.*, 2013). La proteína K (hnRNP K) suprime el uso de un lugar prematuro de poliadenilación en el RNA largo no codificante (*Long non coding RNA*, lncRNA) NEAT1, lo que rendiría un producto mucho más corto e ineficaz, llevando a la desintegración de un tipo de cuerpos nucleares (*paraspeckles*; Naganuma *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha comprobado en muchas ocasiones que la escisión de intrones y la poliadenilación cotranscripcional son interdependientes (Kaida *et al.*, 2010; Albulescu *et al.*, 2012; Elkon *et al.*, 2013; Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013), por lo que podríamos considerar que PEP (y otros factores HUA-PEP) favorecen el *splicing*, para lo que no se carece de antecedentes entre las PCBP (Makeyev y Liebhaber, 2002; Mikula y Bomsztyk, 2011), al “secuestrar” los puntos de poliadenilación crípticos. Además HUA2 y sus homólogos (HULK1, HULK2 y HULK3) interaccionan en levaduras con factores de *splicing* y se ha sugerido su papel en la regulación del procesamiento del extremo 3' en el pre-mRNA (Janakirama, 2013).

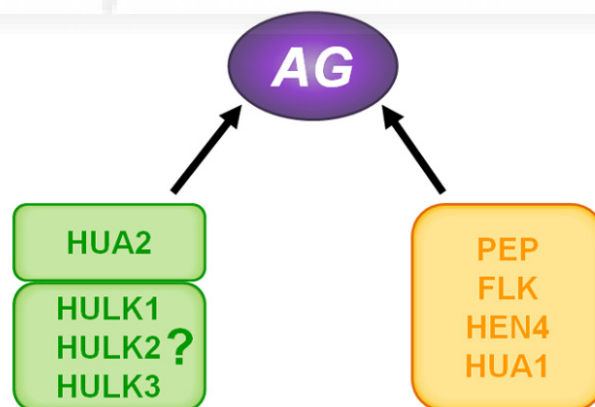
El acoplamiento de distintos procesos es una estrategia económica que permite a los sistemas biológicos responder de forma sólida y precisa frente a las perturbaciones genéticas o ambientales. En eucariotas es fundamental el dominio C-terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II, la cual ejerce un papel clave en la coordinación de la transcripción y las diversas operaciones de maduración del transcrito (Hsin y Manley, 2012). HUA2 posee un dominio RPR (también referido como *CTD-Interaction Domain*, CID) e interactúa con las repeticiones de “héptadas” de aminoácidos característicos del CTD (Hsin y Manley, 2012; Janakirama, 2013). Probablemente esto explica la autoactivación de HUA2 en levaduras (Cheng *et al.*, 2003; Janakirama, 2013). PEP comparte este rasgo con HUA2 (esta Tesis y resultados no mostrados), aunque no se ha detectado su interacción con el CTD de la RNA polimerasa II. Es posible que PEP interactúe con el CTD de manera indirecta. Es muy sugerente el caso de la proteína KH de *Arabidopsis* SHI1. Ésta interactúa con una fosfatasa que defosforila residuos crípticos del CTD regulando negativamente la transcripción de genes relacionados con estrés abiótico al prevenir su maduración en

5' (Jiang *et al.*, 2013). Además, se ha verificado que interacciona con factores de splicing de tipo SR, afectando este tipo de procesamiento en numerosos genes relacionados con estrés abiótico (Chen *et al.*, 2013). Esta proteína también tiene una elevada capacidad de autoactivación en levaduras (Jiang *et al.*, 2013).



**Figura 74.-** Modelo de actuación de los miembros de la actividad *HUA-PEP* durante la síntesis del mRNA. **A-D)** La actividad *HUA-PEP* protege al RNA nascente de sufrir procesamiento inadecuado, interfiriendo con el posible reconocimiento de señales crípticas de *splicing* o poliadenilación inapropiada debido a la presencia de señales crípticas en el intrón (B). Esto permite alcanzar el extremo del gen y la correcta adición de la cola poliA en el extremo 3' del RNA (C), obteniéndose así un mRNA efectivo (D). **E)** y **F)** Sin embargo, una actividad *HUA-PEP* alterada no es tan eficaz evitando el reconocimiento de señales crípticas, produciéndose un procesamiento prematuro de la transcripción (E), lo que resulta en la síntesis de un mRNA aberrante e inefectivo (F).

Por último, aunque no son demostrativos, algunos de nuestros resultados nos sugieren que HUA2 de un lado, y otros polipéptidos HUA-PEP por otro, podrían formar parte de distintos complejos, afectando a AG y al resto de sus potenciales genes diana, quizá en rutas paralelas (Fig. 75). Nos induce a considerarlo así el hecho de que ni nosotros ni otros autores hayamos detectado una interacción física entre HUA2 y los restantes miembros de la propuesta actividad *HUA-PEP* (Janakirama, 2013; esta Tesis, resultados no mostrados). Por el contrario, PEP, FLK, HUA1, y HEN4 forman heterodímeros *in planta* (Cheng *et al.*, 2003; esta Tesis). Otro indicio es el efecto tan potente que tienen las mutaciones *hua2* en fondos mutantes *flk*, *pep* o *flk pep* respecto a la viabilidad de los óvulos, lo que contrasta con el fenotipo silvestre de sus mutantes simples, y sobre todo la inviabilidad del doble mutante *hua2-7 pep-4* (sección IV.2.2.4). Igualmente, la presencia de mutaciones *hua2* en combinaciones *hua-pep* las convierte comparativamente en más severas con relación a otras del mismo orden (dobles, triples, etc.) con una función *HUA2* intacta. *HUA2* es parcialmente redundante con sus homólogos *HULK1*, *HULK2* y *HULK3* (Janakirama, 2013), lo que explicaría su falta de fenotipo en el mutante simple. Al alterar simultáneamente la función *HUA2* y un elemento de la otra vía paralela, particularmente *PEP*, estaríamos comprometiendo dos vías redundantes (Fig. 75), rebasando críticamente un umbral del sistema que llevaría a un fenotipo reconocible (morfológico y/o molecular) más o menos severo o incluso a la letalidad.



**Figura 75.-** Modelo hipotético que muestra la separación de la actividad HUA-PEP en dos subactividades. Una de ellas estaría integrada por los polipéptidos mostrados en el recuadro naranja, para los cuales se ha constatado interacción física entre ellos. La otra subactividad estaría compuesta por HUA2 y, presumiblemente, sus homólogos HULK (Janakirama, 2013). Ambas operarían de manera convergente sobre AG y otros genes diana.

Conocer cómo se coordina la transcripción con los distintos procesos de maduración de transcritos que la acompañan es de un gran interés para una comprensión global de los mecanismos de regulación génica. Por ello, resulta muy

atractiva la perspectiva de una mayor profundización en los aspectos genéticos y moleculares de las relaciones entre *PEP* y el resto de los integrantes de la actividad *HUA-PEP*, así como con sus presuntas dianas. Igualmente, otro objetivo deseable para futuros esfuerzos es la identificación de nuevos componentes de esta maquinaria genética, dada la importancia fundamental de los procesos del desarrollo reproductivo en los que intervienen.



## **VI.- CONCLUSIONES**







## VI.- CONCLUSIONES

1. *PEP*, un gen KH que codifica una hnRNP de tipo PCBP, se comporta como regulador negativo de la floración, actuando de manera opuesta a su parólogo *FLK* y en concierto con el gen RPR *HUA2*, activando al gen MADS-box *FLC*, un inhibidor central de la floración
2. *PEP* y *FLK* interaccionan genéticamente con *HEN4*, *HUA1* y *HUA2*, genes que codifican otras proteínas de unión a RNA, regulando distintos programas de desarrollo reproductivo
3. Los productos de *PEP* y *FLK* interaccionan físicamente entre sí y con las proteínas *HEN4* y *HUA1*
4. Proponemos la existencia de una actividad que hemos denominado *HUA-PEP* formada (al menos) por las proteínas *PEP*, *FLK*, *HEN4*, *HUA1* y *HUA2*, que opera en el mantenimiento de la función de *FLC*, *AG* y muy probablemente otros factores de transcripción de tipo MADS-box cruciales en el desarrollo reproductivo de la planta
5. Las plantas derivadas de distintas combinaciones mutantes *hua-pep* indican que *PEP* participa en el mantenimiento de la función floral C, provocando tanto su pérdida de función como su sobreexpresión defectos de identidad en estambres y carpelos y pérdida de determinación del meristemo floral
6. *PEP* regula positivamente a *AG*. Como un constituyente importante de la actividad *HUA-PEP*, su perturbación conduce a la disminución del mRNA efectivo de *AG* y la acumulación de transcritos poliadenilados prematuramente en el intrón 2
7. La actividad *HUA-PEP* controla aspectos fundamentales del desarrollo de los óvulos, incluyendo su adquisición de identidad y la viabilidad del gametófito femenino
8. La actividad *HUA-PEP* regula positivamente a los genes MADS-box de función D, *SHP1*, *SHP2* y *STK*

**9.** El gen *FLK*, además de su función como regulador de la floración, coopera con otros miembros de la actividad *HUA-PEP* en la organogénesis floral y el desarrollo de los óvulos

**10.** La caracterización funcional de la actividad génica *HUA-PEP* pone de relieve la importancia de la modulación de la transcripción y el procesamiento cotranscripcional, efectuado por proteínas polifacéticas de unión a RNA, durante el desarrollo vegetal



## **VII.- MATERIALES Y MÉTODOS**





## VII.1.- ORGANISMOS UTILIZADOS

### VII.1.1.- *Arabidopsis thaliana*

#### VII.1.1.1.- Estirpes de *Arabidopsis thaliana*

A lo largo de este trabajo, se ha empleado el acceso Columbia-0 (Col-0; Rédei, 1962) como la estirpe silvestre de referencia. En el capítulo 1 todas las líneas usadas pertenecen a este fondo genético. En los capítulos posteriores, cuando se empleó una estirpe procedente de otro fondo genético, se efectuó una introgresión previa en el fondo Col-0, mediante al menos 5 retrocruzamientos sucesivos con este parental.

Tanto las líneas silvestres como las mutantes utilizadas en esta Tesis han sido obtenidas a partir del centro de distribución de semillas europeo NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*, Norwich, Reino Unido), con excepción de las estirpes obtenidas en este laboratorio: *35S::PEP*; *35S::GFP-PEP* y *PEP::GUS*.

Tabla 6.- Líneas mutantes utilizadas.

Línea	Fondo genético	Código NASC	Mutágeno	Antibiótico/Herbicida	Referencia
<i>ag-12</i>	Col-0	N304499	T-DNA	Sulfadiazina	Este trabajo
<i>fca-9</i>	Col-0	a	EMS	-	Page <i>et al.</i> , 1999
<i>flc-3</i>	Col-0	b	Neutrones rápidos	-	Michaels y Amasino, 1999
<i>flk-2</i>	Col-0	N501523	T-DNA	-	Lim <i>et al.</i> , 2004
<i>ful-1</i>	Ler	N3759	Transposón <i>Ds</i>	-	Gu <i>et al.</i> , 1998
<i>hen4-2</i>	Ler	c	EMS	-	Cheng <i>et al.</i> , 2003
<i>hua1-1</i>	Ler	c	EMS	-	Chen y Meyerowitz, 1999
<i>hua2-1</i>	Ler	c	EMS	-	Chen y Meyerowitz, 1999
<i>hua2-4</i>	Col-0	N656341	T-DNA	-	Doyle, <i>et al.</i> , 2005
<i>hua2-7</i>	Col-0	N873073	T-DNA	Basta	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>pep-2</i>	Col-0	F09_517	T-DNA	Basta	Ripoll <i>et al.</i> , 2006
<i>pep-4</i>	Col-0	N555265	T-DNA	Kanamicina	Ripoll <i>et al.</i> , 2006

a: enviado por Caroline Dean; b: enviado por Scott Michaels; c: enviado por Xuemei Chen

Tabla 7.- Líneas de sobreexpresión y marcadoras.

Línea	Fondo genético	Antibiótico	Referencia
<i>35S::PEP</i>	Col-0	Kanamicina	Ripoll <i>et al.</i> , 2009
<i>35S::GFP-PEP</i>	Col-0	Kanamicina	Ripoll <i>et al.</i> , 2009
<i>AG::AG-GFP<sup>a</sup></i>	Col-0	Higromicina	Urbanus <i>et al.</i> , 2009
<i>AP1::AP1-GFP<sup>a</sup></i>	Col-0	Higromicina	Urbanus <i>et al.</i> , 2009
<i>FUL::GUS / ful-1</i>	Ler	Kanamicina	Gu <i>et al.</i> , 1998
<i>PEP::GUS</i>	Col-0	Higromicina	Ripoll <i>et al.</i> , 2006

a: enviado por Gerco Angenent y Richard Immink

### VII.1.1.2.- Cultivo en placas de Petri

La siembra de las semillas se realizó en una cámara de cultivo de flujo horizontal. Se esterilizaron en una solución de lejía convencional al 40% y Triton-X100 al 0,1% durante 8 minutos, y después se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (Weigel y Glazebrook, 2002). Con ayuda de una pipeta Pasteur, se depositaron las semillas en placas de Petri con medio GM (apartado VII.2.1.1). Cuando fue necesario se añadieron distintos antibióticos para seleccionar líneas transgénicas resistentes a los mismos (kanamicina, higromicina o sulfadiazina). Tras la siembra, las placas se almacenaron 2 días a 4°C para favorecer una germinación homogénea. Tras esta estratificación, las placas se trasladaron a incubadores Sanyo MLR-351, en unas condiciones de 20-22°C, 60-70% de humedad y con iluminación continua de intensidad 130  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$  suministrada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Mitsubishi/Osram FL40SS W/37).

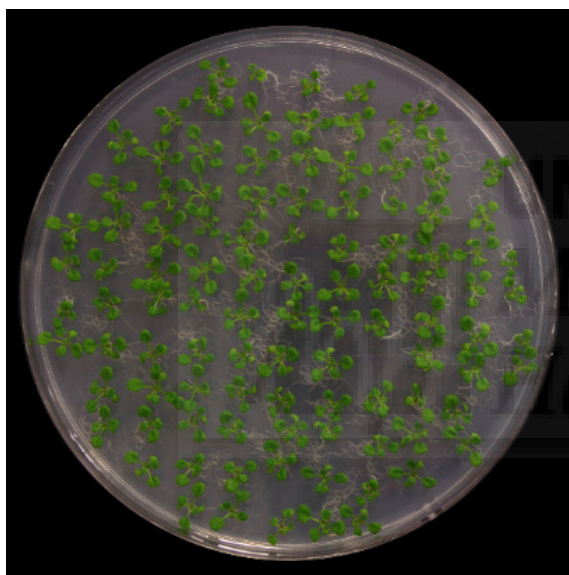


Figura 76. Cultivo en placa de *Arabidopsis*.

