



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Evolución y Caracterización Funcional de los
genes *HEC3* en el Desarrollo de Flores y
Fruto de *Nicotiana benthamiana*

Presentada por:

Clara Inés Ortiz-Ramírez

Dirigida por:

Cristina Ferrándiz- Maestre

Ludovico Dreni

Valencia, Febrero 2023



Imagen tomada de: Curtis's Botanical Magazine, Volume: 35,
Issue: 3, Pages: 286-294, First published: 27 November 2018,
DOI: (10.1111/curt.12249)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

Evolución y Caracterización Funcional de los genes *HEC3* en el
Desarrollo de Flores y Fruto de *Nicotiana benthamiana*

Clara Inés Ortiz-Ramírez

Dirigida por:

Cristina Ferrándiz- Maestre

Ludovico Dreni

Febrero 2023

Agradecimientos

El que me conoce, sabe que estas cursilerías no se me dan bien!!

Me gustaría iniciar agradeciendo a mi mamá y mi hermanita, porque ellas son el motor de mi vida. Y por supuesto a mi Adri! Por ser mi amor, en los tiempos de colera.

Ahora quiero dedicar varias palabras sentidas a todas las personas que han hecho parte de mi tesis doctoral. Este camino que no solo me ha retado y llenado de grandes triunfos y unos pocos fracasos, sino que también me ha enseñado de lo que de los soy capaz de hacer por lo quiero y lo que me gusta!

Inicio por Cris, mi asesora y directora de tesis, a ti debo agradecerte la confianza desde el primer momento. Gracias por enseñarme a trabajar con amor y practicidad, pero sobre todo quiero agradecerte por enseñarme a valorar mi trabajo. Obviamente, gracias a Ludo, por las palabras cortas y oportunas. Por las asesorías en ciencia evolutiva. A los dos, gracias, por asesorar este trabajo tan hermoso!

A las niñas, por enseñarme la cara bonita de la ciencia, el compañerismo y la amistad. Pero, sobre todo, por hacerme sentir como en casa. Gracias por hacer parte de la familia que decidí conformar cuando me monté en esta vaca loca! Y en general a todos mis compañeros de laboratorio por permitirme compartir sonrisas y complicidad, además del bullying perfectamente dosificado. Gracias por las cervezas y las fiestas, pero, sobre todo, gracias por hacer mi rutina más agradable y divertida.

Gracias a Paco, por ser tan amable y servicial. Gracias a su maravilloso equipo de trabajo ellas han sido la parte más humana y especial de mi paso por este laboratorio.

En general quiero agradecer a todas las personas que de alguna u otra manera han compartido conmigo esta linda experiencia y me han enseñado a disfrutarla.

También me gustaría agradecer a la beca Santiago Grisolia (GRISOLIA/2017/170), al Ministerio de Ciencias e Innovación BIO2015-64531-R, RTI2018-099239-B-I00 y el ExpoSeed H2020-MSCA-RISE-2015-691109 por facilitar la realización de esta investigación.

A todos gracias por hacer parte de mi vida!!

Tabla de Contenido

Lista de Figuras.....	11
Resúmenes	15
Introducción	21
La evolución de las Angiospermas	23
La flor como estructura clave en la reproducción de las Angiospermas	24
Desarrollo de los estambres: el Androceo	24
Desarrollo del gineceo: Carpelos y Frutos.....	25
Genes asociados con el desarrollo de los órganos fértiles de las flores	27
Genes asociados a la dehiscencia de las anteras	28
Genética del desarrollo del gineceo.....	28
Red genética del desarrollo del fruto.....	31
Los genes bHLH en las Angiospermas	33
<i>Nicotiana benthamiana</i> como modelo	35
Objetivos	39
Materiales y Métodos	43
Material vegetal	45
Líneas transgénicas	45
Microorganismos.....	46
Cultivo de bacterias.....	46
Aislamiento de ácidos nucleicos	46
Extracción de plásmidos de DNA.....	46
Manipulación de ácidos nucleicos.....	47
Secuenciación.....	49
Caracterización Funcional	50
Análisis del DNA genómico editado e identificación de los alelos mutantes de <i>N. benthamiana</i>	52
Fijación e inclusión de muestras vegetales en parafinas	52
Hibridación <i>in situ</i> de RNA.....	52
Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	53
Coloración fluroglucinol-HCl	53
Coloración con azul de anilina para los tubos polínicos.....	53
Análisis evolutivo.....	54
Aislamiento de genes y análisis filogenético.....	54

Microsintenia	54
Resultados	57
Análisis filogenético de los genes <i>HEC1/2/3/IND</i>	59
Expresión de los genes <i>NibeHEC3a</i> y <i>NibeHEC3b</i> durante el desarrollo de <i>N. benthamiana</i> . 62	
Análisis mediante qRT PCR.....	62
Análisis por hibridación in situ.	64
Identificación de los mutantes: <i>Nibehec3-CRISPR/ Nibehec3-TRV</i>	69
Silenciamiento Genético Inducido por Virus (VIGS).....	69
Sistema CRISPR-Cas9 adaptado a la herramienta multiplexing de GoldenBraid	73
Identificación de los alelos mutantes de <i>N. benthamiana</i>	75
Caracterización Funcional del Ortólogo de <i>HEC3</i> en <i>Nicotiana benthamiana</i>	79
<i>NibeHEC3a</i> es necesario para el correcto desarrollo del gineceo de <i>N. benthamiana</i>	79
<i>NibeHEC3a</i> está asociado a la dehiscencia del fruto de <i>N. benthamiana</i>	82
<i>NibeHEC3a</i> desarrolla un papel importante en la dehiscencia de las anteras <i>N. benthamiana</i>	84
Entendiendo la evolución de los genes homeólogos <i>NibeHEC3a</i> y <i>NibeHEC3b</i>	85
Complementación Heteróloga del gen <i>NibeHEC3a</i> en el fondo mutante <i>ind</i>	89
Discusión	95
Evolución del linaje <i>HECATE/INDEHISCENT</i>	97
<i>NibeHEC3</i> tiene funciones conservadas en la diferenciación de los tejidos más apicales del gineceo.	99
<i>NibeHEC3</i> está implicado en la formación de la zona de dehiscencia de frutos y anteras... 102	
<i>HECATE/INDEHISCENT</i> un modelo para la evolución funcional de las Angiospermas.....	104
Conclusiones.....	109
Referencias	113
Anexos.....	127

Lista de Figuras

Fig. 1. Árbol filogenético resumido de la evolución de las Angiospermas.	23
Fig. 2. Representación básica de los órganos de una flor.	24
Fig. 3. Diagrama transversal de la morfología de una antera.	25
Fig. 4. Morfología de Frutos Secos Dehiscente y Frutos Carnosos.....	27
Fig. 5. Fenotipos de pérdida de función del gineceo en antesis de <i>Arabidopsis</i>	29
Fig. 6. Fenotipos de pérdida de función del gineceo en antesis de <i>Arabidopsis</i>	30
Fig. 7. Organización filogenética de las 26 subfamilias de proteínas bHLH en plantas.....	33
Fig. 8. Fases del desarrollo de <i>Nicotiana benthamiana</i>	37
Fig. 9. Árbol de máxima verosimilitud de los genes <i>HECATE/INDEHISCENT</i> en Solanaceae.	60
Fig. 10. Resumen del árbol de máxima verosimilitud de los genes <i>HECATE/INDEHISCENT</i>	61
Fig. 11. Análisis de los patrones de expresión de los ortólogos de los genes <i>HEC1/2/3</i> en <i>N. benthamiana</i>	63
Fig. 12. Alineamiento de secuencias de proteínas de AtHEC3/ AtIND de <i>Arabidopsis</i> y NibeHEC3a/ NibeHEC3b de <i>N. benthamiana</i>	65
Fig. 13. Análisis de expresión por hibridación <i>in situ</i> de los genes <i>NibeHEC3</i> en el meristemo vegetativo de <i>N. benthamiana</i>	65
Fig. 14. Análisis de expresión por hibridación <i>in situ</i> de los genes <i>NibeHEC3</i> en el desarrollo de <i>N. benthamiana</i>	66
Fig. 15. Expresión de los genes <i>NibeHEC3</i> en el gineceo de <i>N. benthamiana</i>	67
Fig. 16. Expresión de los genes <i>NibeHEC3</i> en el fruto <i>N. benthamiana</i>	67
Fig.17. Expresión de <i>NibeHEC3</i> en las anteras de <i>N. benthamiana</i>	68
Fig. 18. Control negativo del análisis de expresión por hibridación <i>in situ</i> de los genes <i>NibeHEC3</i>	69
Fig. 19. Fenotipo de las plantas <i>Nibehec3-VIGS</i> en las flores de <i>N. benthamiana</i>	71
Fig. 20. Identificación de las plantas <i>NibeHEC3-VIGS</i>	73
Fig. 21. Construcción final para la edición de las gRNA utilizado el sistema CRISPR-Cas9 adaptado a GoldenBraid (GB).	73
Fig. 22. Comparación fenotípica de las poblaciones <i>NibeHEC3a-CRISPR</i>	74

Fig.23. Identificación del mutante <i>NibeHEC3a</i> - CRISPR.	77
Fig. 24. Cambios en la secuencia de <i>NibeHEC3a</i> - CRISPR.	78
Fig. 25. Fenotipo de <i>Nibehec3a</i> -CRISPR en el gineceo de <i>N. benthamiana</i>	80
Fig. 26. Fenotipo de <i>Nibehec3a</i> -CRISPR en el estigma de <i>N. benthamiana</i>	80
Fig. 27. Fenotipo de las plantas <i>Nibehec3a</i> -CRISPR en el tracto de transmisión.	82
Fig. 28. Fenotipo <i>Nibehec3a</i> -CRISPR en frutos partenocárpicos de Nicotiana.....	83
Fig. 29. Fenotipo de <i>Nibehec3a</i> -CRISPR en anteras de <i>N. benthamiana</i>	84
Fig. 30. Fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM) del fenotipo de <i>Nibehec3a</i> - CRISPR en anteras de <i>N. benthamiana</i>	85
Fig. 31. Análisis de microsintenia para los genes <i>HEC3a</i> y <i>HE3b</i> en las especies alotetraploides de <i>N. benthamiana</i> (<i>Nibe</i>) y <i>N. tabacum</i> (<i>Nita</i>).	87
Fig. 32. Comparación de los niveles de expresión de <i>NibeHEC3a</i> y <i>NibeHEC3b</i> en flores en antesis de <i>N. benthamiana</i>	88
Fig. 33. Fenotipo de las plantas que sobreexpresan <i>NibeHEC3a/AtIND/AtHEC3</i> en el fondo mutante <i>ind-2</i>	91
Fig.34. Ejemplo de fenotipos de complementación.	92
Fig. 35. Expresión de los genes <i>HEC</i> en el gineceo de <i>Arabidopsis</i>	99



Resúmenes

Resumen

El éxito de la fertilización en las Angiospermas depende del adecuado y coordinado desarrollo de los diferentes tejidos del gineceo: ovario, estilo y estigma. Los mecanismos moleculares asociados a la correcta formación y desarrollo del gineceo han sido bien estudiados en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Diversos genes pertenecientes a múltiples familias de factores de transcripción han sido sugeridos como reguladores indispensables en la correcta formación del estilo y el estigma de las Angiospermas.

Entre ellas se encuentran la familia *basic Helix Loop Helix*, *bHLH*. Los genes *HECATE* (*HEC*) pertenecen al linaje de genes *HEC1/2/3/IND*. Análisis filogenéticos han revelado que las Angiospermas poseen, al menos, tres copias de genes *HEC* (*HEC1/2/3*), mientras que el gen *INDEHISCENT* (*IND*) es un parálogo específico de *HEC3* en Brassicaceae; las demás Angiospermas poseen homólogos preduplicación más similares a *HEC3* que a *IND*. Funcionalmente, en *Arabidopsis*, los genes *HEC1/2/3* son redundantes en la correcta formación de gineceo, mientras que *IND* tiene funciones en la diferenciación de la zona de dehiscencia del fruto.

Así, nos propusimos conocer las funciones de los genes *HEC*, previas a la diversificación de Brassicaceae. Particularmente estudiamos los ortólogos de los genes *HEC1/2/3* en *Nicotiana benthamiana*.

En nuestro estudio, los genes *NibeHEC1/2* solo se expresan en meristemos vegetativos y hojas, mientras que *NibeHEC3* se expresa predominantemente durante el desarrollo de la flor y aumenta su expresión progresivamente hasta la antesis en el tracto de transmisión del estilo, el estigma y las zonas de dehiscencia de anteras y frutos, de un modo similar al que lo hacen conjuntamente los genes *HEC1/2/3/IND* en *Arabidopsis*.

La caracterización funcional por VIGS y CRISPR-Cas9 nos confirmó que *NibeHEC3* está implicado en la elongación de la región estilar y la diferenciación de las papilas estigmáticas. Además, *NibeHEC3* es importante en el desarrollo de las anteras y los frutos de *Nicotiana benthamiana*.

En conjunto, los datos reportados más nuestra caracterización funcional sugieren que los genes *HEC3*, previos al evento de duplicación del linaje *HEC3/IND*, conservan las funciones ancestrales en el desarrollo de la región más distal del gineceo y la diferenciación de la zona de dehiscencia de frutos, mientras que en Brassicaceae, luego de la duplicación del linaje *HEC3/IND*, estas dos funciones parecen haberse subfuncionalizado durante la diversificación de la familia Brassicaceae entre los genes *HEC1/2/3* e *IND* respectivamente. Además, describimos una novedosa función para los genes *HEC3* asociada al desarrollo de las anteras en *Nicotiana benthamiana*, una función con la cual no se había asociado a los genes *HEC* con anterioridad.

Así, el dilucidar detalles adicionales acerca de las funciones de los genes *HEC* y sugerir como estos interactúan para la formación del gineceo en eudicotiledóneas fuera de Brassicaceae ayudará a proporcionar información sobre diversos aspectos en la evolución y desarrollo del gineceo y del fruto en Angiospermas.

Abstract

Successful fertilization in angiosperms depends on the proper and coordinated development of the different tissues of the gynoecium: ovary, style and stigma. The molecular mechanisms associated with the correct formation and development of the gynoecium have been well studied in the model species *Arabidopsis thaliana*. Several genes belonging to multiple families of transcription factors have been suggested as indispensable regulators in the correct formation of the style and stigma in angiosperms.

Among them are the *basic Helix Loop Helix* family, bHLH. The *HECATE (HEC)* genes belong to the *HEC1/2/3/IND* gene lineage. Phylogenetic analyses have revealed that angiosperms possess at least three copies of *HEC* genes: *HEC1/2/3*, whereas the *INDEHISCENT (IND)* gene is a specific *HEC3* paralog in Brassicaceae; the other angiosperms possess pre-duplication homologs more like to *HEC3* than to *IND*. Functionally, in *Arabidopsis*, *HEC1/2/3* genes are redundant in proper gynoecium formation while *IND* has functions in the differentiation of the fruit dehiscence zone.

Thus, we set out to understand the functions of *HEC* genes prior to diversification of Brassicaceae. In particular, we studied the orthologs of the *HEC1/2/3* genes in *Nicotiana benthamiana*.

In our study, *NibeHEC1/2* genes are only expressed in vegetative meristems and leaves; while *NibeHEC3* genes are predominantly expressed during flower development and increase their expression progressively until anthesis; they remain expressed in the style transmission tract, stigma and dehiscence zones of anthers and fruits. The same is true for the *HEC1/2/3/IND* genes in *Arabidopsis*.

Functional characterization by VIGS and CRISPR-Cas9 confirmed that *NibeHEC3* is involved in the elongation of the stylar region and differentiation of stigmatic papillae. In addition, *NibeHEC3* is important in anther development and the differentiation of the dehiscence zone of *Nicotiana* fruits.

Taken together, the reported data plus our functional characterization suggest that *HEC3* genes, prior to the *HEC3/IND* lineage duplication event, retain ancestral functions in the development of the most distal region of the gynoecium and the differentiation of the fruit dehiscence zone, whereas in Brassicaceae, after the duplication of the *HEC3/IND* lineage, these two functions appear to have been sub-functionalized during the diversification of the Brassicaceae family between the *HEC1/2/3* and *IND* genes, respectively. In addition, we describe a novel function for the *HEC3* genes associated with anther development in *Nicotiana benthamiana*, a function not previously reported for the *HEC* genes.

Thus, elucidating additional details about the functions of the *HEC* genes and suggesting how they interact for gynoecium formation in eudicots outside Brassicaceae will help to provide insights into various aspects of gynoecium and fruit evolution and development in angiosperms.

Resum

L'èxit de la fertilització en les angiospermes depén de l'adequat i coordinat desenvolupament dels diferents teixits del gineceu: ovari, estil i estigma. Els mecanismes moleculars associats a la correcta formació i desenvolupament del gineceu han sigut ben estudiats en l'espècie model *Arabidopsis thaliana*. Diversos gens pertanyents a múltiples famílies de factors de transcripció han sigut suggerits com a reguladors indispensables en la correcta formació de l'estil i l'estigma de les angiospermes.

Entre elles es troben la família *basic Helix Loop Helix*, *bHLH*. Els gens *HECATE* (*HEC*) pertanyen al llinatge de gens *HEC1/2/3/IND*. Anàlisis filogenètiques han revelat que les angiospermes posseeixen, almenys, tres còpies de gens *HEC* (*HEC1/2/3*), mentre que el gen *INDEHISCENT* (*IND*) és un paràleg específic d'*HEC3* en Brassicaceae; les altres angiospermes posseeixen homòlegs preduplicació més similar a *HEC3* que a *IND*. Funcionalment, en *Arabidopsis*, els gens *HEC1/2/3* són redundants en la correcta formació de gineceu, mentre que *IND* té funcions en la diferenciació de la zona de dehiscència del fruit.

Així, ens vam proposar conèixer les funcions dels gens *HEC*, previs a la diversificació de Brassicaceae. Particularment estudiem els ortòlegs dels gens *HEC1/2/3* en *Nicotiana benthamiana*.

En el nostre estudi, els gens *NibeHEC1/2* només s'expressen en meristemes vegetatius i fulles; mentre que *NibeHEC3* s'expressen predominantment durant el desenvolupament de la flor i augmenten la seua expressió progressivament fins a l'antesi; aquests es mantenen expressats en el tracte de transmissió de l'estil, l'estigma i les zones de dehiscència d'anteres i fruits. Igual que ho fan conjuntament els gens *HEC1/2/3/IND* en *Arabidopsis*.

La caracterització funcional per VIGS i CRISPR-Cas9 ens va confirmar que *NibeHEC3* està implicat en l'elongació de la regió estilar i la diferenciació de les papil·les estigmàtiques. A més, *NibeHEC3* és important en la diferenciació de les anteres y la zona de dehiscència de fruits de *Nicotiana*. Així mateix, les variacions detectades entre les seqüències dels ortòlegs del clade *HEC3/IND* podria explicar els canvis funcionals i els patrons d'expressió diferencials entre les espècies d'angiospermes.