### VII.1.1.3.- Cultivo en maceta

Este método de cultivo se utilizó para permitir el desarrollo completo de las plantas que previamente habían sido sembradas en placas de Petri, donde el espacio es muy limitado. Así, tras un periodo de crecimiento de 2 o 3 semanas, las rosetas fueron trasplantadas a macetas con el sustrato indicado en el apartado VII.2.1.3 previamente autoclavado. Las macetas se colocaron en alveolos de plástico (Pöppelmann), y éstos en bandejas, las cuales contenían agua o el medio nutritivo ATM (apartado VII.2.1.2). El primer riego se realizó con solución ATM y se cubrió la bandeja con película de plástico transparente agujereado para evitar la vitrificación de las rosetas por exceso de humedad. Transcurridos 3-5 días se retiró el plástico, y los siguientes riegos se realizaron con agua una o dos veces por semana. Con objeto de



mantener cada planta separada del resto durante su crecimiento, se cultivaron con soportes y cilindros de plástico (Arasystem, Betatech). Las bandejas con las plantas se situaron en una cámara de cultivo a 20-22°C, 60-70% de humedad y luz continua de intensidad 130  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ , generada por tubos fluorescentes de luz blanca fría (Sylvania Standard F65W), donde completaron su ciclo vital.



**Figura 77.-** Plantas de *Arabidopsis* cultivadas en maceta. Puede observarse que algunas de ellas llevan cilindros y soportes de plástico.

#### **VII.1.1.4.- Realización de cruzamientos**

Para realizar cruzamientos entre plantas de distinto genotipo, se retiraron todos los órganos florales, excepto el pistilo, de una flor de la planta aceptora de polen (parental femenino), con ayuda de unas pinzas de disección y una lupa binocular (Leica Zoom 2000). A continuación, se tomó una flor en anthesis de la planta donante de polen (parental masculino), y se pusieron en contacto sus anteras con el pistilo de la flor aceptora. Tras la maduración del fruto resultante, éste se recogió y se conservó a 4°C en un tubo *ependorf*.

#### **VII.1.1.5.- Medidas de tiempo de floración**

En los ensayos de medida del tiempo de floración en día corto (*Short Day*, SD) se utilizaron condiciones estándar de 8 horas de luz frente a 16 de oscuridad. Conviene resaltar que para el régimen de día largo (*Long Day*, LD), en lugar de 16 horas de iluminación frente a 8 de oscuridad, se empleó un régimen de luz continua. El cultivo en luz continua representa las condiciones habituales de nuestro laboratorio, y las respuestas de las plantas a este régimen

de iluminación respecto al tiempo de floración son equivalentes a las de un fotoperiodo típico de 16 horas de luz frente a 8 de oscuridad (Ratcliffe *et al.*, 2001).

Las semillas de los distintos genotipos se sembraron el mismo día en placas de Petri (apartado VII.1.1.2) y se estratificaron a 4°C durante dos días, para luego trasladarlas a un incubador Sanyo MLR-351 a 20-22°C programado con las horas de luz adecuadas para cada experimento. A los 14 días se trasplantaron a bandejas de macetas con tierra (apartado VII.1.1.3), que se situaron en el mismo incubador en el que habían germinado.

Para determinar el tiempo de floración utilizamos dos criterios: el número de días transcurridos desde que se ubicaron las semillas a 20-22°C hasta la aparición de las primeras flores (inicio del alzado), y el número de hojas presentes en la roseta en ese momento, ya que existe una buena correlación entre ambos criterios en las plantas silvestres (Weigel y Glazebrook, 2002). Una vez visualizadas las primeras flores con ayuda de una lupa binocular (Leica Zoom 2000), se anotó el número de días que había estado cada planta en el incubador, así como el número de hojas formadas en la roseta.

Se analizaron al menos 40 plantas para cada genotipo, excepto del mutante *fca-9 35S::PEP*, del que se realizó un recuento sobre 18 plantas. De los datos acumulados se obtuvo la media aritmética, así como la desviación estándar (DE) mediante el programa Microsoft Excel 2010.

#### **VII.1.1.6.- Tratamiento de vernalización**

Para comprobar el efecto sobre la floración de un periodo prolongado de frío, se realizaron tratamientos de vernalización tal y como se describe en Ratcliffe *et al.*, 2001, aunque en nuestro caso la exposición a 4°C fue de 5 semanas, antes de trasladar las plantas a una cámara a 20-22°C.

#### **VII.1.1.7.- Tratamiento con giberelinas (GA)**

Para analizar un posible efecto de las giberelinas sobre el tiempo de floración, las plantas objeto de estudio fueron pulverizadas con GA<sub>3</sub> 20 µM dos veces por semana hasta el alzado de la inflorescencia principal (Lim *et al.*, 2004).

#### **VII.1.1.8.- Selección de plantas resistentes a Basta**

Se utilizó una solución del herbicida Basta (glufosinato de amonio) 200 µM diluido en agua (Tabla 8), que fue pulverizada 2 ó 3 veces por semana sobre las rosetas a seleccionar. Cuando se pudieron distinguir claramente las plantas moribundas de las verdes y saludables, éstas se

trasplantaron a macetas nuevas. Se continuó con la pulverización con Basta durante 1 ó 2 semanas más para eliminar falsos positivos.

## **VII.1.2.- Organismos bacterianos**

### **VII.1.2.1.- Estirpes utilizadas**

Las células de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo se denominan SoloPac, pertenecientes al kit *StrataClone PCR Cloning* (StrataGene). En cuanto a *Agrobacterium tumefaciens*, se utilizó la cepa C58C1 para generar plantas con la construcción 35S::GFP-PEP (apartado VII.7), y la cepa AGL0 en los ensayos de BiFC (apartado VII.6.2).

### **VII.1.2.2.- Condiciones de cultivo de los organismos bacterianos**

Los cultivos en medio líquido se realizaron en recipientes llenándolos hasta la mitad de su capacidad como máximo, para garantizar una aireación suficiente durante su incubación. Ésta se realizó en un incubador de agitación orbital, a 250 rpm. Para *Escherichia coli* se utilizaron 37°C durante toda la noche, mientras que para *Agrobacterium tumefaciens* la temperatura fue de 28-30°C durante el tiempo requerido para alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm entre 0,8 a 1,2, según el caso (ver apartado VII.7). En el caso de los cultivos sólidos en placas de Petri, la inoculación de las mismas tuvo lugar con un asa de siembra en condiciones estériles. Las placas se incubaron a las mismas temperaturas que los cultivos líquidos.

## **VII.2.- MEDIOS DE CULTIVO, DISOLUCIONES Y TAMPONES**

Todas las disoluciones se realizaron con agua destilada (agua purificada para laboratorios, Grifols). Las esterilizaciones mediante autoclave tuvieron lugar a 121°C durante 20 minutos y a 100 KPa.

### **VII.2.1.- Medios de cultivo**

#### **VII.2.1.1- Medio de germinación de *Arabidopsis* (Medio GM)**

Medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) 2,15 g/L (Duchefa); sacarosa 1%; MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 0,5 g/L; agar para plantas (Duchefa) 0,8% (m/v), se

ajustó a pH 6 con KOH 1 M. A continuación se autoclavó, y después se vertió en placas de Petri de 140 mm de diámetro. En caso de requerir el uso de un antibiótico como elemento selector de genotipos resistentes, se dejó atemperar en un baño a unos 50°C, y se incorporó el antibiótico necesario (Tabla 8). Las placas se almacenaron en una bolsa precintada a 4°C.

#### **VII.2.1.2.- Medio mínimo ATM (*Arabidopsis thaliana Medium*)**

Este medio fue utilizado para regar las macetas en el momento de trasplantar. Su composición es la siguiente: Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 mM; Fe-Na (EDTA) 51 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM; KNO<sub>3</sub> 5 mM; MgSO<sub>4</sub> 2 mM; CoCl<sub>2</sub> 0,01 μM; CuSO<sub>4</sub> 0,5 μM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 μM; MnCl<sub>2</sub> 14 μM; NaCl 10 μM; NaMoO<sub>4</sub> 0,2 μM; ZnSO<sub>4</sub> 1 μM (Kranz y Kirchheim, 1987).

Las soluciones madre se prepararon diluyendo cada componente en agua destilada, y se esterilizaron mediante filtración. Se conservaron a 4°C.

#### **VII.2.1.3.- Sustrato para el cultivo de *Arabidopsis* en maceta**

Se realizó una mezcla de perlita, vermiculita y turba (2:2:1) en bolsas de plástico, y posteriormente se esterilizó en el autoclave.

#### **VII.2.1.4.- Medio LB (*Luria-Bertani medium*)**

Este medio se utilizó para realizar cultivos líquidos de bacterias. Su composición es NaCl 1% (m/v), extracto de levadura 0,5% (m/v) y triptona 1% (m/v) diluidos en agua destilada, con un pH de 7,5. Se autoclavó envasado en botes estériles, pudiendo conservarse a 4°C durante varios meses.

#### **VII.2.1.5.- Medio LB sólido**

Para obtener este medio se añadió agar bacteriológico europeo (Duchefa) con una concentración 1,5% (m/v) al medio LB líquido (apartado VII.2.1.4). Se autoclavó, y después se vertió en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Éstas se conservaron en bolsas precintadas a 4°C.

### VII.2.1.6.- Medio LB suplementado con antibiótico

En los casos en los que fue necesario, se emplearon distintos antibióticos (Tabla 8), incorporándolos al medio de cultivo LB (líquido o sólido; apartados VII.2.1.4 y VII.2.1.5) tras autoclararlo y dejarlo atemperar a unos 50°C en un baño de agua.

### VII.2.2.- Disoluciones y tampones

#### VII.2.2.1.- Antibióticos

Las soluciones stock de estos antibióticos se prepararon en la cabina de flujo laminar, utilizando agua destilada y autoclavada como solvente. Antes de realizar alícuotas, se esterilizaron con un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (Millex GP, Millipore).

Tabla 8.- Agentes selectores utilizados.

Agente	Concentración stock (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)	Temperatura de almacenamiento (°C)
Ampicilina	100	100	-20
Basta	0,24	-	20-25
Higromicina	20	20	4
Kanamicina	50	25	-20
Sulfadiazina	7,5	7,5	-20

#### VII.2.2.2.- Solución de giberelina

Se utilizó ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) 20 µM (Sigma-Aldrich) diluido en etanol, y se dispuso en un frasco con un sistema de pulverización para su uso sobre las plantas.

#### VII.2.2.3.- X-gal 2%

Se diluyeron 0,2 g de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) en 10 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) en un vial de centelleo protegido de la luz, y se almacenó a -20°C.

#### VII.2.2.4.- Solución de infiltración

Se resuspendieron los cultivos bacterianos en sacarosa 5% (m/v; preparada inmediatamente antes de su uso) y se añadió el detergente Silwet L-77 0,035% (v/v, Lehle Seeds).

#### VII.2.2.5.- Soluciones para técnicas histológicas

##### VII.2.2.5.1- Solución FAE (Formaldehído-Acético-Etanol)

Esta solución se utilizó para preservar los tejidos. Su composición es etanol 50%; formaldehído 3,7% y ácido acético glacial 5%, diluidos en agua destilada. Se conservó a temperatura ambiente.

##### VII.2.2.5.2.- Soluciones de JB4 Embedding Kit

Este kit fue empleado para realizar cortes histológicos de muestras incluidas en medio plástico. Está compuesto por: Solución A (monómero), Solución B (acelerador de la polimerización) y peróxido de benzoilo (agente catalítico), componentes que hay que combinar en los distintos pasos, según las instrucciones del fabricante (Electron Microscopy Sciences).

**Solución de infiltración:** se consigue mezclando el agente catalítico en la Solución A, con ayuda de un agitador magnético.

**Solución de inclusión:** se obtiene mezclando la solución de infiltración con la Solución B.

##### VII.2.2.5.3.- Soluciones para visualización en microscopio confocal

**Solución fijadora:** metanol y acetona en proporciones 1:1 (v/v).

**PBS 10X:**  $K_2PO_4$  19,4 mM;  $Na_2PO_4$  80,6 mM; KCl 27 mM y NaCl 1,37 M, diluido en agua destilada, a pH 7,4, y se esterilizó mediante el uso del autoclave.

##### VII.2.2.5.4.- Disoluciones para ensayos GUS

**Solución de lavado:** tampón  $NaPO_4$  25 mM; ferrocianuro 5 mM; ferricianuro 5 mM; tritón X-100 1%, diluido en agua destilada. Se preparó antes de realizar el revelado del GUS, en un recipiente protegido de la luz.

**Solución de revelado:** X-gluc 2 mM, diluido en solución de revelado. Se preparó inmediatamente antes de su uso, en un recipiente protegido de la luz y en hielo.

**X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido):** se disolvió el X-Gluc en polvo en N,N-dimetilformamida (DMF) en un vial de centelleo protegido de la luz, y se conservó a  $-20^\circ C$ .

#### **VII.2.2.5.5.- Solución de floroglucinol 2%**

Esta solución contiene floroglucinol 2% (m/v) en etanol 95%. El envase se conserva a temperatura ambiente y protegido de la luz.

#### **VII.2.2.5.6.- Soluciones para la tinción de Alexander**

**Solución de Carnoy:** etanol, cloroformo y ácido acético, en proporciones 6:3:1 (v/v).

**Solución de Alexander:** 54,5 ml agua destilada, 10 ml de etanol 95%, 25 ml glicerol, 4 ml ácido acético glacial, 1 ml verde malaquita (1% en etanol 95%), 5 ml fucsina ácida (1% en agua), 0,5 ml naranja G (1% en agua).

#### **VII.2.2.5.7.- Solución de aclarado Hoyer**

Los componentes de esta solución son 3,75 g de goma arábica, 2,5 ml de glicerol y 50 g de hidrato de cloral, diluidos en 15 ml de agua destilada (Weigel y Glazebrook, 2002). Se utilizó para aclarar frutos, mediante la incubación de los mismos en un tubo *ependorf* con 1 ml de solución.

#### **VII.2.2.6.- Tampón de extracción de DNA**

Esta solución está compuesta por Tris-HCl 200 mM HCl pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM pH 8 y SDS 0,5% (m/v) diluidos en agua destilada estéril. Se conservó a temperatura ambiente (basado en el protocolo *Quick DNA Prep for PCR*, de Weigel y Glazebrook, 2002).

#### **VII.2.2.7.- Disoluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa**

**Tampón TAE 50X:** Tris-base [Tris(hidroximetil)aminometano] 2 M; ácido acético glacial 5,71% (v/v); Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM pH 8. El pH final debe ser 7,6.

**Tampón de carga 6X:** glicerol 30% (v/v); azul de bromofeno 25% (m/v); xilenecianol 0,25% (m/v).

**Bromuro de etidio (10 mg/ml):** se diluyó el bromuro de etidio sólido en agua, y se conservó en un frasco protegido de la luz.