En conjunt, les dades reportades més la nostra caracterització funcional suggereixen que els gens *HEC3*, previs a la duplicació del llinatge *HEC3/IND*, conserven les funcions ancestrals en el desenvolupament de la regió més distal del gineceu i la diferenciació de la zona de dehiscència de fruits, mentre que en Brassicaceae, després de la duplicació del llinatge *HEC3/IND*, aquestes dues funcions semblen haver-se subfuncionalitzat durant la diversificació de la família Brassicaceae entre els gens *HEC1/2/3* i *IND* respectivament. A més, descrivim una nova funció per als gens *HEC3* associada a la diferenciació de les anteres en *Nicotiana benthamiana*, una funció amb la qual no s'havia associat als gens *HEC* amb anterioritat.

Així, el dilucidar detalls addicionals sobre les funcions dels gens els *HEC* i suggerir com aquests interactuen per a la formació del gineceu en eudicotiledònies fora de Brassicaceae ajudarà a proporcionar informació sobre diversos aspectes en l'evolució i desenvolupament del gineceu i del fruit en angiospermes.



Introducción

La evolución de las Angiospermas

Las Angiospermas, o plantas con flores, son con diferencia el grupo de plantas más diverso y exitoso de los sistemas terrestres contemporáneos (Soltis & Soltis, 2021). Las Angiospermas se consideran un grupo monofilético (es decir, que deriva de un ancestro común) que parece haber surgido en el Cretácico hace 140 millones de años (Sanderson & Doyle, 2001; Soltis & Soltis, 2021). Diversos estudios filogenéticos de las Angiospermas definen cinco grandes taxones: Las especies de divergencia temprana, que comprenden Amborellaceae, Nymphaeales y Austrobaileyales (grado ANA), las Monocotyledoneae, las Magnoliaceae y Chloranthaceae, y el resto de las plantas con flor, las Eudicotyledoneae, que se divide en especies de divergencia temprana (Eudicotyledoneae Basales) y tardía (Eudicotyledoneae Centrales). Estas últimas se agrupan en los clados Rosidae y Asteridae (Soltis & Soltis, 2021). Durante la diversificación de las Angiospermas se han identificado varios eventos de duplicación de genoma completos, distribuidos en puntos concretos de la filogenia de las Angiospermas. El primero, identificado previo a la diversificación de las plantas con flor (ϵ); dos eventos en monocotiledóneas (ρ , σ), uno antes de la diversificación de las eudicotiledóneas (γ), y dos específicos de Brassicaceae (α , β) (Fig.1; Jiao et al., 2011; Pabón-Mora & González, 2016; Soltis & Soltis, 2021;). Estos eventos de duplicación han marcado numerosos desafíos para los estudios de identificación de ortólogos y las caracterizaciones correspondientes.

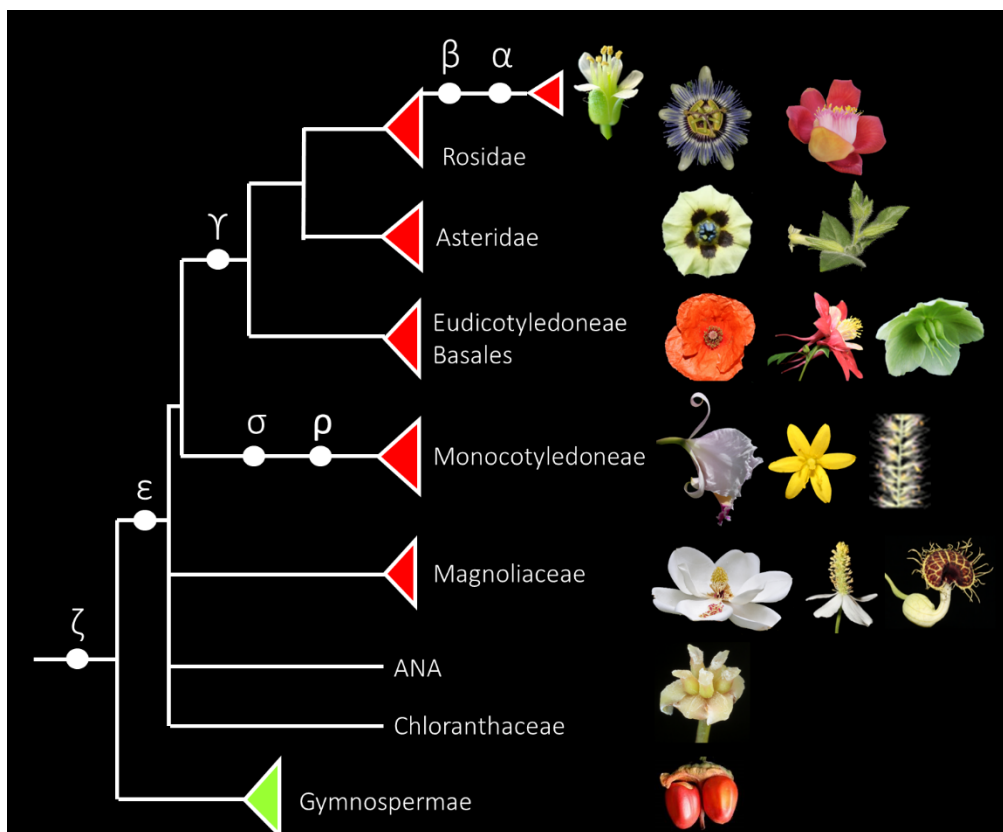


Fig. 1. Árbol filogenético resumido de la evolución de las Angiospermas. Muestra los cinco grupos principales de plantas: ANA, Monocotyledoneae, Magnoliaceae, Chloranthaceae y Eudicotyledoneae que se divide en Eudicotyledoneae Basales y Centrales, estas últimas incluye Rosidae y Asteridae. Los ejemplos de variación floral se muestran frente a cada clado. Los círculos marcan los eventos de duplicación de genoma completo reportado. Las fotografías pertenecen a los miembros del Grupo Evo-Devo en Plantas de la Universidad de Antioquia.

La flor como estructura clave en la reproducción de las Angiospermas

El desarrollo de las flores, estructuras complejas como estrategias para garantizar la reproducción, ha permitido la colonización de los más diversos entornos por las Angiospermas. La flor es, sin duda, el rasgo característico de las Angiospermas, el cual parece haber evolucionado con el fin de facilitar una polinización más eficiente e intraespecífica y una fertilización facilitada, que permite proteger el desarrollo de las semillas y promueve su dispersión. Estas estrategias están mediadas por los órganos reproductivos de las flores y sus cambios morfológicos y diversificación como mecanismos adaptativos pueden explicar el éxito reproductivo de las Angiospermas.

Las flores consisten en una sucesión de hojas extremadamente modificadas a lo largo de un eje sin entrenudos ni meristemas axilares (Pabón-Mora & González, 2016). Las hojas modificadas se consideran como órganos individuales y se agrupan en series que pueden posicionarse en espiral o en verticilos, ocupando normalmente una posición fija en la flor. Los órganos más externos son estériles y conforman el cáliz, formado por sépalos, y la corola, por pétalos, mientras que los órganos fértiles forman el androceo, compuesto por estambres, y el gineceo, compuesto por los pistilos, a su vez formado por carpelos, en el centro de la flor (**Fig.2**). Los estambres y los pistilos son órganos tridimensionales con cavidades internas donde tiene lugar la esporogénesis de los granos de polen y los óvulos, respectivamente (Pabón-Mora & González, 2016).

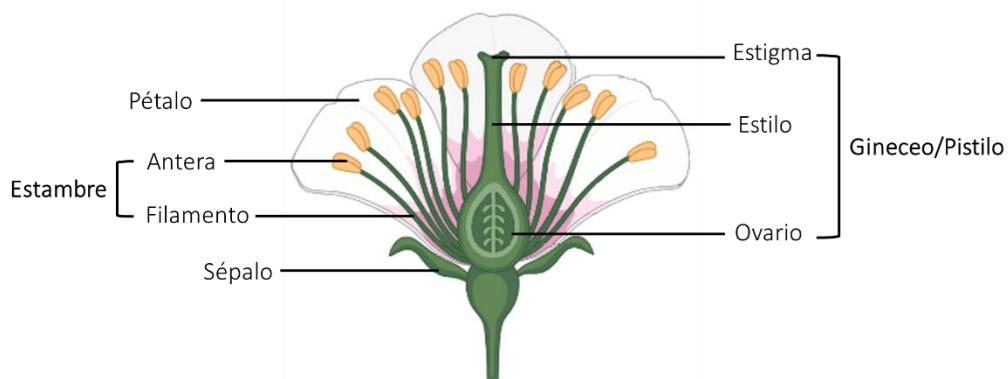


Fig.2. Representación básica de los órganos de una flor. Puede distinguirse cada uno de los órganos florales: sépalos y pétalos, estambres y pistilo. Imagen modificada de BioRender: "Autogamy Pollination"

Desarrollo de los estambres: el Androceo

El desarrollo y la liberación de polen en el momento y posición óptimos es fundamental para la reproducción de las plantas con flor. El polen se forma dentro de los estambres de la flor (**Fig. 2**). Éstos comprenden un filamento estéril y la antera. El filamento contiene los haces vasculares y se extiende durante el desarrollo para promover un posicionamiento óptimo de la antera, facilitando que el polen llegue al estigma. En la región distal del filamento se forma la antera, una estructura fértil y segmentada en tecas que contiene el polen (**Fig.2**; Sanders et al., 1999). Dentro de cada teca, las células esporogénicas, que dan lugar al polen, se dividen por

meiosis para producir microsporas, que, al madurar, forman los granos de polen. Alrededor de las células esporogénicas se diferencian anillos concéntricos de otros tipos celulares que forman la pared de saco polínico: la epidermis, el endotecio, la capa media y el tapetum (Scutt et al., 2006). Estos están asociados con el desarrollo y la liberación del polen y en conjunto forman el microesporangio (**Fig.3**; Sanders et al., 1999; Scutt et al., 2006; Wilson et al., 2011).

En la dehiscencia de la antera intervienen dos tipos de células especializadas: el endotecio que separa los dos lóbulos de la antera o teca, y se degrada para que estos formen un solo lóculo durante la maduración de la antera; y el estomio que son células epidérmicas modificadas para facilitar la dehiscencia de la antera (**Fig.3**; Wilson et al., 2011). Este proceso implica la expansión y posterior engrosamiento de las células endoteliales, lo cual, junto con la deshidratación de la antera y el ensanchamiento de los granos de polen, resulta en la ruptura del estomio, es decir la dehiscencia de la antera (**Fig.3**; Sanders et al., 1999; Feng & Dickinson, 2007; Wilson et al., 2011).

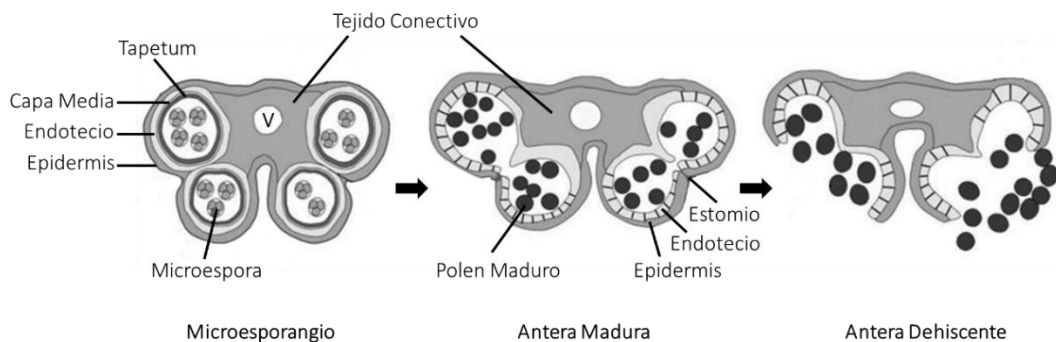


Fig.3. Diagrama transversal de la morfología de una antera. Se ubican las capas celulares que conforman el microesporangio y se muestra la transformación de estos tejidos a lo largo del desarrollo. V, haz vascular. Figura modificada de Scott et al., 2004.

Desarrollo del gineceo: Carpelos y Frutos

El gineceo es una innovación evolutiva clave de las plantas con flor y, de hecho, es el órgano que da nombre al clado (Angiosperma, *del* griego angei(o) 'vaso', 'conducto' + *sperm(at)* 'semilla', 'semen': *semillas dentro de un ovario*). La morfología única de este órgano ha facilitado la evolución de mecanismos complejos para garantizar la polinización.

El gineceo consta de una o más estructuras unitarias portadoras de óvulos, llamadas pistilos (Gasser & Robinson-Beers, 1993). Éstos pueden diferenciarse en dos tipos, apocárpicos o sincárpicos, según si los carpelos forman varios pistilos independientes o si constan de un único pistilo formado por carpelos fusionados (Gasser & Robinson-Beers, 1993).

Aunque la morfología general del gineceo es variable, éste ocupa la posición central en la flor y los pistilos comparten un plan estructural común a todas las Angiospermas (Gasser & Robinson-Beers, 1993). En la porción más distal de los pistilos se diferencia el *estigma*, el cual se encarga de la recepción del polen y permite su germinación (**Fig.2**). Éste desempeña un papel fundamental en la polinización de las flores, ya que, además en el estigma ocurre la discriminación de granos

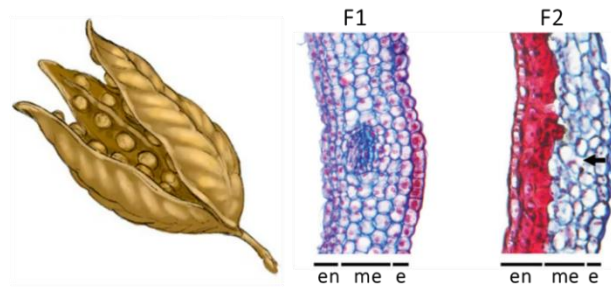
de polen no compatibles, facilitando la variabilidad genética al ser también el punto donde operan los mecanismos de autocompatibilidad (Scutt et al., 2006). En la porción medial del pistilo se encuentra el *estilo*, una estructura tubular de donde se diferencia el tracto de transmisión internamente (**Fig.2**). Después de la polinización, los granos de polen atraviesan el estilo a través del tracto de transmisión, que facilita la migración del polen hacia el ovario, donde ocurre la fertilización. El ovario, está ubicado en la parte basal del pistilo protegiendo los óvulos (Scutt et al., 2006; Pabón-Mora & González, 2016).

Los óvulos son los precursores de las semillas. Están formados por un núcleo central que contiene el saco embrionario, uno o dos tegumentos que encierran este núcleo y un pedúnculo de soporte, denominado funículo. Tras la fecundación el óvulo se convierte en semilla, a partir de la cual se forma el embrión; el endospermo se forma a partir del saco embrionario y los tegumentos se diferencian en la cubierta de la semilla (Gasser & Robinson-Beers, 1993).

Los frutos son el resultado de cambios morfo-anatómicos extremos en las paredes del pistilo producto de la fertilización del ovario. Sus diversas formas y la complejidad de sus tejidos son un claro ejemplo de transformación ontogenética y de la evolución de estrategias para la dispersión de las semillas (Esau, 1967). La clasificación de los frutos tiene en cuenta diversas características como el número de pistilos y la fusión entre ellos, la textura y la dehiscencia (Roth, 1977).

En el fruto pueden distinguirse tres capas: el exocarpo, la capa más externa; el mesocarpo, formado por múltiples capas intermedias y el tejido vascular; y el endocarpo, que consta de pocas capas internas en contacto con las semillas en desarrollo, a menudo internas al haz vascular (**Fig.4**; Roth, 1977; Pabón-Mora y Litt, 2011; Pabón-Mora & González, 2016). Según la composición y consistencia de estos tejidos los frutos pueden ser secos (dehiscentes/ cápsulas, o indehiscentes), carnosos o drupas (**Fig. 4**). Los frutos secos dehiscentes tienen división celular periclinal limitada y se caracterizan por diferenciar dos tipos de tejidos para garantizar la apertura y posterior liberación de las semillas, llamado zona de dehiscencia: un tejido parenquimático (tejido blando) y el esclerénquima (tejido duro). La diferenciación contigua de ambos tipos de tejidos genera tensión y permite la dehiscencia de estos frutos (**Fig. 4A**). Los frutos carnosos tienen división celular continua tanto periclinal como anticlinal, y poco o ningún tejido duro que acumulan agua y azúcares en el pericarpo, lo que los hace comestibles en su mayoría (**Fig. 4B**). Las drupas son ricas en tejidos duros en las capas más internas que se depositan continuamente sin permitir la apertura, mientras que, en las capas más externas, las drupas también almacenan agua y nutrientes (Roth, 1977; Pabón-Mora y Litt, 2011; Pabón-Mora & González, 2016).

A. Fruto Seco - Dehiscente



B. Fruto Carnoso

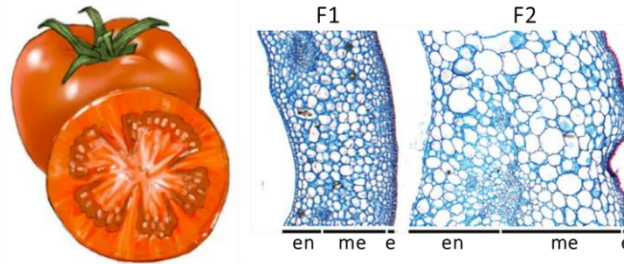


Fig.4. Morfología de Frutos Secos Dehiscente y Frutos Carnosos. Representación esquemática del fruto (a la izquierda). Cortes transversales del fruto seco dehiscente de *Nicotiana obtusifolia* y fruto carnoso de *Solanum lycopersicum* (a la derecha) donde se diferencian las tres capas del fruto: **en**, endocarpo; **me**, mesocarpo; **e**, exocarpo. (**F1**) hace referencia a estadios temprano en el desarrollo, fruto inmaduro y (**F2**) es en etapas tardías durante la maduración del fruto. Nótese que en el fruto seco los estadios en el desarrollo se diferencian por la acumulación de lignina en el endocarpo, mientras que en el fruto carnoso se diferencia una mayor expansión celular. Figura Adaptada y modificada de Ortiz- Ramirez et al.,2018

Genes asociados con el desarrollo de los órganos fértiles de las flores

La base genética de la identidad de los órganos florales fue caracterizada a partir de mutantes homeóticos en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*. El modelo resultante ilustra cómo los patrones de expresión de los factores de transcripción MADS- box se solapan en el meristemo floral permitiendo la formación de complejos proteicos tetraméricos a modo combinatorial que definen la identidad de cada verticilo floral (Schwarz-Sommer et al., 1990; Coen & Meyerowitz, 1991).