### **VII.3.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS**

Las fotografías mostradas en la presente Tesis fueron editadas con el programa de edición fotográfica Gimp 2.8.4, cuando fue necesario.

#### **VII.3.1.- Fotografías de bajo aumento**

Para documentar los distintos rasgos fenotípicos de las plantas se utilizó una cámara réflex digital Canon 1000D.

Un análisis pormenorizado de los fenotipos fue realizado con un estereomicroscopio Nikon SMZ1500, equipado con una unidad de iluminación de luz blanca fría Volpi Intralux 500-1, y conectada a una cámara digital Nikon Digital Camera DXM1200F, con la que se tomaron fotografías mediante el programa Nikon ACT-1 2.70 de captura digital.

#### **VII.3.2.- Microscopía óptica**

Las observaciones microscópicas fueron realizadas con un microscopio Nikon Eclipse E800. La captura de imágenes se realizó con cámara Nikon Digital Camera DXM1200F, conectada al microscopio, mediante el programa ACT-1 2.70.

##### **VII.3.2.1.- Inclusión en resina JB4**

Para este fin se utilizó *JB4 Embedding Kit* (Electron Microscopy Sciences), un medio de inclusión en plástico soluble en agua basado en glicol metacrilato (GMA), en el que se produce una polimerización exotérmica. Se siguieron las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones.

Para preservar la integridad del tejido objeto de estudio, se realizó un proceso de fijación del mismo. Para ello se introdujo la muestra en la solución fijadora FAE (apartado VII.2.2.5.1), y se aplicó presión mediante una bomba de vacío (500 mb durante 15 minutos para que la muestra se hunda, o hasta 45 minutos), para facilitar la penetración del FAE en las células. Trascurrido este paso, se dejó fuera de la bomba de vacío, a temperatura ambiente durante dos horas y media. Tras la fijación de las muestras, se procedió a deshidratarlas usando incubaciones en series de etanol con concentraciones ascendentes (etanol 70%, 80%, 90%, 95% y 100%) durante 30 minutos cada una a 4°C. Se utilizaron viales de centelleo para este proceso. Cuando fue necesaria la tinción de la muestra, se usó Eosina Y 0,2% (m/v,

Sigma-Aldrich) en etanol 95%, en lugar de etanol 95% sin colorante, y se incubó toda la noche a 4°C.

A continuación se realizaron dos incubaciones sucesivas durante toda la noche a 4°C, primero en etanol:solución de infiltración (1:1; apartado VII.2.2.5.2), y después sólo en solución de infiltración. Al día siguiente se generaron los bloques con la solución de inclusión (apartado VII.2.2.5.2), la cual se prepara inmediatamente antes. En este punto se ha de trabajar con celeridad, ya que la reacción de polimerización de este producto es rápida. Se utilizaron moldes de plástico (Electron Microscopy Sciences) para dar forma a los bloques al solidificar, y se pegaron a cilindros metálicos, los cuales se pueden acoplar al microtomo 2050 Supercut (Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH), realizando cortes de 4 µm. Se depositaron sobre portaobjetos de vidrio con agua destilada en su superficie, que se dejó evaporar durante 1 hora sobre una placa calefactora a unos 35°C. Después se colocaron cubreobjetos mediante el medio de montaje Eukitt (O. Kindler GMBH & Co.).

#### **VII.3.2.2.- Inclusión en parafina**

Antes de la inclusión se procedió a fijar y deshidratar la muestra, como se explica en el apartado VII.3.2.1. A continuación, se aclaró el tejido con Histoclear (National Diagnostics), realizando lavados de 30 minutos a temperatura ambiente con mezclas de Histoclear y etanol (proporciones 1:3, 1:1, 3:1, respectivamente), y finalmente dos incubaciones con Histoclear 100%. Este proceso se lleva a cabo en la campana de extracción de gases.

La inclusión se inició con el cambio el Histoclear por una mezcla de Histoclear con parafina fundida 1:1 (v/v; Paraplast Plus, Kendall), y se dejó incubar a 58°C toda la noche. Después se realizaron cambios sucesivos de parafina, hasta que se eliminó todo el Histoclear posible (debe desaparecer el fuerte olor cítrico del mismo), lo que puede llevar varios días. Las muestras se pueden conservar en los viales de centelleo con parafina durante varios meses o años a 4°C.

Para la obtención de los cortes histológicos se confeccionaron bloques de parafina con las muestras. El montaje se realizó en una placa calefactora (Plactronic, Selecta) a 55°C para evitar la solidificación de la parafina, y gracias a unos moldes con una zona cóncava (Electron Microscopy Sciences) donde se deposita la muestra con la orientación deseada. Después se cubren con una pieza de plástico a la que los bloques quedarán sujetos una vez enfriados, y que además se sujeta al microtomo.

Los cortes de 8 µm se efectuaron con un microtomo 2050 Supercut (Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH). Éstos se depositaron en un baño con agua destilada templada (unos 40°C) para que se estiraran, y después fueron montados en portaobjetos de vidrio. Se dejaron toda la noche sobre una placa calefactora a 45°C para que el agua se evaporara. Tras desparafinar con Histoclear (un lavado de 5 minutos), se protegieron los cortes con un cubreobjetos mediante el medio de montaje Eukitt.

### **VII.3.3.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las muestras se fijaron en metanol durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se conservaron en etanol a 4°C. Previamente a su visualización en el microscopio, se sometieron las muestras a un proceso de punto crítico, en el que se desecaron completamente los tejidos intercambiando el etanol por CO<sub>2</sub>. Este paso fue efectuado con el equipo de secado por punto crítico EMS 850 (Electron Microscopy Sciences). A continuación, se colocaron las muestras en portaobjetos metálicos mediante cinta de carbono adherente por ambas caras (Electron Microscopy Sciences), y se recubrieron con una película de oro utilizando un metalizador Sputter Coater SCD 004 (Balzers). Las observaciones se realizaron con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-840, conectado a un ordenador para la toma y almacenamiento de fotografías.

### **VII.3.4.- Fotografías de microscopio confocal**

Previo a su visualización, las muestras fueron incubadas en una solución de metanol:acetona (1:1, v/v) durante 30 minutos a -20°C, consiguiendo cierta fijación de los tejidos, y también aclarado de los mismos, lo cual es conveniente ya que las clorofilas producen mucha autofluorescencia y dificultan el análisis de las muestras. Después se conservaron sumergidas en tampón PBS 1X (apartado VII.2.2.5.3). Para la observación del tejido, éste se colocó en un portaobjetos de vidrio, se cubrió con una gota de PBS 1X y un cubreobjetos de vidrio. Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SPE, manejado con el programa LAS AF.

### **VII.3.5.- Tinción GUS**

Se tomaron los tejidos de plantas portadoras de construcciones con el gen testigo de la  $\beta$ -glucuronidasa y se incubaron en acetona 90% en hielo durante 15 minutos. La acetona fija el tejido y también elimina algunas de las clorofilas. A continuación, se eliminó toda la acetona y se realizó una incubación con la solución de lavado (apartado VII.2.2.5.4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se intercambió la solución de lavado por la solución de revelado (apartado VII.2.2.5.4) y se dejó incubar a 37°C en oscuridad durante 16-20 horas (Weigel y Glazebrook, 2002). Finalmente, se procedió a fijar la muestra con FAE, y a deshidratarlas con lavados sucesivos a concentraciones crecientes de etanol, tal y como se explica en el apartado VII.3.2.1.

Se realizaron observaciones de las muestras en este punto, mediante el estereomicroscopio Nikon SMZ1500 (apartado VII.3.1), o se procedió a su inclusión en resina JB4 o parafina (apartados VII.3.2.1 y VII.3.2.2).

### **VII.3.6.- Tinción de ligninas con floroglucinol**

Esta tinción se utilizó para comprobar la presencia de ligninas en los distintos tejidos. La muestra fresca objeto del experimento fue incubada en una solución de floroglucinol 2% (apartado VII.2.2.5.5) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se sumergió en HCl durante unos segundos, y se procedió a la visualización de la tinción que aparece de color rojo. Se ha de trabajar con rapidez, ya que la tinción sólo persiste unos 30 minutos. Este protocolo ha sido adaptado de Weigel y Glazebrook, 2002.

Para examinar y fotografiar esta tinción se utilizó el estereomicroscopio Nikon SMZ1500 (apartado VII.3.1).

### **VII.3.7.- Tinción con solución de Alexander**

Una de las maneras de analizar la viabilidad del polen es mediante la tinción de Alexander. Esta solución contiene dos colorantes que tiñen la superficie del grano del polen (verde malaquita) y el protoplasma del mismo (fucsina ácida; Alexander, 1969). Con unas pinzas de disección se tomaron varias inflorescencias que antes de ser teñidas se fijaron con la solución de Carnoy (apartado VII.2.2.5.6; Peterson *et al.*, 2010) durante al menos 2 horas a 4°C, aunque puede permanecer en esta solución 12 meses. A continuación se depositó la muestra sobre un trozo de papel absorbente y retirar el exceso de solución fijadora, para luego sumergirla en una alícuota de la tinción de Alexander (apartado VII.2.2.5.6) e incubarla a 37°C durante 1 o 2 horas para que el tejido quede impregnado de ésta. Pasado este tiempo, se tomó una flor de estadio 12 de la muestra, y se diseccionaron los estambres depositándolos en un portaobjetos de vidrio sobre una gota de tinción. Con ayuda de un mechero (Campingaz) aplicamos calor al portaobjetos desde abajo, sujetándolo con unas pinzas para evitar quemaduras. Tras aplicar calor se dejó enfriar y los estambres fueron situados en un nuevo portaobjetos con una gota de glicerol 10%, y se protegieron con un cubreobjetos. Las muestras fueron visualizadas con un microscopio (apartado VII.3.2). Este protocolo ha sido adaptado del descrito en Peterson *et al.* (2010).

## **VII.4.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **VII.4.1.- Aislamiento de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana***

Se trituró la muestra vegetal (recién obtenida, o tomada con anterioridad y preservada a -20°C), dentro de un tubo *ependorf* con ayuda de una pequeña varilla de plástico. A continuación se agregó tampón de extracción (apartado VII.2.2.6), y se incubó 15 minutos a 37°C. Tras

centrifugar, se añadió isopropanol al sobrenadante (1:1, v/v), y se incubó 15 minutos a -20°C para permitir la precipitación del DNA. Se efectuó un lavado con etanol 70%, y finalmente se resuspendió en agua destilada estéril.

#### **VII.4.2.- Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli***

Para purificar plásmidos de cultivos celulares se utilizó el kit *DNA-spin Plasmid DNA Purification* (Intron Biotechnology), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras incubar las células de interés en un medio de cultivo líquido suplementado con el antibiótico necesario (apartado VII.2.1.6), se centrifugaron para precipitarlas. Se añadió un tampón de resuspensión, y a continuación un tampón de lisis alcalino que libera el plásmido de las células. Tras neutralizar el lisado, el plásmido puede unirse a una membrana de sílice de una columna de centrifugación. Las impurezas fueron eliminadas, y finalmente se recuperó el plásmido mediante un tampón de elución.

#### **VII.4.3.- Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa**

Este procedimiento se empleó para aislar un fragmento concreto de DNA amplificado mediante PCR e identificado en un gel de agarosa, del cual es extraído. Se utilizó el kit *GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup* (Thermo Scientific). Este método incluye el uso de columnas con una membrana de sílice a la que el DNA queda unido en presencia de agentes caotrópicos, mientras que los restos de la reacción de PCR y del gel de agarosa pasan a través de dicha membrana. Finalmente el DNA purificado se recogió gracias a un tampón de elución.

#### **VII.4.4.- Tratamiento de DNA con enzimas de restricción**

Se procuró utilizar una relación de 1-2 U. de enzima por cada  $\mu\text{g}$  de DNA a digerir, junto con el tampón proporcionado por el fabricante diluido a una concentración 1X. Las digestiones se realizaron durante un tiempo que osciló entre 2 horas y toda la noche. Las enzimas se inactivaron mediante incubación a 65-70°C durante 15 minutos, y se verificó el resultado de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado VII.4.8).

#### **VII.4.5.- Reacciones de ligación de DNA**

Para la clonación de fragmentos de DNA en un plásmido se llevaron a cabo reacciones de ligación en un volumen de 10 a 15  $\mu\text{l}$ , usando 1-2,5 U. de enzima ligasa del bacteriófago T4

(Thermo Scientific) y el tampón proporcionado por el fabricante en una concentración 1X. La relación molar vector:inserto fue de 1:3 a 1:6. La reacción tuvo lugar mediante una incubación a 16°C durante toda la noche.

#### VII.4.6.- Aislamiento de RNA total de *Arabidopsis thaliana*

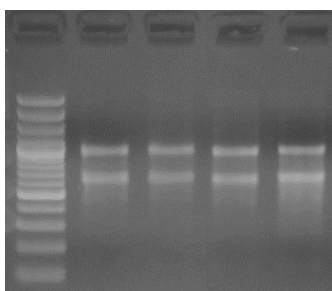
Se tomó el material fresco (unos 100 mg), e inmediatamente se congeló con nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA, y a continuación se pulverizó con ayuda de un mortero. Todo este procedimiento fue llevado a cabo con nitrógeno líquido, para congelar no sólo la muestra, sino también el material usado en el procesamiento de la misma.

Para la obtención de RNA total se utilizó el kit *GeneJET plant RNA purification*, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Este kit utiliza columnas con membranas de sílice a las que se queda unido el RNA durante los sucesivos lavados, para ser finalmente eluido en agua libre de RNasas.

Para eliminar el DNA genómico se digirió con DNasa I (Thermo Scientific) durante una hora a 37°C. A continuación, se procedió a precipitar el RNA para concentrarlo, añadiendo 2 volúmenes de etanol 100%, e incubando a -20°C durante varias horas o toda la noche. Después se añadió 1/10 volumen de LiCl 4 M, y se centrifugó a 12000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se realizó un lavado para eliminar sales con etanol 70% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Tras eliminar todo el sobrenadante, se dejó secar el precipitado de RNA a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se resuspendió en 25 µl de agua sin RNasas, almacenándolo a -80°C.

#### VII.4.7.- Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado

Para analizar la cantidad obtenida de RNA se utilizó un espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer, que determina la concentración de RNA midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución 1/50 de la muestra.



**Figura 78.-** Análisis cualitativo y cuantitativo de RNA total en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En la calle de la izquierda se ha cargado un marcador de peso molecular de 100 pb. En las calles 2 a 5 se han cargado 500 ng de distintas muestras de RNA total.

Una vez cuantificado el RNA, se visualizaron 500 ng de cada muestra en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio para comprobar su integridad. Previamente a la

elaboración del gel y subsiguiente electroforesis, el portageles y el peine fueron tratados con NaOH 0,4 M, y se limpió la cubeta de electroforesis para minimizar la presencia de RNAsas.