Según este modelo existen cuatro tipos de funciones, A, B, C y E, directamente asociadas con la identidad de cada uno de los órganos florales: los genes Clase A: *APETALA 1* y *APETALA 2* el único que no pertenece a la familia MADS; *AP1/AP2*; Clase B: *APETALA 3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)*; Clase C: *AGAMOUS (AG)*; Clase E: *SEPALLATA (SEP1, SEP2, SEP3 y SEP4)*. Los factores de clase A y E definen la identidad del meristemo floral y promueve la diferenciación de los sépalos. Los factores clase A, B y E controlan la identidad de los pétalos, los factores de clase B, C y E especifican la identidad de los estambres y los factores de clase C y E especifican la identidad de los carpelos (Bowman et al., 1989, 1991; Yanofsky et al., 1990; Chanderbali et al., 2010; Pelaz et al., 2001; Theissen & Saedler, 2001).

Una vez establecida la identidad de los órganos flores, otras rutas genéticas intervienen para la diferenciación de los tejidos especializados de cada órgano. Específicamente nos centraremos en

los genes asociados con el desarrollo de las anteras y el gineceo, además de los genes asociados con la diferenciación de tejidos en los frutos.

Genes asociados a la dehiscencia de las anteras

Las etapas finales del desarrollo de la antera implican la liberación del polen. Por ello, la sincronización entre la maduración de los granos de polen y el desarrollo de los tejidos de la pared de la antera son importantes para la dehiscencia (Wilson et al, 2011). Las investigaciones sobre la dehiscencia de las anteras parecen indicar que este proceso está conservado entre algunas especies como *Arabidopsis*, *Lilium*, arroz y algunos miembros de las Solanaceae como el tabaco, el tomate y la berenjena (Wilson et al., 2011).

La dehiscencia se inicia con el engrosamiento de las células del endotecio, donde parece estar regulada por los genes *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1 (NST1)* y *NST2* en *Arabidopsis*. El mutante doble *nts1 nts2* tiene anteras indehiscentes debido a la pérdida del engrosamiento de la pared secundaria del endotecio (Mitsuda et al., 2005). En este proceso también son importantes los genes asociados con la desnaturalización de las pectinas, en particular las poligalacturonasas (PGs), como los *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE 1 (ADPG1)*, *ADPG2* y *QUARTET2 (QRT2)* (Ogawa et al., 2009).

Por otra parte, se ha mostrado que las hormonas juegan un papel preponderante en la diferenciación de tejidos y la dehiscencia de las anteras (Wilson, 2011). En *Arabidopsis*, las auxinas controlan el momento de la dehiscencia al regular negativamente dos eventos clave: la lignificación del endotecio mediada por el factor de transcripción *MYB26*, y la apertura del estomio a través del control de la biosíntesis de ácido jasmónico (JA), posiblemente al prevenir la lignificación prematura del endotecio (Cecchetti et al., 2013). Además, el análisis de factores de respuesta a auxinas ha revelado que los mutantes *arf6* y *arf8* tienen anteras indehiscentes y una menor producción de jasmónico en las botones florales durante el desarrollo (Nagpal et al., 2005). Igualmente, el gen *ARF5/MONOPTEROS* desempeña una función reguladora dependiente de auxinas frente al JA, ya que el mutante *mp^{abn}* muestra anteras indehiscentes que se abren al tratarlas con JA (Garrett et al., 2012).

Genética del desarrollo del gineceo

La correcta formación de los tejidos apicales del gineceo es fundamental para la polinización y posterior fecundación de los óvulos. En *Arabidopsis*, dos subfamilias de factores de transcripción son esenciales para la formación de los tejidos apicales del gineceo. Por un lado, los genes *NGATHA (NGA)*, cuatro miembros relacionados de la familia de factores de transcripción con dominio B3, que actúan redundantemente en la formación del estilo y el estigma, ya que los mutantes simples *nga* no tienen defectos visibles en la parte apical del gineceo, mientras que las combinaciones de mutantes dobles, triples y el cuádruple *nga* exhiben fenotipos cada vez más severos en el desarrollo del estilo y el estigma (**Fig, 5B**; Álvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009).

El mutante *nga1 nga2 nga3 nga4* carece completamente de estilo y estigma, formando protuberancias cilíndricas indiferenciadas (**Fig. 5B**; Álvarez et al. 2009; Trigueros et al. 2009).

Por otro lado, los genes *SHORT INTERNODES/STYLISH (SHI/STY)* codifican factores de transcripción de tipo dedo de zinc RING; la pérdida de función simultánea de los miembros de esta familia resulta en defectos severos durante el desarrollo del estilo y el estigma a medida que acumulan mutaciones. De esta manera los mutantes múltiples tiene problemas de fusión del gineceo en su parte apical, una reducción pronunciada del tejido estigmático y estilar, hasta desaparecer en las combinaciones de mayor orden, y un septum que no se desarrolla completamente (**Fig.5C**) (Kuusk et al., 2002; 2006). Estas similitudes fenotípicas entre los mutantes en los genes *NGA* y *SHI/STY* indican que ambos promueven la correcta formación del estilo y el estigma durante el desarrollo del gineceo, por lo que se ha sugerido que estos factores de transcripción son esenciales para la formación de la región más distal del gineceo de *Arabidopsis* (**Fig.5C**; Trigueros et al., 2009).

La caracterización funcional de los ortólogos de *NGA* y *STY* en *Escholchzia californica* y *Nicotiana benthamiana* indica que las funciones de estos factores de transcripción están conservadas en el desarrollo apical del gineceo al menos en eudicotiledóneas (Fourquin & Ferrandiz, 2014; Gomáriz-Fernández et al., 2017).

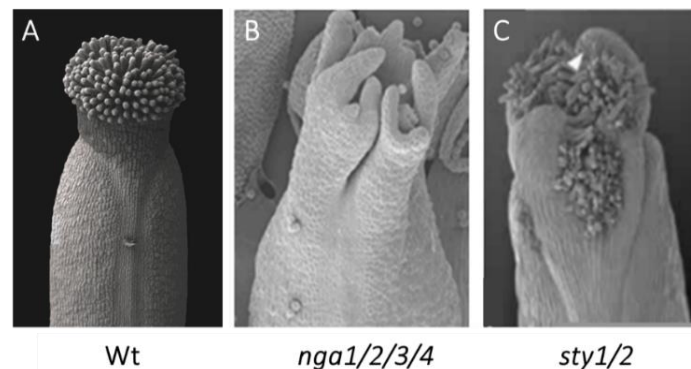


Fig.5. Fenotipos de pérdida de función del gineceo en antesis de Arabidopsis. A. Silvestre **B.** Cuádruple mutante *nga1 nga2 nga3 nga4*, Trigueros et al.,2009. **C.** Doble mutante *sty1 sty2*, Kuusk et al 2002.

Otro gen importante en la formación del gineceo es *CRABS CLAW (CRC)*, que codifica un factor de transcripción de tipo YABBY. *CRC* tiene una función clave reprimiendo el crecimiento radial del gineceo en desarrollo y promueve su crecimiento longitudinal. El mutante *crc* de *Arabidopsis* tiene un gineceo más corto y ancho que el silvestre, con defectos de fusión en la parte apical, donde el tejido más afectado es el estilo (Bowman & Smyth, 1999). Además, los factores de transcripción MADS-box, *SHATTERPROOF1 (SHP1)* y *SHP2*, son claves para el establecimiento de la identidad del margen del carpelo y también están implicados, aunque de un modo menos relevante, en la diferenciación del estigma (Favaro et al., 2003; Liljegren et al., 2000).

En paralelo, otros miembros de la familia de factores de transcripción bHLH (basic Helix Loop Helix), *SPATULA (SPT)*, *ALCATRAZ (ALC)*, *HECATE1/2/3 (HEC)* e *INDEHISCENT (IND)*, también han sido asociados al desarrollo apical del gineceo.

En *Arabidopsis*, *SPT* se expresa durante el desarrollo de los márgenes de carpelos, hojas y pétalos, así como la zona de dehiscencia de frutos y anteras (Groszmann et al., 2010). En particular, el gen *SPT* es importante para el desarrollo de la porción más distal del gineceo. El mutante *spt*, presenta un estigma reducido, un estilo parcialmente no fusionado y defectos en el desarrollo de los tejidos transmisores (**Fig.6D**; Heisler et al., 2001; Groszmann et al., 2008; 2010).

Por su parte, *ALC* se expresa en las márgenes de los pétalos, en estambres, en estigmas y, posteriormente, en el fruto, en la zona de dehiscencia de la silicua (Rajani & Sundaresan, 2001; Groszmann et al., 2011). El mutante *alc* no tiene fenotipos evidentes durante la formación del gineceo, pero sí en la diferenciación de la zona de la dehiscencia del fruto (Rajani & Sundaresan, 2001), como se mencionará más adelante.

Las proteínas *SPT* y *ALC* pueden formar heterodímeros y tienen funciones redundantes en el desarrollo del gineceo (Groszmann et al., 2011). Más específicamente, son factores clave durante el desarrollo del margen del carpelo y las valvas en el fruto, como lo demuestra el doble mutante *spt alc*, que exhibe defectos de fusión carpelo en la región más distal del pistilo, así como defectos en el estilo, el estigma y la histogénesis de la margen de la valva y la zona de dehiscencia (Groszmann et al., 2011).