Aunque las muestras de RNA fueron digeridas con DNasa I, se realizó una PCR con cebadores que sólo amplifican DNA genómico para asegurar la ausencia del mismo.

#### **VII.4.8.- Electroforesis en gel de agarosa**

Se utilizó esta electroforesis para cuantificar y verificar la integridad de los ácidos nucleicos tras su aislamiento, o para comprobar el tamaño de los fragmentos obtenidos tras una amplificación por PCR.

Los geles se prepararon con TAE 1X (VII.2.2.7) y agarosa de punto medio de electroendósmosis (Ecogen) con una concentración de entre el 1% y el 2,5%, dependiendo del tamaño de las moléculas a visualizar, y con bromuro de etidio 0,5 µg/ml (apartado VII.2.2.7). Para cargar las muestras se añadió 1,5 µl de tampón de carga 6X (apartado VII.2.2.7) por cada 10 µl de la misma.

Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 100 V, y el resultado se visualizó mediante irradiación con luz UV en un transiluminador (GeneDoc), con una cámara Canon 1000D acoplada que captura imágenes de los geles con el programa Eos Utility.

#### **VII.4.9.- Secuenciación de DNA**

Todas las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo por Macrogen. Se enviaron unos 100 ng/µl (en un volumen aproximado de 20 µl) del plásmido pSC-A en el que se había clonado el fragmento de DNA a secuenciar (apartado VII.8.1). Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos universales M13 forward y reverse (Tabla 11) con una concentración de 10 pmol/µl. El equipo utilizado fue el secuenciador automático ABI3700.

#### **VII.4.10.- Análisis informático de las secuencias de ácidos nucleicos**

El análisis de las secuencias de ácidos nucleicos se realizó a través de Internet, utilizando los programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, 1997) de las siguientes direcciones: <http://www.arabidopsis.org/Blast/> (TAIR, *The Arabidopsis Information Resource*) y <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*). Para los alineamientos de secuencia se utilizó la aplicación CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, 1994) del programa BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences).



## VII.5.- SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### VII.5.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de secuencias específicas de DNA se realizaron reacciones de PCR en las siguientes condiciones: 0,2  $\mu$ M de cada cebador; 0,2 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido;  $MgCl_2$  2mM; 1 U. de Taq DNA polimerasa (Intron Biotechnology); tampón de PCR 1X (Intron Biotechnology) y DNA molde en concentración variable.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad T100 Thermal Cycler, con un paso inicial de 2 minutos a 93°C seguido de 35-40 ciclos de 30 segundos a 93°C, 30 segundos a la temperatura óptima de hibridación de los cebadores (50-60°C) y entre 20 y 120 segundos a 71°C. Como paso final se programó una elongación de 7 minutos a 71°C.

Todos los cebadores utilizados en esta Tesis están recogidos en la Tabla 11.

### VII.5.2.- Amplificación rápida de los extremos del cDNA 3' (3' RACE)

Primero se realizó una retotranscripción de 5  $\mu$ g de RNA total de inflorescencias utilizando la enzima Maxima Reverse Transcriptase, que es capaz de funcionar a 65°C (lo cual minimiza la inespecificidad). Como cebador se utilizó oligo d(T)-anchor (kit 5'/3' RACE, Roche Diagnostics; Tabla 11), formado por una secuencia poliT y una secuencia adaptadora de 22 nucleótidos en su extremo 5'.

A continuación se procedió a amplificar posibles secuencias del cDNA de AG que incluyan regiones del intrón 2, utilizando como cebador forward AGIa (Tabla 11) que hibrida en la región exónica situada aguas arriba de dicho intrón, y como cebador reverse el oligonucleótido PCR anchor (kit 5'/3' RACE, Roche Diagnostics; Tabla 11), que hibrida con la secuencia adaptadora del cebador oligo d(T)-anchor, de manera que sólo se amplificaran secuencias que contuvieran una cola poliA. La amplificación se llevó a cabo usando High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific), que posee actividad correctora de pruebas y puede generar amplicones de hasta 10 Kb. Se visualizó esta PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa (apartado VII.4.8). Para aumentar la concentración de los fragmentos amplificados se efectuó una segunda PCR tomando una alícuota de la primera amplificación como molde, y usando los mismos componentes y condiciones, exceptuando el cebador forward, que fue AGIb (Tabla 11), que hibrida también en la misma región exónica que AGIa, pero en una posición algo más cercana al intrón 2 (Fig. 57 A en sección IV.2.3.4). Se visualizó esta reacción en un gel de agarosa, y se recortó cada sección del gel en la que aparecía una banda amplificada para su purificación (apartado VII.4.3).

A continuación, se clonó cada uno de los fragmentos amplificados en un vector pSC-A con extremos A protuberantes, con el que se transformaron células de *E. coli* (apartado

VII.8.1). Se seleccionaron colonias positivas en un medio LB sólido suplementado con kanamicina y X-gal (apartados VII.2.1.6 y VII.2.2.3), cuyo DNA plasmídico fue secuenciado a partir de los cebadores M13F y M13R (apartado VII.4.9 y Tabla 11). Las secuencias se analizaron realizando un alineamiento CLUSTAL-W (apartado VII.4.10).

### **VII.5.3.- Retrotranscripción**

Se realizó esta reacción para obtener cDNA a partir del mRNA. Se utilizó la enzima RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 2-5 µg de RNA total, y como cebador se usó oligo(dT)<sub>18</sub> (Thermo Scientific). Primero se efectuó una incubación del RNA con el cebador a 65°C durante 5 minutos para asegurar la ausencia de estructuras secundarias. A continuación se incorporaron el resto de componentes de la reacción y se incubó a 42°C durante 60 minutos. Una vez finalizada la reacción, los tubos se conservaron a -80°C hasta su uso.

### **VII.5.4.- PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

Se partió del RNA total extraído de rosetas de 8 días, o de yemas florales de las que se eliminaron las flores de estadio 9 en adelante (apartado VII.4.6). Se utilizó este RNA para obtener cDNA (apartado VII.5.3). Las medidas de expresión se llevaron a cabo con el sistema LyghtCycler 1.5 (Roche Diagnostics) utilizando el kit de amplificación *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*, siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche Diagnostics). Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia OTC (*ORNITINE TRANSCARBAMILASE*; Pérez-Pérez *et al.*, 2004) y con los niveles silvestres correspondientes. Para los análisis de expresión se tomaron en cuenta las réplicas interensayo (n=3) con una desviación estándar menor al 1%. Los resultados de expresión finalmente se corrigieron con una curva de calibrado de los cebadores (curva de eficiencia; Pfaffl, 2001). Los valores se expresaron en promedios ± desviación estándar (DE).

## **VII.6.- ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA**

### **VII.6.1.- Ensayo de doble híbrido en levadura (*Yeast two hybrid*, Y2H)**

Para estos experimentos se utilizó un sistema de doble híbrido en levaduras basado en GAL-4 (Clontech) con los plásmidos pGBT9, que contiene el dominio de unión (*binding domain*, BD)

de GAL4, y pGAD424, que posee el dominio de activación (*activation domain*, AD) de GAL4 (Fields y Song, 1989).

Se realizaron amplificaciones con cDNA como molde y con los oligonucleótidos *PEP* for y *PEP* rev, y *FLK* for y *FLK* rev (Tabla 11), para obtener las secuencias codificantes de *PEP* y *FLK*, respectivamente. Ambas se clonaron en fase en cada uno de los plásmidos en los sitios de restricción *EcoRI/SalI*, en el caso de *PEP*, y *BamHI/SalI*, para *FLK*, para así obtener proteínas de fusión *PEP*-BD y *FLK*-AD, y viceversa. Como control positivo se utilizaron las proteínas de *Antirrhinum majus*, *PLENA* (Davies *et al.*, 1996) y *SQUAMOSA* (Egea-Cortines *et al.*, 1999).

Las construcciones efectuadas se utilizaron para transformar cepas Hf7c de *Saccharomyces cerevisiae* (Feilotter *et al.*, 1994) para analizar las interacciones. Los ensayos de interacción proteína-proteína fueron realizados en medio SD (*Selective Dropout*) que carecía de triptófano, leucina e histidina.

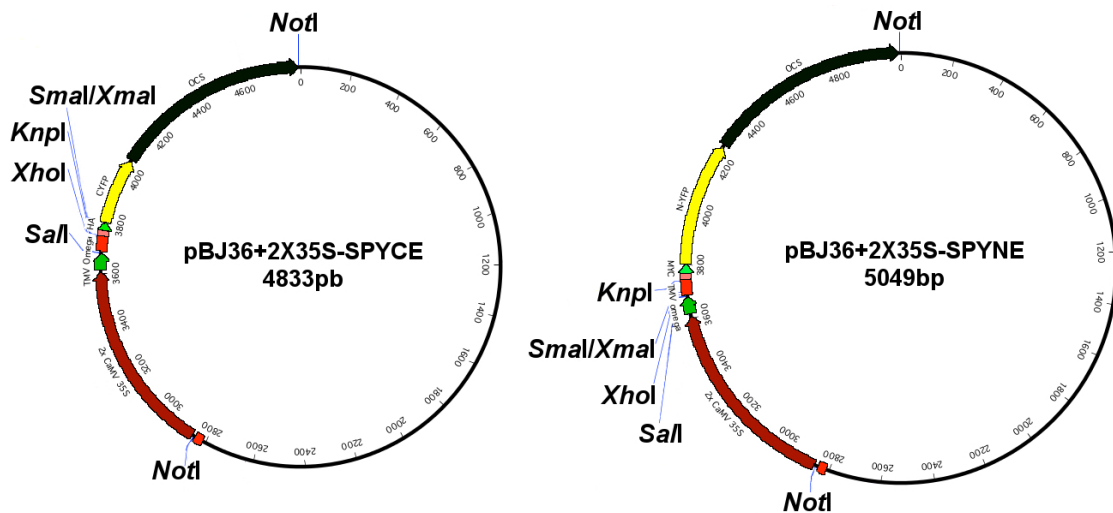
Estos experimentos fueron realizados con la colaboración del Dr. Marcos Egea Cortines, de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPTC).

#### **VII.6.2.- Ensayo de fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC)**

Se amplificaron las secuencias codificantes de los genes a partir de sus cDNA. Las parejas de cebadores utilizadas fueron: bífic HEN4-f y bífic HEN4-r (*HEN4*), bífic HUA1-f y bífic HUA1-r (*HUA1*), bífic FLK-f y bífic FLK-r (*FLK*), y bífic PEP-f y bífic PEP-r (*PEP*). A continuación, se clonaron en fase en los plásmidos pBJ36-SPYNE y pBJ36-SPYCE, que contienen las secuencias N-terminal (nt) y C-terminal (ct) de la proteína amarilla fluorescente (YFP), respectivamente (Fig. 79). Mediante una digestión con *NotI* se extrajeron ambos cassettes, *35S::SPYNE*, que se clonó en el vector pGreen0179 (con resistencia a higromicina), y *35S::CTGFP*, clonado en pGreen0229 (con resistencia a Basta), incluyendo cada uno las secuencias de HUA1, HEN4, PEP o FLK. Posteriormente, se contrasformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* (apartado VII.8.2) con el correspondiente T-DNA de la serie pGreen junto con el vector pSOUP, que contiene todas las funciones necesarias para el mantenimiento de la función del T-DNA pGreen en *Agrobacterium*. Estas células se utilizaron para infiltrar hojas de *Nicotiana benthamiana* (apartado VII.9). A las 72 h se visualizó la presencia de fluorescencia con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U.

Como control negativo se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* con el plásmido pBJ36-SPYNE con la secuencia de cada gen ensayado junto con la versión vacía del plásmido pBJ36-SPYCE, o bien con éste último incorporando la secuencia del gen problema junto con la versión sin inserto del plásmido pBJ36-SPYNE.

Los ensayos de agroinfiltración fueron efectuados por el Dr. Juan José Ripoll, en la University of California at San Diego (UCSD).



**Figura 79.-** Plásmidos utilizados en los experimentos de BiFC. Cada uno de ellos contiene una porción de la proteína fluorescente YFP: el extremo C-terminal (pBJ36-SPYCE) y N-terminal (pBJ36-SPYNE), coloreados en amarillo. Se han indicado las dianas de las enzimas de restricción utilizadas para clonar los distintos cDNAs.

## VII.7.- GENERACIÓN DE PLANTAS CON LA CONSTRUCCIÓN 35S::GFP-PEP

El cDNA completo del gen *PEP* se obtuvo a partir de la colección de clones de cDNA de *Arabidopsis thaliana* generada en el Instituto RIKEN BioResource Center (*Experimental Plant Division*, Tsukuba, Japón), utilizando los oligonucleótidos FUP1-16 y FUP1-32. A continuación, se clonó en el sitio de restricción *SmaI/EcoRI* del plásmido pEGAD (Cutler *et al.*, 2000). De esta manera la región codificante de *PEP* quedó situada en fase tras el extremo 3' de la secuencia del gen *GFP* (*Green Fluorescent Protein*), y bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Esta construcción se introdujo en la estirpe C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación (apartado VII.8.2), seleccionándose los clones positivos por la resistencia a kanamicina que confiere el plásmido.

A continuación, se detalla el procedimiento de infiltración de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*, basado en el protocolo de Clough y Bent (1998), que es, a su vez, una modificación simplificada del desarrollado por Bechtold *et al.* (1993). Se cultivaron las células con 10 ml de LB líquido suplementado con kanamicina, y se usó una alícuota del cultivo para inocular 500 ml de LB líquido con kanamicina y enriquecido con glucosa al 0,5% (m/v; apartado VII.2.1.6 y Tabla 8). A continuación, se incubó a 28°C en agitación hasta alcanzar una  $A_{600}$  de entre 0,8 a 1,2. Llegado este momento, se centrifugó, y el precipitado resultante se resuspendió en la solución de infiltración (apartado VII.2.2.4) hasta obtener una  $A_{600}$  de 0,8. A continuación, se añadió Silwet L-77 0,035% (v/v, Lehle Seeds). Esta solución se dispuso en cubetas de 15 x 20 x 5 cm (largo x ancho x alto), sumergiendo durante unos segundos las inflorescencias primarias de plantas, a las que previamente se les eliminaron las flores postantesis y los frutos.

Finalmente, las plantas infiltradas se trasladaron a la cámara de cultivo hasta completar su ciclo y recolectar las semillas. Para identificar los individuos transformantes ( $T_1$ ), estas semillas se sembraron de forma masiva en placas de Petri (1000-1500 semillas por placa) con medio de cultivo GM (apartado VII.2.1.1) en presencia de kanamicina, para aislar sólo las plantas resistentes al mismo.

## **VII.8.- TRANSFORMACIÓN BACTERIANA**

### **VII.8.1.- Transformación por choque térmico**

Estas transformaciones se realizaron con el kit *StrataClone PCR Cloning* (StrataGene), que utiliza el vector pSC-A y células competentes SoloPac (apartado VII.1.2.1). Una alícuota de una reacción de ligación fue añadida a cada tubo de células competentes, y se sometieron a un choque térmico (20 minutos en hielo, 45 segundos a 42°C, 2 minutos en hielo) para forzar la transformación de las mismas. A continuación, se les añadió medio LB líquido (apartado VII.2.1.4), incubándolas a 37°C durante 1 hora en agitación. Este cultivo se utilizó para inocular placas de Petri con medio LB sólido y kanamicina (apartado VII.2.1.6 y Tabla 8) con un asa de siembra. A esta placas también se les añadió 40 µl de X-gal 2% lo que, tras una incubación a 37°C toda la noche, permitió identificar los clones positivos mediante selección blanco-azul basada en la interrupción del gen *lacZ*.

### **VII.8.2.- Electroporación**

Esta técnica se utilizó en *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación se realizó con el aparato Electroporator BR1.2 (Bio-Rad) a 1800 V, utilizando cubetas de 2 mm de distancia entre los electrodos.

## **VII.9.- TRANSFORMACIÓN DE *Nicotiana benthamiana***

Este proceso, utilizado en el ensayo de BiFC (apartado VII.6.2), se realizó como se describe en Llave *et al.* (2000) con algunas modificaciones.

Se partió de clones de *Agrobacterium tumefaciens* que contenían las construcciones para comprobar una interacción física entre dos proteínas. Se realizaron cultivos paralelos de células con sendas construcciones en 5 ml de medio (LB; rifampicina 100 µg/ml; tetraciclina 12,5 µg/ml) a 30°C durante 20 horas. Estos cultivos se utilizaron para inocular 50 ml de nuevos

medios (LB, acetosiringona 20  $\mu\text{M}$ ; MES 10 mM; tetraciclina 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ; pH 5,7) que se incubaron a 30°C durante 16-20 horas. Se obtuvieron precipitados mediante centrifugación, que se sometieron a 3 lavados sucesivos con  $\text{MgCl}_2$  10 mM, incubando el tercero de estos lavados a 4°C durante 2 horas. A continuación, se resuspendieron las células en medio de infiltración ( $\text{MgCl}_2$  10 mM; MES 10 mM; acetosiringona 150  $\mu\text{M}$ ; pH 5,7), para después combinar ambos cultivos con una relación 1:1 (v/v) de los mismos, y usarlos para infectar hojas de *Nicotiana benthamiana* con una jeringa de 3 ml mediante una incisión. Los individuos transformantes se identificaron gracias a la resistencia a higromicina o al herbicida Basta que proporciona cada construcción respectivamente.

Estos procedimientos fueron efectuados por el Dr. Juan José Ripoll, en la University of California in San Diego (UCSD).

## **VII.10.- ENSAYO DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA**

Estos ensayos fueron realizados tal y como se describe en Kippert *et al.* (1995). Los cultivos de levaduras fueron resuspendidos en tampón PBS (apartado VII.2.2.5.3) suplementado con Sarcosyl (lauril sarcosinato de sodio) 0,2%, como agente permeabilizante. Para comprobar la actividad del gen LacZ de las construcciones se añadió ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido). Tras un tiempo suficiente de incubación a 28°C se detectó una coloración amarilla, cuya intensidad se determinó basándose en la absorbancia a 420 nm. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias.

Estos experimentos fueron realizados en la Universidad Politécnica de Cartagena (UPTC) por el Dr. Marcos Egea Cortines.

## **VII.11.- GENOTIPADOS DE LAS ESTIRPES MUTANTES**

### **VII.11.1.- Genotipados moleculares**

En las siguientes tablas se describen los genotipados moleculares llevados a cabo para identificar los alelos presentes en las construcciones de las distintas combinaciones mutantes. Los oligonucleótidos mencionados están detallados en la Tabla 11.

**Tabla 9.-** Genotipado de los alelos de inserción.

Alelo	Cebadores genómicos	Cebador del T-DNA /trasposón	Tamaño del producto de PCR en pb (silvestre/mutante)
<b>ag-12</b>	ag-A F; ag-A R	o3144/35St	813/400
<b>flk-2</b>	KH3-2; KH3-7	LBb1	340/450
<b>ful-1</b>	AGL8PG; AGL8MG	GUS3	338/600
<b>hua2-4</b>	hua2-4F; hua2-4R	LBb1	520/350
<b>hua2-7</b>	hua2-7 2F; hua2-4R	LBTM3	980/650
<b>pep-2</b>	OCF12; OCF16	LBTM3	573/498
<b>pep-4</b>	FUP1-4; FUP1-6	LBb1	598/398
<b>35S::PEP</b>	FUP1-37; FUP1-38	-	244

**Tabla 10.-** Genotipado de otros alelos.

Alelo	Cebadores	Producto de PCR (pb)	Enzima	Tamaño de los productos (silvestre/mutante)
<b>fca-9</b>	FCA9-F; FCA9-R	247 (alelo silvestre)/ 241 (alelo mutante)	<i>Eco130I</i>	247/199+42
<b>flc-3</b>	FLC3-FF; FLC3-R	-	-	448/344
<b>hen4-2</b>	hen4-2-1; hen4-2-2	155	<i>SatI</i>	105 + 50/155
<b>hua1-1</b>	MBK21p28; MBK21p31	1180	<i>HphI</i>	500 + 350 + 350/840 + 350
<b>hua2-1</b>	MKD15p7.2; MKD15p31	330	<i>PstI</i>	275/330

### VII.11.2.- Otros métodos de genotipado

En algunos casos no se disponía de un genotipado molecular apropiado, así que para obtener las plantas mutantes correspondientes se recurrió a la segregación de la resistencia a ciertos antibióticos que confieren estos alelos (Tablas 6 y 7).

### VII.12.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### VII.12.1.- Prueba $\chi^2$

El valor de  $\chi^2$  se obtuvo tras contrastar la hipótesis de partida con los datos obtenidos en una segregación fenotípica. El valor estadístico debía ser menor al valor existente con un grado de libertad ( $\chi^2_{1;0,05} = 3,84$ ) para ser aceptado.



## VII.12.2.- Análisis estadístico de los experimentos de qPCR

Se realizaron análisis para verificar si los niveles de mRNA de un gen en los distintos fondos mutantes presentan diferencias significativas respecto a los niveles silvestres. Utilizamos el programa REST (*Relative Expression Software Tool*) que utiliza el método estadístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* © (Pfaffl, *et al.*, 2002). También se utilizó la función Prueba t de Student del programa Excel, como análisis preliminar. En ambos casos se obtiene un valor de probabilidad P que debe ser menor que el límite escogido de significación ( $P=0,05$ ) para asumir como estadísticamente significativa la diferencia en los niveles de expresión del gen de interés.

## VII.13.- OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Invitrogen (Life Technologies) en la escala 25 nmol, y con un grado de purificación moderado.

**Tabla 11.-** Oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de esta Tesis. Las secuencias diana de las enzimas de restricción empleadas aparecen sombreadas en gris.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	FINALIDAD	ENZIMA	REFERENCIA
ag-A F	GAAGTGGTCAAAAGAAACATAG	Genotipado <i>ag-12</i>		Este trabajo
ag-A R	GGTATTGACCAATGAGAAATC	Genotipado <i>ag-12</i>		Este trabajo
AGE9	GCCATTTCCCTTCAGCCTAT	qPCR AG		Este trabajo
AGI a	CGGATCGAGAACACAACGAATCG	3'RACE		Este trabajo
AGI b	GGTTTGCTCAAGAAAGCTTACGAGC	3'RACE		Este trabajo
AGI c	CCTACCCATAAGAGCATTCAAGAAG	qPCR intrón AG		Este trabajo
AGL8 MG	CTCATGAGCTTTCTTGAGC	Genotipado <i>ful-1</i>		Ferrándiz <i>et al.</i> , 2000 a
AGL8 PG	TGTATTCACGTACATACCG	Genotipado <i>ful-1</i>		Ferrándiz <i>et al.</i> , 2000 a
AG QPCR F	AGCAATCACGGCGTACCAATC	qPCR AG e intrón AG		Este trabajo
AP1 QPCR 1F	CTTACGCCGAAAGACAGCTT	qPCR AP1		Este trabajo
AP1 QPCR 1R	ATAGGCTGAAGGAAATGGC	qPCR AP1		Este trabajo
AP2 qF	CGACGCACCACACCAAACACAA	qPCR AP2		Este trabajo
AP2 qR	CACGCCGACTCTTTTCAACGG	qPCR AP2		Este trabajo
bifc FLK-f	TTCTCGAGATGGCTGAAGCTGAAGATC	BiFC	<i>XhoI</i>	Este trabajo
bifc FLK-r	TTCCCGGGTAACCGTAGCCTGAGCTG	BiFC	<i>XmaI</i>	Este trabajo
bifc HEN4-f	TTGTGACATGGAGCGAAATAGCGTTAAATTTTCATGC	BiFC	<i>SalI</i>	Este trabajo
bifc HEN4-r	TTGGTACCGTTTAGGTTGTATTTTTGGACAATGAGG	BiFC	<i>Knpl</i>	Este trabajo
bifc HUA1-f	TTGTGACATGGACATCGTCAATTGTATAG	BiFC	<i>SalI</i>	Este trabajo
bifc HUA1-r	TTGGTACCTTGAGTAGTGTCCGGTGTGGTTGC	BiFC	<i>Knpl</i>	Este trabajo
bifc PEP-f	TTCTCGAGATGGCCCGCTGCAGATTCCGTTG	BiFC	<i>XhoI</i>	Este trabajo
bifc PEP-r	TTGGTACCAAGATTATAACTGCTGTAGCCACC	BiFC	<i>Knpl</i>	Este trabajo
FCA9-F	TCTTTGGCTCAGCAAACCGAACAATC	Genotipado <i>fca-9</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
FCA9-R	TGTTGAGATGGTGAAACTGTG	Genotipado <i>fca-9</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009

<b>FLC3-FF</b>	GCTCGTCATGCGGTACACGT	Genotipado <i>flc-3</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FLC3-R</b>	CGGAGGAGAAGCTGTAGAGCTTGC	Genotipado <i>flc-3</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FLC E2-r</b>	CAGCTGTTTCCCATATCGATCAAG	qPCR <i>FLC</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FLC RT-f</b>	TTCTCCAAACGTCGCAACGGTCTC	qPCR <i>FLC</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FLK-3</b>	CAGTCAGCATGCGTTCCTTA	qPCR <i>FLK</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FLK-4</b>	AGAAAGAATCATCTCTACCAC	qPCR <i>FLK</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FLK for</b>	CATGGGATCCGAATGGCTGAAGCTG AAGATCAG	Y2H	<i>Bam</i> HI	Este trabajo
<b>FLK rev</b>	ATGAGTCGACTCAAAGATTATAACTG CTGTAGCC	Y2H	<i>Sal</i> I	Este trabajo
<b>FT 1-f</b>	AGAGAGGTGACTAATGGCTTGG	qPCR <i>FT</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FT 1-r</b>	CAGTGGGACTTGGATTTTCGTA	qPCR <i>FT</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FUP1-4</b>	CACCAGAGTCTCCTACTATAGAC	Genotipado <i>pep-4</i>		Ripoll, 2004
<b>FUP1-6</b>	TTTCGTATGATCGTTCCGGTG	Genotipado <i>pep-4</i>		Ripoll, 2004
<b>FUP1-16</b>	TACCCGGGTCAAAGATTATAACTGCT GTAGCCACC	35S:: <i>GFP-PEP</i>	<i>Sma</i> I	Este trabajo
<b>FUP1-32</b>	TGAATTCGGTTCAAATGGCCGCCG TC	35S:: <i>GFP-PEP</i>	<i>Eco</i> RI	Este trabajo
<b>FUP1-37</b>	TCTGCTTTTGACACAGGTATCT	qPCR <i>PEP</i> y genotipado 35S:: <i>PEP</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>FUP1-38-</b>	CCTTGTGATTGATGATGAACCTTGA	qPCR <i>PEP</i> y genotipado 35S:: <i>PEP</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>G-00654</b>	TTGCAAGATCACAACAATTCGCTTCT C	qPCR <i>FUL</i>		Yant <i>et al.</i> , 2010
<b>G-00655</b>	GAGAGTTTGGTTCCGTCAACGACGA TG	qPCR <i>FUL</i>		Yant <i>et al.</i> , 2010
<b>G-27917</b>	GGCCGTCTCTATGAATACGC	qPCR <i>STK</i>		Yant <i>et al.</i> , 2010
<b>G-27918</b>	TGGACAGTGCTAGTGTGGTG	qPCR <i>STK</i>		Yant <i>et al.</i> , 2010
<b>GUS3</b>	CTTGTAACGCGCTTTCCC	Genotipao <i>ful-1</i>		Ferrández <i>et al.</i> , 2000 a
<b>HEN4p40</b>	GCTCTTGGCTAAGGAATTTTCAT	Genotipado <i>hen4-2</i>		Cheng <i>et al.</i> , 2003
<b>hua2-4f</b>	ATTGGGATCGTGCGCCAGAC	Genotipado <i>hua2-4</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>hua2-4r</b>	CAATATGATCTGTTCCATCCAC	Genotipado <i>hua2-4</i> y <i>hua2-7</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>hua2-7 2F</b>	CTCGCCAAAGTCAAAGGCT	Genotipado <i>hua2-7</i>		Este trabajo
<b>KH3-2</b>	TGGTTCAAGAGTCGGATCTG	Genotipado <i>flk-2</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>KH3-7</b>	TGGTTCAAGAGTCGGATCTG	Genotipado <i>flk-2</i>		Ripoll <i>et al.</i> 2009
<b>KNU QPCR F</b>	AAAACCTCGATCATCAAGCAAACGC	qPCR <i>KNU</i>		Este trabajo
<b>KNU QPCR R</b>	GTAGATCCTTGAAATGGGTTTTGG	qPCR <i>KNU</i>		Este trabajo
<b>LBb1</b>	AACCAGCGTGGACCGCTTGCTG	Genotipado <i>flk-2</i> , <i>hua2-4</i> , <i>pep-4</i>		SALK
<b>LBTM3</b>	TAGCATCTGAATTTCCATAACCAATCT CGATACAC	Genotipado <i>hua2-7</i> , <i>pep-2</i>		SAIL
<b>M13F</b>	GTAAAACGACGGCCAGTG	Clonación y secuenciación		Cebador universal
<b>M13R</b>	GGAAACAGCTATGACCATG	Clonación y secuenciación		Cebador universal
<b>MBK21p28</b>	CATGTAAGCCTAGACAATG	Genotipado <i>hua1-1</i>		Western <i>et al.</i> , 2002
<b>MBK21p31</b>	GCAGCATAAAAACTCAGCT	Genotipado <i>hua1-1</i>		Western <i>et al.</i> , 2002
<b>MKD15p7-2</b>	TGCTCCTTTGCTTATTCTCA	Genotipado <i>hua2-1</i>		Western <i>et al.</i> , 2002
<b>MKD15p31</b>	TAAGGTCTGTCCATTCTG	Genotipado <i>hua2-1</i>		Western <i>et al.</i> , 2002
<b>NZZ qF</b>	AGTCGGAGACACGTCATCAGTA	qPCR <i>SPL/NZZ</i>		Este trabajo
<b>NZZ qR</b>	GAAGAAGATACTGATCGTAGCCGT	qPCR <i>SPL/NZZ</i>		Este trabajo
<b>o3144/35St</b>	GTGGATTGATGTGATATCTCC	Genotipado <i>ag-12</i>		Gabi-Kat
<b>OCF16</b>	GCGACGTGGCATTGTA	Genotipado <i>pep-2</i>		Ripoll, 2004
<b>OCF12</b>	TTATTTGACCAGAAACGTAGTG	Genotipado <i>pep-2</i>		Ripoll, 2004
<b>Oligo d(T)- anchor</b>	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTT TTTTTTTTTTTTT	3'RACE		Roche Diagnostics
<b>OTC F</b>	TGAAGGGACAAAGTTGTGTATGTT	qPCR <i>OTC</i>		González-Reig <i>et al.</i> , 2012
<b>OTC R</b>	CGCAGACAAAGTGAATGGA	qPCR <i>OTC</i>		González-Reig <i>et al.</i> , 2012
<b>PCR anchor</b>	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	3'RACE		Roche Diagnostics