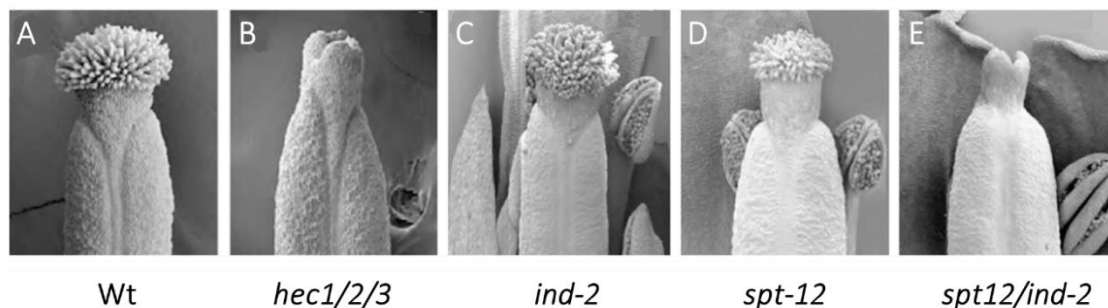


Fig. 6. Fenotipos de pérdida de función del gineceo en antesis de *Arabidopsis*. A. Silvestre. B. Mutante triple *hec1 hec2 hec3*, Schuster et al., 2015. C. Mutante simple *ind-2*, Girin et al., 2011. D. Mutante simple *spt-12*, Girin et al., 2011. E. Doble mutante *spt-12 ind-2*, Girin et al., 2011.

Los genes *HEC1/2/3/IND*, sobre los cuales se enfoca este trabajo, se han asociado con el desarrollo del tracto de transmisión y el estigma en el gineceo de *Arabidopsis* (Heim et al., 2003; Liljegren et al., 2004; Gremski et al., 2007; Pires & Dolan, 2010b). *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* se expresan en el septo en desarrollo, el tracto de transmisión, los óvulos y el estigma, siendo *HEC3* el que se expresa a niveles más elevados y durante más tiempo durante el desarrollo del gineceo (Gremski et al., 2007). Se ha mostrado que los genes *HEC* actúan redundantemente en el desarrollo del estigma, dado que solo el mutante triple tiene defectos severos en la formación del gineceo. Los mutantes *hec1 hec2 hec3* carecen por completo de tejido estigmático y tracto de transmisión, acompañado de infertilidad completa (**Fig.6B**). Estos fenotipos se ven agravados cuando *SPT*

también esta mutado (Gremski et al., 2007; Schuster et al., 2015), con defectos también en la fusión del estilo. Al igual que *SPT*, los genes *HEC* están estrechamente integrados en la red de señalización de auxinas, regulando biosíntesis, transporte y respuesta transcripcional, y también la señalización por citoquininas (Schuster et al., 2015). Dicha regulación parece afectar las respuestas a auxinas y también a citoquininas durante el desarrollo del tejido reproductivo (Gremski et al., 2007; Schuster et al., 2015).

Por su parte, *IND*, aunque más estudiado en relación con sus funciones en la dehiscencia del fruto (Liljegren et al., 2004) también participa en la formación del estigma. Así, el mutante doble *spt ind*, tiene un fenotipo muy similar al del triple mutante *hec1 hec2 hec3* de *Arabidopsis* (Fig.6B, E; Girin et al., 2011). También se ha demostrado que *IND* regula directamente la expresión de *SPT* en el gineceo y que ambos genes actúan sinérgicamente en la diferenciación del margen del carpelo al unirse cooperativamente a genes diana comunes que se requieren para la regulación dinámica de las auxinas durante el desarrollo del pistilo (Girin et al. 2011).

Estas similitudes funcionales y fenotípicas entre *NGA*, *STY*, *SPT*, *HEC* e *IND* sugieren que todos ellos forman parte de una red regulatoria que dirige la formación de los tejidos apicales del gineceo. Recientemente se ha propuesto que el desarrollo del estigma está regulado por un complejo transcripcional que incluye necesariamente a los factores *HEC/IND* y *NGA*. Así, las proteínas *NGA* y *HEC* son capaces de formar un heterodímero que primero activa a *IND* y luego, una vez éste está presente, induce la transcripción de *SPT*, posibilitando la formación de un complejo multimérico *NGA/HEC/IND/SPT* (Ballester et al, 2021). La incorporación secuencial de los diferentes factores bHLH a este complejo multimérico es necesaria para su función, y resulta finalmente en la expresión de genes que actúan posteriormente, algunos de los cuales controlan la acumulación de auxinas en la zona apical del gineceo, necesaria para el correcto desarrollo del estigma (Girin et al, 2011; Martínez-Fernández et al, 2014). Sin embargo, se sabe relativamente poco de la conservación funcional de estos genes en otras especies de Angiospermas.

Red genética del desarrollo del fruto

Se desconoce en gran medida la base molecular de la diversidad morfológica y funcional de los frutos. Sin embargo, la red de regulación genética que dirige la formación del ovario y sus dominios está relativamente bien caracterizada en *Arabidopsis* y ha servido de referencia para estudios comparativos en cultivos frutales.

Arabidopsis posee un fruto seco dehiscente llamando silicua. Las paredes del carpelo forman las valvas, en posición lateral, durante el desarrollo del fruto, mientras que en la zona media se diferencia el replum, que es la parte externa del septum, la pared que divide el ovario. El replum y las valvas están unidos por la margen de las valvas, que diferencia la zona de dehiscencia y que a su vez se compone de una capa de separación más próxima al replum y un tejido lignificado más próximo a las valvas. Durante el desarrollo, el endocarpo del fruto se lignifica y la capa de separación se desintegra para permitir la dehiscencia (Ferrándiz, 2002; Avino et al., 2012).

El factor de transcripción MADS-box *FRUITFULL* (*FUL*) se asocia con el correcto desarrollo de las valvas, mientras que la identidad del replum está controlada por el factor de transcripción con

homeodominio REPLUMLESS (RPL) (Gu et al., 1998; Roeder et al., 2003; Ferrándiz & Fourquin, 2014). *FUL* y *RPL* actúan como represores de los genes MADS-box *SHATTERPROOF* (*SHP1* y *SHP2*), confinando su expresión en el margen de las valvas. A su vez, los factores *SHP1/2* son responsables de la activación, aguas abajo, de los genes bHLH *IND*, esencial para la diferenciación de la zona de dehiscencia, tanto de la capa de separación como de la capa lignificada (Liljegren et al., 2004), y *ALC*, con funciones específicas en la formación de la capa de separación (Liljegren et al., 2000, 2004; Rajani & Sundaresan, 2001; Kay et al., 2013; Girin et al., 2010, 2011). La tensión generada entre el endocarpo lignificado y estas dos capas celulares en la zona de dehiscencia durante la maduración del fruto provoca su dehiscencia a lo largo de la margen de las valvas, dejando el replum intacto, y las semillas adheridas a él. Por último, modulando la regulación de toda la red se encuentra el gen *APETALA2* que ha sido identificado como un represor de *RPL* y *SHP* (Ripoll et al., 2011).

Todos los genes que componen la red pertenecen a distintas familias de factores de transcripción, las cuales se han duplicado en diferentes momentos durante la diversificación de las Angiospermas. Esto implica que cada grupo de plantas tiene diferentes complementos génicos de estos factores de transcripción.

La mayoría de estos genes identificados en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* también se han estudiado en tomate, que posee un fruto carnoso. En la red reguladora, *SIAP2*, el ortólogo de *AP2* en tomate, es conocido por ser un represor de la maduración, ya que los frutos mutantes *Slap2* muestran una maduración prematura en comparación con los frutos silvestres (Chung et al., 2010). En el segundo nivel de regulación genética, el tomate tiene dos ortólogos de *FUL*, *SIFUL1* (también llamado *TDR4*) y *SIFUL2* (también llamado *MBP7*) que también se asocian con la maduración durante el desarrollo del fruto (Bemer et al. et al., 2012; 2017). La regulación en la maduración de los frutos de tomate se completa con las interacciones entre *SIFUL1/2* con *RIPENING INHIBITOR* (*RIN*, el ortólogo de *SEP4*) y las dianas de *RIN* (Leseberg et al., 2008; Martel et al., 2011). *RIN* se expresa exclusivamente en frutos y se sabe que controla parcialmente la maduración en los frutos climatéricos, como es el tomate (Vrebalov et al., 2002; Ito et al., 2017). Los cambios en la expresión de *SIAP2* en mutantes *Sf1/2* sugieren que durante el desarrollo temprano del fruto *SIFUL1* y *SIFUL2* actúan reprimiendo a *SIAP2*, ya que los niveles de *SIAP2* aumentan en los mutantes *Sf1/2* (Bemer et al., 2012; Fujisawa et al., 2014). Además, los mutantes dobles *Sf1/2* y el mutante *tag1* (ortólogo de *SHP*), también muestran defectos de maduración, así como una reducción en el número de capas del pericarpio, al menos en el cultivar 'Alisa Craig' (Itkin et al., 2009; Pan et al., 2010).

Los ortólogos de *FUL* y *SHP* también se han caracterizado en los frutos secos dehiscentes de *Nicotiana*. La sobreexpresión de *NtFUL* en *Nicotiana glauca* o el silenciamiento de *NbSHP* en *Nicotiana glauca* resultan en frutos indehiscentes que carecen de una zona de dehiscencia funcional (Smykal et al., 2007; Fourquin & Ferrándiz, 2012). Estos datos sugieren que la regulación mediada por *FUL-SHP* se conserva en Solanaceae (Smykal et al., 2007; Fourquin & Ferrándiz, 2012; Garceau et al., 2017).