<b>PEP for</b>	AGTAGAATTCATGGCCGCCG	Y2H	<i>EcoRI</i>	Este trabajo
<b>PEP rev</b>	ATGAGTCGACTCAAAGATTATAACTG CTGTAGCC	Y2H	<i>Sall</i>	Este trabajo
<b>PI qF</b>	ATGGGTAGAGGAAAGATCGAGATA	qPCR <i>PI</i>		Este trabajo
<b>PI qR</b>	TGCTCGACAGCCATCAGATTTTT	qPCR <i>PI</i>		Este trabajo
<b>RBp5</b>	CATTGTTCTTAAGTTGTCTGGCATA	Genotipado <i>hen4-2</i>		Cheng <i>et al.</i> , 2003
<b>SEP3 QRT 1F</b>	TGCCTTCAAGAGAGGCCTTA	qPCR <i>SEP3</i>		Este trabajo
<b>SEP3 QRT 1R</b>	CAGTCAGCATGCGTTCCTTA	qPCR <i>SEP3</i>		Este trabajo
<b>SHP1 QPCR 1F</b>	GATCTATCGTAATCTTGAGAACTC	qPCR intrón <i>SHP1</i>		Este trabajo
<b>SHP1 I2</b>	CCCCACTTTGTTATCATTGAACT	qPCR intrón <i>SHP1</i>		Este trabajo
<b>SHP1a QPCR F</b>	CTTGAGAACTCAGGATCAATGGAGG	qPCR <i>SHP1</i>		Este trabajo
<b>SHP1a QPCR R</b>	GAGGCTTCTTGCTGATAGTACTGAG	qPCR <i>SHP1</i>		Este trabajo
<b>shp2-1F</b>	GAGGATAGAGAACAACACTACGAATCGT C	qPCR <i>SHP2</i>		Liljegren <i>et al.</i> , 2000
<b>SHP2 RTPCR rv</b>	AGATACATGTTATCGTTTTGCAGCTC	qPCR <i>SHP2</i>		Este trabajo

V= A, C o G



## VIII.- BIBLIOGRAFÍA





## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T.** (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052-1056.
- Adinolfi, S., Bagni, C., Castiglione-Morelli, M.A., Fraternali, F., Musco, G., Pastore, A.** (1999). Novel RNA-binding motif: the KH module. *Biopolymers* **51**, 153-164.
- Albulescu, L.O., Sabet, N., Gudipati, M., Stepankiw, N., Bergman, Z.J., Huffaker, T.C., Pleiss, J.A.** (2012). A quantitative, high-throughput reverse genetic screen reveals novel connections between pre-mRNA splicing and 5' and 3' end transcript determinants. *PLoS Genet.* **8**, e1002530.
- Alexander, M.P.** (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* **44**, 117-122.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Alonso-Cantabrana, H.** (2005). Caracterización de nuevas funciones génicas implicadas en el desarrollo del gineceo y la fructificación en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J.J., Ochando, I., Vera, A., Ferrándiz, C., Martínez-Laborda, A.** (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the *Arabidopsis* *ASYMMETRIC LEAVES1* gene. *Development* **134**, 2663-2671.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos-Cador, A., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R.V., Piñeyro-Nelson, A., Sánchez-Corrales, E.** (2010). Flower development. The *Arabidopsis* book, eds. C. R. Somerville y E. M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Amasino, R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J.* **61**, 1001-1013.
- Anderson, K.V., Ingham, P.W.** (2003). The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nature Genet.* **33**, 285-293.
- Andrés, F., Coupland, G.** (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 627-639.

- Ankeny, R.A., Leonelli, S.** (2011). What is so special about model organisms? *Studies in History and Philosophy of Science: Part A* **42**, 313-323.
- Änko, M.L., Neugebauer, K.M.** (2012). RNA-protein interactions in vivo: global gets specific. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 255-262.
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., Østergaard, L.** (2010). Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **24**, 2127-2132.
- Bagnall, D.J., King, R.W., Whitelam, G.C., Boylan, M.T., Wagner, D., Quail, P.H.** (1995). Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **108**, 1495-1503.
- Balasubramanian, S., Schneitz, K.** (2000). *NOZZLE* regulates proximal-distal pattern formation, cell proliferation and early sporogenesis during ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**, 4227-4238.
- Balanzà, V., Navarrete, M., Trigueros, M., Ferrandiz, C.** (2006). Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* **57**, 3457-3469.
- Barton, M.K.** (2010). Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev. Biol.* **341**, 95-113.
- Bataglia, R., Colombo, M., Katter, M.M.** (2009). The ins and out of ovule development. In: Østergaard L., editor. Fruit Development and Seed Dispersal. *Annual Plant Reviews* **38**, 70-106. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Baumgartner, R., Stocker, H., Hafen, E.** (2013). The RNA-binding proteins FMR1, Rasputin and Caprin act together with the UBA protein Lingerer to restrict tissue growth in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **9**, e1003598.
- Bäurle, I., Dean, C.** (2008). Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of the *Arabidopsis* targets. *PLoS ONE* **3**, e2733.
- Bäurle, I., Smith, L., Baulcombe, D.C., Dean, C.** (2007). Widespread role for the flowering time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science* **318**, 109-112.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci.* **316**, 1194-1199.
- Becker, A., Theissen, G.** (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**, 464-489.
- Bencivenga, S., Simoninia, S., Benková, E., Colombo, L.** (2012). The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **24**, 2886-2897.
- Ben-Tabou de-Leon, S., Davidson, E.H.** (2007). Gene regulation: gene control network in development. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 191-212.
- Berg, M.G., Singh, L.N., Kaida, D., Cho, S., Zhang, Z., Younis, I., Sherrill-Mix, S., Wan, L., Dreyfuss, G.** (2012). U1 snRNP determines mRNA length and regulates isoform expression. *Cell* **150**, 53-64.



- Blázquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R., Weigel, D.** (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* **10**, 791-800.
- Blázquez, M.A., Weigel, D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 889-892.
- Bomsztyk, C., Denisenko, O., Ostrowski, J.** (2004). hnRNP K: one protein, multiple processes. *BioEssays* **26**, 629-638.
- Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S., Dean, C.** (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting and resetting. *Plant Cell* **16**, S18-S31.
- Bowman, J.L.** Editor (1993). *Arabidopsis: an Atlas of Morphology and Development*. Springer-Verlag, Berlin & New York.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., Meyerowitz, E.M.** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1**, 37-52.
- Bowman, J.L., Baum, S.F., Eshed, Y., Putterill, J., Alvarez, J.** (1999). Molecular genetics of gynoecium development in *Arabidopsis*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **45**, 155-205.
- Brambilla, V., Battaglia, R., Colombo, M., Masiero, S., Bencivenga, S., Kater, M.M., Colombo, L.** (2007). Genetic and molecular interactions between *BELL1* and MADS box factors support ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2544-2556.
- Burd, C.G., Dreyfuss, G.** (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**, 615-621.
- Busch, W., Benfey, P.N.** (2010). Information processing without brains - the power of intercellular regulators in plants. *Development* **137**, 1215-1226.
- Cao, W., Razanau, A., Feng, D., Lobo, V.G., Xie, J.** (2012). Control of alternative splicing by forskolin through hnRNP K during neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8059-8071.
- Carles, C.C., Fletcher, J.C.** (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci.* **8**, 394-401.
- Causier, B., Bradley, D., Cook, H., Davies, B.** (2009). Conserved intragenic elements were critical for the evolution of the floral C-function. *Plant J.* **58**, 41-52.
- Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., Davies, B.** (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Sem. Cell Dev. Biol.* **21**, 73-79.
- Chaudhury, A., Chander, P., Howe, P.H.** (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA* **16**, 1449-1462.
- Chen, T., Cui, P., Chen, H., Ali, S., Zhang, S., Xiong, Z.** (2013) A KH-domain RNA-binding protein interacts with FIERY2/CTD phosphatase-like 1 and splicing factors and is important for pre-mRNA splicing in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **9**, e1003875.
- Chen, X., Meyerowitz, E.M.** (1999). *HUA1* and *HUA2* are two members of the floral homeotic *AGAMOUS* pathway. *Mol. Cell* **3**, 349-360.

- Cheng, Y., Kato, N., Wang, W., Li, J., Chen, X.** (2003). Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of *AGAMOUS* pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Cell* **4**, 53-66.
- Chevalier, D., Batoux, M., Fulton, L., Pfister, K., Kishor Yadav, R., Schellenberg, M., Schneitz, K.** (2005). *STRUBBELIG* defines a receptor kinase-mediated signaling pathway regulating organ development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 9074-9079.
- Chevalier, E., Loubert-Hudon, A., Zimmerman, E.L., Matton, D.P.** (2011). Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization. *New Phytol.* **192**, 13-28.
- Choi, C. Q.** (2012). A blossoming field of research: how florigen is transported to create flowers. *PLoS Biol.* **10**, e1001311.
- Choi, H.S., Hwang, C.K., Song, K.Y., Law, P.Y., Wei, L.N., Loh, H.H.** (2009). Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **380**, 431-436.
- Christensen, C.A., Subramanian, S., Drews, G.N.** (1998). Identification of gametophytic mutations affecting female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **202**, 136-151.
- Clark, S. E.** (2001). Cell signalling at the shoot meristems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 276-284.
- Clark, S.E., Running, M.P., Meyerowitz, E.M.** (1993). *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**, 397-418.
- Clark, S.E., Running, M.P., Meyerowitz, E.M.** (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* **121**, 2057-2067.
- Clark, S.E., Williams, R.W., Meyerowitz, E.M.** (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristems size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- Clough, S.J., Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-43.
- Coen, E.S., Meyerowitz, E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.
- Colombo, M., Brambilla, V., Marcheselli, R., Caporali, E., Kater, M.M., Colombo, L.** (2010). A new role for the *SHATTERPROOF* genes during *Arabidopsis* gynoecium development. *Dev. Biol.* **337**, 294-302.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.
- Crepet, W.L.** (2000). Progress in understanding angiosperm history, success, and relationships: Darwin's abominably "perplexing phenomenon". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12939-12941.

- Crevillén, P., Sonmez, C., Wu, Z., Dean, C.** (2013). A gene loop containing the floral repressor FLC is disrupted in the early phase of vernalization. *EMBO J.* **32**, 140-148.
- Crogan, N.T., Hogan, K., Long, J.A.** (2012). APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. *Development* **139**, 4180-4190.
- Cui, M., Chen, J., Myers, T.R., Hwang, B.J., Sternberg, P.W., Greenwald, I., Han, M.** (2006). SynMuv genes redundantly inhibit *lin-3/EGF* expression to prevent inappropriate vulval induction in *C. elegans*. *Dev. Cell* **10**, 667-672.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffitts, J.S., Somerville, C.R.** (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3718-3723.
- Dahan, O., Gingold, H., Pilpel, Y.** (2011). Regulatory mechanisms and networks couple the different phases of gene expression. *Trends Genet.* **27**, 316-322.
- Da Silva, N., Bharti, A., Shelley, C.S.** (2002). hnRNP-K and Pura $\alpha$  act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter. *Blood* **100**, 3536-3544.
- Davies B., Egea-Cortines, M., de Andrade, S.E., Saedler, H., Sommer, H.** (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO J.* **15**, 4330-4343.
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M., Furner, I.** (2008). Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **13**, 4-6.
- De Boule, K., Verkerk, A.J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B.A., Willems, P.J.** (1993). A point mutation in the *FMR-1* gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* **3**, 31-35.
- Deshpande, G., Calhoun, G., Schedl, P.** (2006). The drosophila fragile X protein dFMR1 is required during early embryogenesis for pole cell formation and rapid nuclear division cycles. *Genetics* **174**, 1287-1298.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Inzé, D.** (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 655-665.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., Yanofsky, M.F.** (2004). The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr. Biol.* **14**, 1935-1940.
- Dinneny, J.R., Weigel, D., Yanofsky, M.F.** (2005). A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4687-4696.
- Dinneny, J.R., Yanofsky, M.F.** (2005). Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. *BioEssays* **27**, 42-49.
- Doyle, M.R., Bizzell, C.M., Keller, M.R., Michaels, S.D., Song, J., Noh, Y.S., Amasino, R.M.** (2005). *HUA2* is required for the expression of floral repressors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **41**, 376-385.
- Drews, G.N., Koltunow, A.M.G.** (2011). The female gametophyte. The *Arabidopsis* book, eds. C. R. Somerville y E. M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

- Dreyfuss, G., Kim, V.N., Kataoka, N.** (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 195-205.
- Du, Z., Yu, J., Chen, Y., Andino, R., James, T.L.** (2004). Specific recognition of the C-rich strand of human telomeric DNA and the RNA template of human telomerase by the first KH domain of human poly(C)-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* **279**, 48126-48134.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., Sommer, H.** (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **18**, 5370-5379.
- Elkon, R., Ugalde, A.P., Agami, R.** (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 496-506.
- Eshed, Y., Baum, S.F., Bowman, J.L.** (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* **99**, 199-209.
- Fang, R.X., Nagy, F., Sivasubramanian, S., Chua, N.H.** (1989). Multiple *cis* regulatory elements for maximal expression of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* **1**, 141-150.
- Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M.F., Kater, M.M., Colombo, L.** (2003). MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2603-2611.
- Fay, D.S., Yochem, J.** (2007). The *SynMuv* genes of *Caenorhabditis elegans* in vulval development and beyond. *Dev. Biol.* **306**, 1-9.
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J., Beach, D.** (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1502-1503.
- Feng, X., Zilberman, D., Dickinson, H.** (2013). A conversation across generations: soma-germ cell crosstalk in plants. *Dev. Cell* **24**, 215-225.
- Ferrández, C.** (2002). Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **53**, 2031-2038.
- Ferrández, C., Gu, Q., Martienssen, R., Yanofsky, M.F.** (2000 a). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* **127**, 725-734.
- Ferrández, C., Liljegren, S.J., Yanofsky, M.F.** (2000 b). Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* **289**, 436-438.
- Ferrández, C., Pelaz, S., Yanofsky, M.F.** (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 321-354.
- Fields S., Song O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fosket, D.E.** (1994). Plant growth and development. A molecular approach. Academic Press.
- Gilbert, S.F.** (2005). Biología del Desarrollo (7ª edición en Español). Editorial Médica Panamericana.
- Goethe, J.W.V.** (1790). Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären. (Gotha, Germany: C.W. Ettinger).

- González-Reig, S., Ripoll, J.J., Vera, A., Yanofsky, M.F., Martínez-Laborda, A.** (2012). Antagonistic gene activities determine the formation of pattern elements along the mediolateral axis of the *Arabidopsis* fruit. *PLoS Genet.* **8**, e1003020.
- Grafi, G.** (2004). How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Dev. Biol.* **268**, 1-6.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L., Kater, M.M.** (2006). *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1373-1382.
- Gremski, K., Ditta, G., Yanofsky, M.F.** (2007). The *HECATE* genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **134**, 3593-3601.
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y.** (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J. Biol. Chem.* **276**, 29188-29194.
- Grishin, N.V.** (2001). KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res.* **29**, 638-643.
- Groß-Hardt, R., Kägi, C., Baumann, N., Moore, J.M., Baskar, R., Gagliano, W.B., Jurgens, G., Grossniklaus, U.** (2007). LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* **5**, e47.
- Grossniklaus, U.** (2011). Plant germline development: a tale of cross-talk, signalling, and cellular interactions. *Sex. Plant Reprod.* **24**, 91-95.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., Martienssen, R.** (1998). The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**, 1509-1517.
- Guan, Q., Wen, C., Zeng, H., Zhu, J.** (2013). A KH domain-containing putative RNA-binding protein is critical for heat stress-responsive gene regulation and thermotolerance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **6**, 386-395.
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B., Yanofsky, M.F.** (1994). Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* **76**, 131-143.
- He, Y., Michaels, S.D., Amasino, R.M.** (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* **302**, 1751-1754.
- Helliwell, C.A., Wood, C.C., Robertson, M., Peacock, W.J., Dennis, E.S.** (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular weight protein complex. *Plant J.* **46**, 183-192.
- Henderson, I.R., Dean, C.** (2004). Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* **131**, 3829-3838.
- Heo, J.B., Sung, S.** (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**, 76-79.
- Hirano, T., Matsuzawa, T., Takegawa, K., Sato, M.H.** (2011). Loss-of-function and gain-of-function mutations in *FAB1A/B* impair endomembrane homeostasis, conferring pleiotropic developmental abnormalities in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**, 797-807.



- Hong, R.L., Hamaguchi, L., Busch, M.A., Weigel, D.** (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell* **15**, 1296-1309.
- Hsin, J.P., Manley, J.L.** (2012). The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev.* **26**, 2119-2137.
- Huijser, P., Schmid, M.** (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development* **138**, 4117-4129.
- Ietswaart, R., Wu, Z., Dean, C.** (2012). Flowering time control: another window to the connection between antisense RNA and chromatin. *Trends Genet.* **28**, 445-453.
- Immink, R.G., Tonaco, I.A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A.D., Busscher-Lange, J., Borst, J.W., Angenent, G.C.** (2009). SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol.* **10**, R24.
- Ito, T., Ng, K.H., Lim, T.S., Yu, H., Meyerowitz, E.M.** (2007). The homeotic protein *AGAMOUS* controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3516-3529.
- Ito, T., Wellmer, F., Yu, H., Das, P., Ito, N., Alves-Ferreira, M., Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M.** (2004). The homeotic protein *AGAMOUS* controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*. *Nature* **430**, 356-360.
- Jack, T.** (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* **16**, S1-S17, Supplement.
- Jaeger, K.E., Pullen, N., Lamzin, S., Morris, R.J., Wigge, P.A.** (2013). Interlocking feedback loops govern the dynamic behavior of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 820-833.
- Janakirama, P.** (2013). Functional characterization of the *HUA2* gene family in *Arabidopsis thaliana*. PhD. The School of Graduate and Postdoctoral Studies. The University of Western Ontario. London, Ontario, Canada. <http://ir.lib.uwo.ca/etd/1109/>
- Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J.** (2010). Principios del Desarrollo (Lewis Wolpert 3ª Edición en Español). Editorial Médica Panamericana.
- Ji, L., Liu, X., Yan, J., Wang, W., Yumul, R.E., Kim, Y.J., Dinh, T.T., Liu, J., Cui, X., Zheng, B., Agarwal, M., Liu, C., Cao, X., Tang, G., Chen, X.** (2011 a). *ARGONAUTE10* and *ARGONAUTE1* regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **7**, e1001358.
- Ji, X., Kong, J., Liebhaber, S.A.** (2011 b). An RNA-protein complex links enhanced nuclear 3' processing with cytoplasmic mRNA stabilization. *EMBO J.* **30**, 2622-2633.
- Ji, X., Wan, J., Vishnu, M., Xing, Y., Liebhaber, S.A.** (2013).  $\alpha$ CP poly(C) binding proteins act as global regulators of alternative polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2560-2573.
- Jiang, J., Wang, B., Shen, Y., Wang, H., Feng, Q., Shi, H.** (2013). The *Arabidopsis* RNA binding protein with K homology motifs, SHINY1, interacts with the c-terminal domain phosphatase-like 1 (CPL1) to repress stress-inducible gene expression. *PLoS Genet.* **9**, e1003625.

- Kaida, K., Berg, M.G., Younis, I., Kasim, M., Singh, L.N., Wan, L., Dreyfuss, G.** (2010). U1 snRNP protects pre-mRNA from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* **468**, 664-668.
- Kalisz, S., Kramer E.M.** (2008). Variation and constraint in plant evolution and development. *Heredity* **100**, 171-77.
- Kaufmann, K., Pajoro, A., Angenent, G.** (2010). Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 830-842.
- Kay, P., Groszmann, M., Ross, J.J., Parish, R.W., Swain, S.M.** (2013). Modifications of a conserved regulatory network involving INDEHISCENT controls multiple aspects of reproductive tissue development in Arabidopsis. *New Phytol.* **197**, 73-87.
- Kelley, D.R., Gasser, C.S.** (2009). Ovule development: genetic trends and evolutionary considerations. *Sex. Plant Reprod.* **22**, 229-234.
- Kerppola, T.K.** (2006). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat. Protoc.* **1**, 1278-1286.
- Kippert, F.** (1995). A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of  $\beta$ -galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 201-206.
- Kooiker, M., Airoidi, C.A., Losa, A., Manzotti, P.S., Finzi, L., Kater, M.M., Colombo, L.** (2005). BASIC PENTACYSSTEINE1, a GA binding protein that induces conformational changes in the regulatory region of the homeotic Arabidopsis gene *SEEDSTICK*. *Plant Cell* **17**, 722-729.
- Koorneef, M., Hanhart, C.J., van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 57-66.
- Koorneef, M., Meinke, D.** (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J.* **61**, 909-921.
- Kranz, A. R., Kirchheim, B.** (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **24**.
- Krizek, B.A., Fletcher, J.C.** (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Rev. Genet.* **6**, 688-698.
- Larsson, E., Franks, R.G., Sundberg, E.** (2013). Auxin and the *Arabidopsis thaliana* gynoecium. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/ert099.
- Lee, I., Aukerman, M.J., Gore, S.L., Lohman, K.N., Michaels, S.D., Weaver, L.M., John, M.C., Feldmann, K.A., Amasino, R.M.** (1994). Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**, 75-83.
- Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., Park, O.K., Lee, J.S., Ahn, J.H.** (2006). Integration of floral inductive signals by flowering locus T and suppressor of overexpression of *Constans1*. *Physiol. Plant* **126**, 475-483.
- Lee, J., Oh, M., Park, H., Lee, I.** (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J.* **55**, 832-843.
- Lee, J., Lee, I.** (2010). Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *J. Exp. Bot.* **61**, 2247-2254.



- Lenhard, M., Laux, T.** (1999). Shoot meristem formation and maintenance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 44-50.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G., Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**, 805-814.
- Leyser, O.** (2003). Regulation of shoot branching by auxin. *Trends Plant Sci.* **8**, 541-545.
- Leyser, O., Day, S.** (2003). Mechanisms in plant development. *Blackwell Publishing*.
- Li, J., Jia, D., Chen, X.** (2001). *HUA1*, a regulator of stamen and carpel identities in *Arabidopsis*, codes for a nuclear zinc finger protein. *Plant Cell* **13**, 2269-2281.
- Liljegen, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S., Yanofsky, M.F.** (1999). Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell* **11**, 1007-1018.
- Liljegen, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., Yanofsky, M.F.** (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 766-770.
- Liljegen, S.J., Roeder, A.H.K., Kempin, S.A., Gremski, K., Østergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K., Yanofsky, M.F.** (2004). Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* **116**, 843-853.
- Lim, M.Y., Kim, J., Kim, Y.S., Chung, K.S., Seo, Y.H., Lee, I., Kim, J., Hong, C.B., Kim, H.J., Park, C.M.** (2004). A new *Arabidopsis* gene, *FLK*, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via *FLOWERING LOCUS C*. *Plant Cell* **16**, 731-740.
- Liu, C., Chen, H., Er, H.L., Soo, H.M., Kumar, P.P., Han, J.H., Liou, Y.C., Yu, H.** (2008). Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development* **135**, 1481-1491.
- Liu, F., Quesada, V., Crevillén, P., Bäurle, I., Swizewski, S., Dean, C.** (2007). The *Arabidopsis* RNA-binding protein *FCA* requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate *FLC*. *Mol. Cell* **28**, 398-407.
- Liu, X., Huang, J., Parameswaran, S., Ito, T., Seubert, B., Auer, M., Rymaszewski, A., Jia, G., Owen, H.A., Zhao, D.** (2009). The *SPOROCTELESS/NOZZLE* gene is involved in controlling stamen identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**, 1401-1411.
- Liu, X., Kim, Y.J., Müller, R., Yumul, R.E., Liu, C., Pan, Y., Cao, X., Goodrich, J., Chen, X.** (2011). *AGAMOUS* terminates floral stem cell maintenance in *Arabidopsis* by directly repressing *WUSCHEL* through recruitment of Polycomb group proteins. *Plant Cell* **23**, 3654-3670.
- Liu, Y., Gervasi, C., Szaro, B.G.** (2008). A crucial role for hnRNP K in axon development in *Xenopus laevis*. *Development* **135**, 3125-3135.
- Liu, Y., Szaro, B.G.** (2011). hnRNP K post-transcriptionally co-regulates multiple cytoskeletal genes needed for axonogenesis. *Development* **138**, 3079-3090.

- Llave, C., Kasschau, K.D., James C. Carrington, J.C.** (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13401-13406.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.
- Loke, J.C., Stahlberg, E.A., Strenski, D.G., Haas, B.J., Wood, P.C., Li, Q.Q.** (2005). Compilation of mRNA polyadenylation signals in *Arabidopsis* revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiol.* **138**, 1457-1468.
- Lorković, Z.J., Barta, A.** (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **30**, 623-635.
- Lyndon, R.F.** (1990). Plant development. *Unwin Hyman*.
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C., Dean, C.** (1997). *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**, 737-745.
- Makeyev, A.V., Liebhaber, S.A.** (2002). The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA* **8**, 265-278.
- Mandel, M.A., Bowman, J.L., Kempin, S.A., Ma, H., Meyerowitz, E.M., Yanofsky, M.F.** (1992). Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. *Cell* **71**, 133-143.
- Marsch-Martínez, N., Ramos-Cruz, D., Irepan Reyes-Olalde, J., Lozano-Sotomayor, P., Zúñiga-Mayo, V.M., de Folter, S.** (2012). The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant J.* **72**, 222-234.
- Martinez-Laborda A., Vera, A.** (2009). *Arabidopsis* fruit development. In: Østergaard L, editor. Fruit Development and Seed Dispersal. *Annual Plant Reviews*, Volume **38**, 172-203. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Masiero, S., Colombo, L., Grini, P.E., Schnittger, A., Kater, M.M.** (2011). The emerging importance of type I MADS box transcription factors for plant reproduction. *Plant Cell* **23**, 865-872.
- Matias-Hernandez, L., Battaglia, R., Galbiati, F., Rubes, M., Eichenberger, C., Grossniklaus, U., Kater, M.M., Colombo, L.** (2010). *VERDANDI* is a direct target of the MADS domain ovule identity complex and affects embryo sac differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 1702-1715.
- Meinke, D., Koornneef, M.** (1997). Community standards for *Arabidopsis* genetics. *Plant J.* **12**, 247-253.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef M.** (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Meng, Q., Rayala, S.K., Gururaj, A.E., Talukder, A.H., O'Malley, B.W., Kumar, R.** (2007). Signaling-dependent and coordinated regulation of transcription, splicing, and translation resides in a single coregulator, PCBP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5866-5871.

- Meyerowitz, E. M.** (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**, 1482-1485.
- Michaels, S., Amasino, R.** (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**, 949-956.
- Michaels, S., Amasino, R.** (2001). Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous-pathway mutations, but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* **13**, 935-942.
- Michaels, S.D., Himelblau, E., Kim, S.Y., Schomburg, F.M., Amasino, R.M.** (2005). Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**, 149-156.
- Michaels, S.D.** (2009). Flowering time regulation produces much fruit. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 75-80.
- Mikula, M., Bomsztyk, K.** (2011). Direct recruitment of ERK cascade components to inducible genes is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K. *J. Biol. Chem.* **286**, 9763-9775.
- Millevoi, S., Vagner, S.** (2010). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2757-2774.
- Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J.Y., Helariutta, Y.** (2013). Stem cell function during plant vascular development. *EMBO J.* **32**, 178-193.
- Mockler, T.C., Yu, X., Shalitin, D., Parikh, D., Michael, T.P., Liou, J., Huang, J., Smith, Z., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Chory, J., Lin, C.** (2004). Regulation of flowering time in *Arabidopsis* by K homology domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **34**, 12759-12764.
- Moll, C., von Lyncker, L., Zimmermann, S., Kägi, C. Baumann, N., Twell, D., Grossniklaus, U., Groß-Hardt, R.** (2008). *CLO/GFA1* and *ATO* are novel regulators of gametic cell fate in plants. *Plant J.* **56**, 913-921.
- Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G.** (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* **14**, S111-S130.
- Müller-McNicoll, M., Neugebauer, K.M.** (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 275-287.
- Muralla, R., Lloyd, J., Meinke, D.** (2011). Molecular foundations of reproductive lethality in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **6**, e28398.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Mutasa-Göttgens, E., Hedden, P.** (2009). Giberellin as a factor in floral regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **60**, 1979-1989.
- Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y.F., Goshima, N., Hirose, T.** (2012). Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J.* **31**, 4020-4034.
- Nemhauser, J., Feldman, L., Zambryski, P.** (2000). Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* **127**, 3877-3888.