Los genes bHLH en las Angiospermas

Las proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH) son una superfamilia de factores de transcripción que han sido bien caracterizados en eucariotas no vegetales, especialmente en mamíferos, en los que se han realizado considerables análisis estructurales, funcionales y filogenéticos (Toledo-Ortiz et al., 2003; Pires & Dolan, 2010b). El dominio bHLH contiene aproximadamente 60 aminoácidos, con dos regiones funcionalmente distintas, la región básica y la región HLH (Li et al., 2006). La región básica está ubicada en el extremo N' del dominio bHLH y funciona como un motivo de unión al DNA. Consta de aproximadamente 15 aminoácidos, que típicamente incluyen seis residuos básicos (Atchley et al., 1999). La región HLH contiene dos hélices α anfipáticas con un bucle de enlace de longitudes variables. Las hélices α de proteínas bHLH pueden interactuar, lo que permite la formación de homodímeros o heterodímeros (Atchley et al., 1999; Robinson et al., 2000). Se ha demostrado que algunas proteínas bHLH se unen a secuencias que contienen un elemento central de consenso llamado caja E (5'-CANNTG-3'), siendo la caja G (5'-CACGTG-3') la forma más común. Además, los nucleótidos que flanquean el elemento central también pueden desempeñar un papel en la especificidad de la unión (Atchley et al., 1999; Massari & Murre, 2000; Robinson et al., 2000).

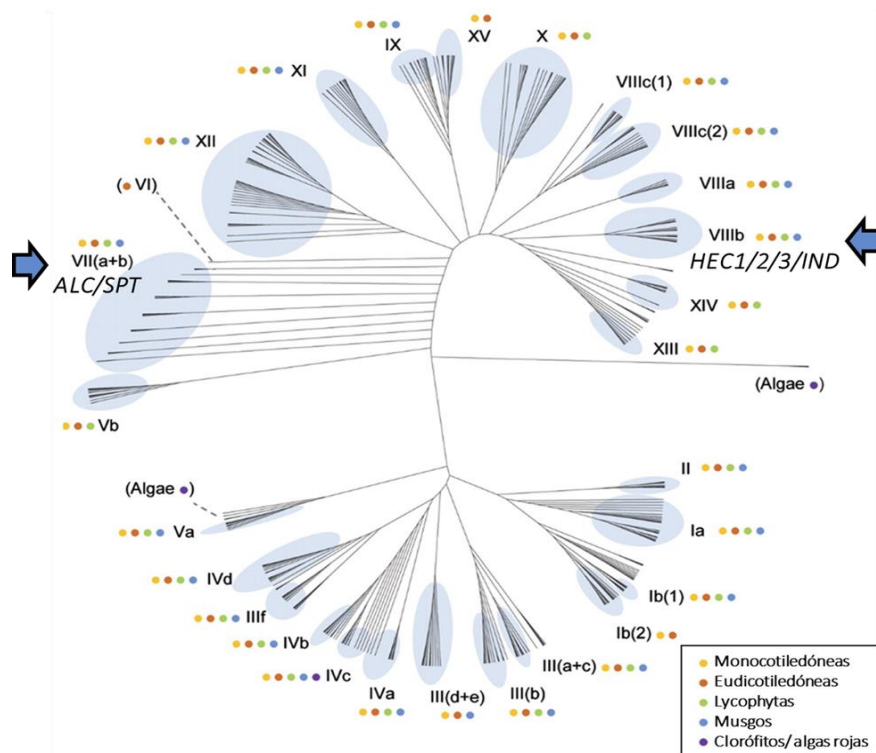


Fig. 7. Organización filogenética de las 26 subfamilias de proteínas bHLH en plantas. Los globos azules delimitan las 26 subfamilias de proteínas vegetales bHLH descritas por Pires & Dolan, 2010b. Las flechas señalan los grupos a los que pertenecen los genes asociados con el desarrollo de flores y frutos. Los puntos de colores simbolizan la especie a la que pertenecen las proteínas de cada grupo (amarillo: *Oryza sativa*, monocotiledónea; rojo: *Arabidopsis thaliana*, eudicotiledónea; verde: *Selaginella moellendorffii*, licofita; azul: *Physcomitrella patens*, musgo; morado: *Volvox carteri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Ostreococcus tauri* y *Cyanidioschyzon merolae*, clorofitas y algas rojas. Figura adaptada y modificada de Pires & Dolan, 2010b.

Los análisis filogenéticos han clasificado la diversidad de proteínas bHLH en varios grupos distintos. Las especies modelo de Angiospermas codifican alrededor de 150 proteínas bHLH en sus genomas, que se pueden organizar aproximadamente en 26 subfamilias más pequeñas (Pires & Dolan, 2010a; 2010b). Sorprendentemente, 20 de estas subfamilias de bHLH también están presentes en licofitas y musgos (Pires & Dolan, 2010b). Esto indica que la mayor parte de la diversidad de proteínas bHLH ya estaba presente en las primeras plantas terrestres, antes de la separación de los linajes de musgos y plantas vasculares que ocurrió hace más de 440 millones de años (Pires & Dolan, 2010b). Por el contrario, solo unas pocas proteínas bHLH están presentes en los genomas de clorofitas o algas rojas. Esto indica que la gran radiación de las proteínas bHLH en plantas se produjo en algún momento entre la separación de los linajes de clorofitas/estrepfitas y el establecimiento de plantas terrestres (Pires & Dolan, 2010a; 2010b).

El tamaño y el patrón de evolución de esta familia concuerda bien con la gran diversidad de funciones durante el desarrollo con los que estos factores han sido asociados. En consonancia, los genes *HEC*, además de las funciones descritas en el desarrollo y diferenciación de los tejidos del gineceo, también poseen funciones no restringidas al desarrollo floral, como la fotomorfogénesis o el funcionamiento del meristemo vegetativo. Tras la percepción de la luz, las plántulas reprimen la actividad de los *PIF* a través de cambios conformacionales mediados por los fitocromos (Leivar & Quail, 2011). Los genes *HEC* modulan esta señalización, formando un complejo proteico con *PIF1* y *PIF3* que inhibe su unión al DNA y, en consecuencia, regulando positivamente la fotomorfogénesis (Zhu et al., 2016). La integración de señales de luz también es crucial para activar la transición de la etapa vegetativa a la reproductiva (Bäurle & Dean, 2006). Por otro lado, los genes *HEC* también se han relacionado con el gen *WUSCHEL* (*WUS*), esencial para generar el nicho de células madre de los meristemas. *WUS* se expresa exclusivamente en el centro organizador del meristemo, mientras que la proteína *WUS* migra hacia la zona distal del mismo para activar a *CLAVATA3* (*CLV3*) y así promover la diferenciación de las células madre (Yadav et al., 2011; Daum et al., 2014). Se ha descrito que *WUS* controla la distribución espacial de *HEC1* al reprimir directamente su expresión, y a su vez, que *HEC1* es un represor indirecto de *CLV3* y de *WUS*, lo cual se asocia con una función moduladora del tamaño y la actividad proliferativa del meristemo, que probablemente también implica su interacción con *SPT* (Schuster et al., 2014).

En *Arabidopsis*, estos estudios detallados sugieren una gran versatilidad funcional por parte de los genes *HEC*, pero el panorama contrasta con los escasos análisis funcionales realizados en otras Angiospermas, restringidos principalmente a análisis de expresión durante el desarrollo del gineceo y el fruto de otras Angiospermas no modelo.

Los análisis de expresión en la Angiosperma magnólida *Aristolochia fimbriata* muestran que el gen *AfimHEC1* se expresa en primordios florales jóvenes y el gimnostemio que *AfimHEC3* se expresa durante todo el desarrollo floral, principalmente en estambres, el ovario y el tracto de transmisión (Perez- Mesa et al., 2020). En especies de Rubiaceae como *Galium hypocarpium* y *Palicourea angustifolia* la expresión de los genes *HEC3* se detecta durante el desarrollo tardío del gineceo y estadios tempranos de los frutos (Salazar-Duque et al., 2021). En las Solanaceae *Brunfelsia australis*, *N. obtusifolia*, *C. annuum* y *S. lycopersicum* los ortólogos de *HEC1* y *HEC2* se expresan aparentemente solo en hojas y solo *HEC3* se detecta en carpelos y en estadios tempranos del fruto (Ortiz- Ramírez et., 2018). Por último, otros ortólogos de *HEC3* en *Prunus*

pérsica y *Vitis vinífera* se expresan principalmente durante el desarrollo del fruto (Fasoli et al., 2012; Botton et al., 2016).

Dado al papel relevante de los genes *HECATE* en el desarrollo de tejidos específicos y a la vez universales en las Angiospermas como son el estigma y el tracto transmisor, partimos de la hipótesis de que estos genes pueden haber sido claves para el origen evolutivo de estos tejidos, y por tanto de las mismas flores. Hemos elegido llevar a cabo estudios comparativos que permitan conocer detalles adicionales acerca de las funciones de los genes *HEC* en otras especies no Brassicaceae donde las herramientas disponibles permitan profundizar en estos análisis, en concreto para este trabajo, *Nicotiana benthamiana*. Esto nos ayudará a proponer nuevos modelos sobre diversos aspectos de la evolución y el desarrollo del gineceo, y posiblemente del fruto, en las Angiospermas.

***Nicotiana benthamiana* como modelo**

Nicotiana benthamiana pertenece a la familia de plantas Solanaceae, género *Nicotiana*, específicamente a la sección *Nicotiana Suaveolentes*. En general, la mayoría de estas poblaciones están geográficamente aisladas, son altamente endogámicas y genéticamente distintas (Cauz-Santos et al. 2022) y es uno de los taxones cuyo genoma nuclear se ha secuenciado (Bombarely et al., 2012).