- Nimchuk, Z.L., Tarr, P.T., Ohno, C., Qu, X., Meyerowitz, E.M.** (2011). Plant stem cell signaling involves ligand-dependent trafficking of the CLAVATA1 receptor kinase. *Curr. Biol.* **21**, 345-352.
- Ng, M., Yanofsky, M.F.** (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 186-195.
- Ohtani, M., Demura, T., Sugiyama, M.** (2013). *Arabidopsis* ROOT INITIATION DEFECTIVE1, a DEAH-box RNA helicase involved in pre-mRNA splicing, is essential for plant development. *Plant Cell* **25**, 2056-2069.
- Okamoto, J.K., Caster, B., Villarreal, R., Van Montagu, M., Jofuku, K.D.** (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7076-7081.
- O'Maoláidigh, D.S., Graciet, E., Wellmer, F.** (2013 a). Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.1244.
- O'Maoláidigh, D.S., Wuest, S.E., Rae, L., Raganelli, A., Ryan, P.T., Kwasniewska, K., Das, P., Lohan, A.J., Loftus, B., Graciet, E., Wellmer, F.** (2013 b). Control of reproductive floral organ identity specification in *Arabidopsis* by the C function regulator AGAMOUS. *Plant Cell* **25**, 2482-2503.
- Page, T., Macknight, R., Yang, C.H., Dean, C.** (1999). Genetic interactions of the *Arabidopsis* flowering time gene *FCA*, with genes regulating floral initiation. *Plant J.* **17**, 231-239.
- Palumbo, M.C., Farina, L., De Santis, A., Giuliani, A., Colosito, A., Morelli, G., Ruberti, I.** (2008). Collective behavior in gene regulation: post-transcriptional regulation and the temporal compartmentalization of cellular cycles. *FEBS J.* **275**, 2364-2371.
- Pandya-Jones, A., Black, D.L.** (2009). Co-transcriptional splicing of constitutive and alternative exons. *RNA* **15**, 1896-1908.
- Parentová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C., Colombo, L.** (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-Box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**, 1538-1551.
- Payne, T., Johnson, S.D., Koltunow, A.M.** (2004). *KNUCKLES (KNU)* encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the *Arabidopsis* gynoecium. *Development* **131**, 3737-3749.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F.** (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Pérez-Pérez, J.M., Ponce, M.R., Micol, J.L.** (2004). The *ULTRACURVATA2* gene of *Arabidopsis* encodes an FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant Physiol.* **134**, 101-117.
- Peterson, R., Slovin, J.P., Chen, C.** (2010). A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Int. J. Plant Biol.* **1**, 66-69.
- Phelps-Durr, T.L., Thomas, J., Vahab, P., Timmermans, M.C.P.** (2005). Maize rough sheath2 and its *Arabidopsis* orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted

- histone chaperone, to maintain *knox* gene silencing and determinacy during organogenesis. *Plant Cell* **17**, 2886-2898.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F.** (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**, 85-88.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, E45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, E36.
- Proudfoot, N.J.** (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* **25**, 1770-1782.
- Quesada, V., Macknight, R., Dean, C., Simpson, G.G.** (2003). Autoregulation of pre-mRNA processing controls flowering time. *EMBO J.* **22**, 3142-3152.
- Quesada, V., Dean, C., Simpson, G.G.** (2005). Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 773-780.
- Quesada, V., Sarmiento-Mañús, R., González-Bayón, Hricová, A., Ponce, M.R., Micol, J.L.** (2013). *PORPHOBILINOGEN DEAMINASE* deficiency alters vegetative and reproductive development and causes lesions in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **8**, e53378.
- Radomska, K.J., Halvardson, J., Reinius, B., Lindholm Carlström, E., Emilsson, L., Feuk, L., Jazin, E.** (2013). RNA-binding protein QKI regulates *Glial fibrillary acidic protein* expression in human astrocytes. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1373-1382.
- Rajani, S., Sundaresan, V.** (2001). The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr. Biol.* **11**, 1914-1922.
- Ratcliffe, O.J., Nadzan, G.C., Reuber, T.L., Riechmann, J.L.** (2001). Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* homologue. *Plant Physiol.* **126**, 122-132.
- Ray, A., Robinson-Beers, K., Ray, S., Baker, S.C., Lang, J.D., Preuss, D., Milligan, S.B., Gasser, C.S.** (1994). The *Arabidopsis* floral homeotic gene *BELL* (*BEL1*) controls ovule development through negative regulation of *AGAMOUS* gene (*AG*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5761-5765.
- Rédei, G.P.** (1962). Single locus heterosis. *Zeitschrift für Vererbungslehre* **93**, 164-170.
- Ripoll, J.J.** (2004). Análisis genético y molecular de *PEP1*, un gen implicado en la morfogénesis del fruto de *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Ripoll, J.J., Ferrándiz, C., Martínez-Laborda, A., Vera, A.** (2006). *PEPPER*, a novel K-homology domain gene, regulates vegetative and gynoecium development in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **289**, 346-359.
- Ripoll, J.J., Rodríguez-Cazorla, E., González-Reig, S., Andújar, A., Alonso-Cantabrana, H., Perez-Amador, M.A., Carbonell, J., Martínez-Laborda, A., Vera, A.** (2009). Antagonistic



- interactions between *Arabidopsis* K-homology domain genes uncover *PEPPER* as a positive regulator of the central floral repressor *FLOWERING LOCUS C*. *Dev. Biol.* **333**, 251-262.
- Ripoll, J.J., Roeder, A.H., Ditta, G.S., Yanofsky, M.F.** (2011). A novel role for the floral homeotic gene *APETALA2* during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **138**, 5167-76.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R.E., Gasser, C.S.** (1992). Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *Plant Cell* **4**, 1237-1249.
- Roeder, A.H.K., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F.** (2003). The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Curr. Biol.* **13**, 1630-1635.
- Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., Meyerowitz, E.M.** (2010). Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.*, **8**, e1000367.
- Roeder, A.H.K., Cunha, A., Ohno, C.K., Meyerowitz, E.M.** (2012). Cell cycle regulates cell type in the *Arabidopsis* sepal. *Development* **139**, 4416-4427.
- Roeder, A.H.K., Yanofsky, M.F.** (2006). Fruit development in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* Book, eds. C.R. Somerville y E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Rojo, E., Sharma, V.K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Fletcher, J.C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space where it activates the *Arabidopsis* *CLAVATA* stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**, 969-977.
- Ruiz-Garcia, L., Madueño, F., Wilkinson, M., Haug, G., Salinas, J., Martínez-Zapater, J.M.** (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1921-1934.
- Sablowski, R.** (2007). Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **58**, 899-907.
- Schauer, S.E., Schlüter, P.M., Baskar, R., Gheyselink, J., Bolaños, A., Curtis, M.D., Grossniklaus, U.** (2009). Intronic regulatory elements determine the divergent expression patterns of *AGAMOUS-LIKE6* subfamily members in *Arabidopsis*. *Plant J.* **59**, 987-1000.
- Schieffhale, U., Balasubramanian, S., Sieber, P., Chevalier, D., Wisman, E., Schneitz, K.** (1999). Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11664-11669.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jürgens, G., Laux, T.** (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristem is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Searle, I., He, Y., Turk, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., Coupland, G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**, 898-912.

- Sheldon, C.C., Conn, A.B., Dennis, E.S., Peacock, W.J.** (2002). Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* **14**, 2527-2537.
- Skinner, D.J., Hill, T.A., Gasser, C.S.** (2004). Regulation of ovule development. *Plant Cell* **16**, S32-S45.
- Sieburth, L.E., Meyerowitz, E.M.** (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-365.
- Sijacic, P., Wang, W., Liu, Z.** (2013). Recessive antimorphic alleles overcome functionally redundant loci to reveal TSO1 function in Arabidopsis flowers and meristems. *PLoS Genet.* **7**, e10002352.
- Singh, J., Padgett, R.A.** (2009). Rates of in situ transcription and splicing in large human genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1128-1133.
- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L., Dreyfuss, G.** (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**, 33-39.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., Dreyfuss, G.** (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionary conserved motif. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1193-1198.
- Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Angenent, G.C., Kaufmann, K.** (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS domain factors: insights from recent studies. *Development* **139**, 3081-3098.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Somerville, C., Koornneef, M.** (2002). A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 883-889.
- Song, J., Inrwin, J., Dean, C.** (2013). Remembering the prolonged cold winter. *Curr. Biol.* **23**, R807-R811.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S.J., Ljung, K., Robles, P., Galván-Ampudia, C.S., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, M.F., Østergaard, L.** (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **459**, 583-586.
- Spannagl, M., Mayera, K., Durnerb, J., Haberera, G., Fröhlich, A.** (2011). Exploring the genomes: from Arabidopsis to crops. *J. Plant Physiol.* **168**, 3-8.
- Sparks, E., Wachsman, G., Benfey, P.N.** (2013). Spatiotemporal signalling in plant development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 631-644.
- Strader, L.C., Ritchie, S., Soule, J.D., McGinnis, K.M., Steber, C.M.** (2004). Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene *SLEEPY1* are rescued by overexpression of its homologue, *SNEEZY*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12771-12776.
- Streitner, A., Köster, T., Simpson, C.G., Shaw, P., Danisman, S., Brown, J.W.S., Staiger, D.** (2012). An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by *in vivo* interaction with transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 11240-11255.



- Sun, B., Xu, Y., Ng, K.H., Ito, T.** (2009). A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the *Arabidopsis* floral meristem. *Genes Dev.* **23**, 1791-1804.
- Sun, Q., Csorba, T., Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., Dean, C.** (2013). R-loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis* *FLC* Locus. *Science* **340**, 619-621.
- Sundberg, E., Ferrándiz, C.** (2009). Gynoecium patterning in Arabidopsis: a basic plan behind a complex structure. In: Østergaard L., editor. Fruit Development and Seed Dispersal. *Annual Plant Reviews*, Volume **38**, 35-69. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Sung, S., Amasino, R.M.** (2005). Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**, 491-508.
- Takada, H., Kawana, T., Ito, Y., Kikuno, R.F., Mamada, H., Araki, T., Koga, H., Asashima, M., Taira, M.** (2009). The RNA-binding protein Mex3b has a fine-tuning system for mRNA regulation in early *Xenopus* development. *Development* **136**, 2413-2422.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thiele, B.J., Doller, A., Kähne, T., Pregla, R., Hetzer, R., Regitz-Zagrosek, V.** (2004). RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis. *Circ. Res.* **95**, 1058-1066.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tian, B., Manley, J.L.** (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 312-320.
- Urbanus, S., de Folter, S., Shchennikova, A., Kaufmann, K., Immink, R., Angenent, G.** (2009). *In planta* localisation patterns of MADS domain proteins during floral development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **9**, 5.
- Valverde, R., Edwards, L., Regan, L.** (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J.* **275**, 2712-2726.
- Van Norman, J.M., Breakfield, N.W., Benfey, P.N.** (2011). Intercellular communication during plant development. *Plant Cell* **23**, 855-864.
- Vargas, D.Y., Shah, K., Batish, M., Levandoski, M., Sinha, B., Marras, S.A.E., Schedl, P., Tyagi, S.** (2011). Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing. *Cell* **147**, 1054-1065.
- Veitia, R.A., Bottani, S., Birchler, J.A.** (2013). Gene dosage effects: nonlinearities, genetic interactions, and dosage compensation. *Trends Genet.* **29**, 385-393.
- Völz, R., von Lyncker, L., Baumann, N., Dresselhaus, T., Sprunck, S., Groß-Hardt, R.** (2012). *LACHESIS*-dependent egg-cell signaling regulates the development of female gametophytic cells. *Development* **139**, 498-502.
- Wagner, A.** (2000). Robustness against mutations in genetic networks in yeast. *Nat. Genet.* **24**, 355-361.

- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**, 428-438.
- Wang, Q., Sajja, U., Rosloski, S., Humphrey, T., Kim, M.C., Bomblies, K., Weigel, D., Grbic, V.** (2007). *HUA2* caused natural variation in shoot morphology of *A. thaliana*. *Curr. Biol.* **17**, 1513-1519.
- Wang, W., Yang, D., Feldmann, K.A.** (2011). *EFO1* and *EFO2*, encoding putative WD-domain proteins, have overlapping and distinct roles in the regulation of vegetative development and flowering of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **62**, 1077-1088.
- Weigel, D., Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Wendrich, J.R., Weijers, D.** (2013). The *Arabidopsis* embryo as a miniature morphogenesis model. *New Phytol.* **199**, 14-25.
- Western, T.L., Haughn, G.W.** (1999). *BELL1* and *AGAMOUS* genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 329-336.
- Western, T.L., Cheng, Y., Liu, J., Chen, X.** (2002). *HUA ENHANCER2*, a putative DEXH-box RNA helicase, maintains homeotic B and C gene expression in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1569-1581.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., Weigel, D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**, 1056-1059.
- Wilkinson, M.F., Shyu, A.B.** (2001). Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *BioEssays* **23**, 775-787.
- Wilson, Z.A., Zhang, D.B.** (2009). From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *J. Exp. Bot.* **60**, 1479-1492.
- Yang, W.C., Shi, D.-Q., Chen, Y.H.** (2010). Female gametophyte development in flowering plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **61**, 89-108.
- Yang, W.C., Ye, D., Xu, J., Sundaresan, V.** (1999). The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev.* **13**, 2108-2117.
- Yano, M., Okano, H.J., Okano, H.** (2005). Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 12690-12699.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., Meyerowitz E.M.** (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-39.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., Schmid, M.** (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *Plant Cell* **22**, 2156-2170.

- Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J., Lee, J.H., Hong, S.M., Yoo, S.J., Yoo, S.Y., Lee, J.S., Ahn, J.H.** (2005). *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**, 770-778.
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T.T., Chen, X.** (2007). miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of *APETALA3* and *PISTILLATA* expression domain in *Arabidopsis* floral meristems. *Plant J.* **51**, 840-849.
- Zhu, L., Zhang, Y., Kang, E., Xu, Q., Wang, M., Rui, Y., Liu, B., Yuan, M., Fu, Y.** (2013). MAP18 regulates the direction of pollen tube growth in *Arabidopsis* by modulating F-Actin organization. *Plant Cell* **25**, 851-867.