N. benthamiana (Domin 1929) es una especie alotetraploide ($n=19$), que resulta presumiblemente de una antigua hibridación entre dos especies diploides de las secciones *Sylvestres* y *Noctiflorae* (Leitch et al., 2008). Se originó en América del Sur hace 5-6 millones de años (Leitch et al., 2008), y ha sido considerada durante mucho tiempo la especie más extendida de la sección *Suaveolentes* (Chase & Christenhusz, 2018; Chase et al., 2022). Sin embargo, actualmente se encuentra en estado silvestre en zonas tropicales y subtropicales con monzones de verano del continente australiano (Chase et al., 2022).

A pesar de ser una especie ampliamente extendida, ha sido etiquetada como “extremófila adaptada”, por vivir en hábitats cálidos y secos, con importantes adaptaciones como la floración precoz y la resistencia a condiciones extremas (Bally et al., 2015; Cauz-Santos et al., 2022). Solo una especie de *Nicotiana* sección *Suaveolentes* se usa como planta modelo, *N. benthamiana* LAB, endémica de Australia Occidental (Bally et al. 2015).

LAB se describió por primera vez en 1936 con una donación de semillas del *Waite Research Institute*, Universidad de Adelaida (Glen Osmond, Australia) a la Universidad de California (Berkeley, Estados Unidos) identificado con el AD: 97219292 (Bally et al. 2015; Cauz-Santos et al., 2022; Chase et al., 2022;). La cepa LAB es un huésped casi universal de los virus vegetales, e igualmente es un importante organismo modelo ampliamente utilizado desde principios de los años cincuenta en la investigación de las interacciones entre plantas y virus, gracias a su inusual susceptibilidad a una amplia gama de virus (Bally et al. 2015; Chase et al., 2022; Cauz-Santos et al., 2022). Esta cepa deriva de una población con una mutación de pérdida de función en el gen *RNA polimerasa I (Rdr1)*, lo que le confiere dicha susceptibilidad (Cauz-Santos et al., 2022). Debido al gran número de patógenos capaces de infectarla, esta variante es

ampliamente utilizada en el campo de la virología vegetal para el estudio de los RNA de interferencia (iRNA) y en farmacia para la producción de proteínas y vacunas a nivel industrial (Bally et al. 2015). Además, ha sido fundamental en la investigación por su capacidad de expresar transgenes de forma transitoria (Bally et al. 2015; 2018). Actualmente, se usa para estudiar interacciones proteína- proteína y planta- patógeno, así como para activar virus amplificados por plásmidos y caracterizar funciones genéticas mediante VIGS (Bally et al., 2018). También cabe destacar la facilidad para generar plantas transgénicas estables y para la edición del genoma (Bombarely et al., 2012; Vázquez-Vilar et al., 2016).

N. benthamiana LAB suele crecer en suelo rico y con buen drenaje, sus semillas germinan rápidamente hasta convertirse en plantas majestuosas de hasta dos metros de altura, tiene inflorescencias frondosas, cubiertas de flores tubulares blancas (Chase & Christenhusz, 2018; Chase et al., 2022). Es una planta herbácea que nunca forma roseta, donde sus hojas están dispuestas libremente a lo largo del eje principal que ramifica desde la mitad superior (Chase & Christenhusz, 2018).

En la inflorescencia, las flores están dispuestas en espiral y son tubos alargados de entre 2,5-5,5 cm de largo y 0,4 cm de diámetro y con un limbo de 3,1-3,8 cm de diámetro (Chase & Christenhusz, 2018). También desarrolla flores solitarias que surgen de las axilas de las hojas y los entrenudos de los tallos (Ventimilla et al.,2021). Las flores de *Nicotiana* son pentámeras, en las que el perianto se compone de cinco sépalos y cinco pétalos fusionados, que forman una corola tubular simpétala de la que sobresalen cinco lóbulos (**Fig. 8A**; Ventimilla et al.,2021). Los cinco estambres están insertos sobre la corola (epipétalos). Poseen un gineceo bicarpelar, formado por un ovario bilocular corto con placentación central (Fourquin & Ferrándiz, 2012; Ventimilla et al.,2021). En la porción distal del ovario se encuentra un estilo alargado, coronado por un estigma redondeado, los cuales se insertan en el centro de la corola. Los estambres y el gineceo se encuentran a la misma altura de la abertura del limbo en el momento de la antesis (**Fig. 8A**; Chase & Christenhusz, 2018; Ventimilla et al.,2021).

El desarrollo de las flores está dividido en siete etapas que incluyen desde la elongación del tubo hasta la senescencia de la corola. El tubo se alarga completamente entre los estadios 1 y 2. La antesis ocurre entre los estadios 3 y 4, cuando también se produce la dehiscencia de las anteras. La senescencia de la corola comienza en el estadio 5 y se extiende hasta el 7. Este proceso se caracteriza por la pérdida de turgencia de los pétalos y la aparición de un anillo marrón en la base de la corola del cual se desprenderá el receptáculo floral (Ventimilla et al., 2021). Los frutos son cápsulas, es decir, frutos secos dehiscentes que se desarrollan a partir de un gineceo bicarpelar (esquizocarp), que producen numerosas semillas de color marrón oscuro (**Fig. 8B-C**; Knapp, 2002).

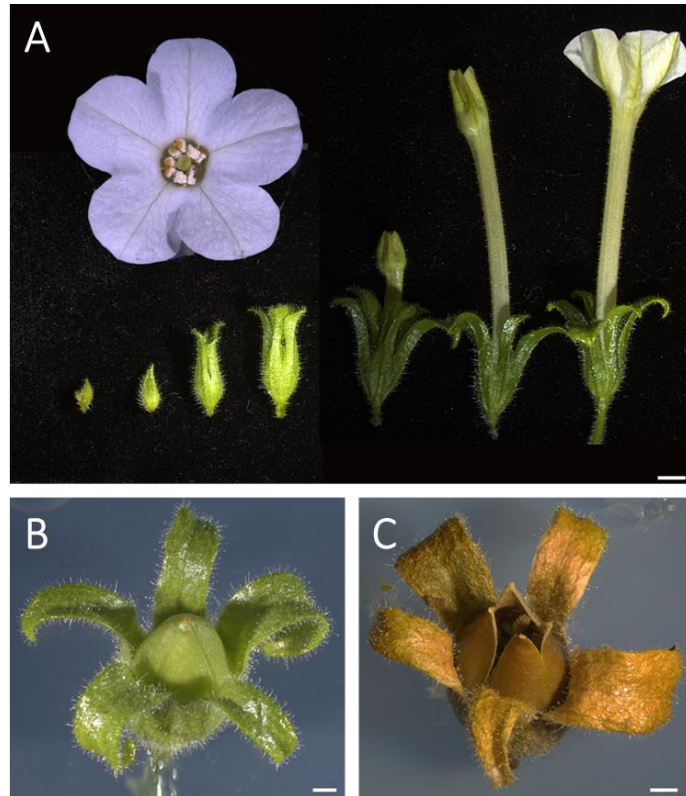


Fig. 8. Fases del desarrollo de *Nicotiana benthamiana*. A. Secuencia del desarrollo floral. En la vista superior izquierda se muestra el limbo en anthesis. B-C. Frutos de *N. benthamiana*. B. Fruto inmaduro, previo a la dehiscencia. C. fruto maduro dehiscente. Las fotografías en A. no se corresponden exactamente con la descripción de los estadios. Esc: A: 2mm; B-C: 1mm

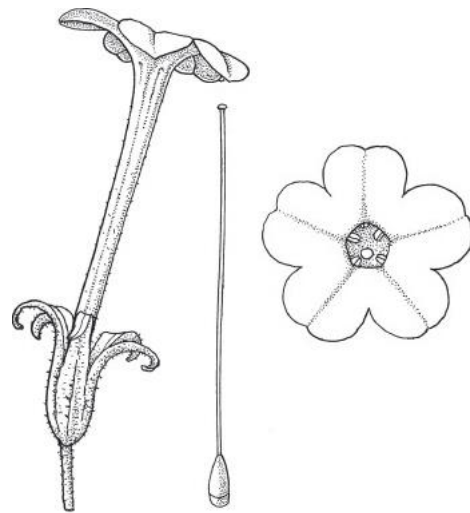


Objetivos

En nuestro laboratorio, una de las preguntas fundamentales que dirigen nuestra investigación es entender las bases genéticas y moleculares que pueden explicar la evolución y el desarrollo del gineceo de las Angiospermas. Basándonos en resultados previos y los estudios desarrollados en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, que evidenciaron la importancia funcional de los genes *HECATE* (*HEC*) en el desarrollo de los tejidos apicales del gineceo nos propusimos, como **objetivo general** desarrollar una hipótesis evolutiva y funcional del linaje de genes *HECATE* previos a la diversificación de las Brassicaceae que nos permita entender su contribución a la evolución morfo-anatómica del gineceo y el fruto de las Angiospermas. Teniendo en cuenta que la correcta formación de los tejidos apicales del gineceo es fundamental para la polinización, fecundación y formación del fruto y su aparición está íntimamente ligada al origen de las flores, este conocimiento puede ayudar a entender las bases moleculares subyacentes al origen de esta fundamental innovación evolutiva. Así, nos propusimos caracterizar los genes *HEC* en *Nicotiana benthamiana*, teniendo en cuenta una perspectiva evolutiva dentro del contexto de las Angiospermas.

Para esto nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar y alinear las secuencias de los ortólogos de *HEC1/2/3* en *Nicotiana benthamiana* con las de otros ortólogos identificados en los genomas y transcriptomas disponibles de otras especies de Angiospermas, con el fin de ampliar nuestro conocimiento sobre la filogenia y la historia evolutiva de esta subfamilia de factores de transcripción.
2. Caracterizar los patrones de expresión de los genes *NibeHEC* mediante qRT-PCR e hibridación *in situ* en diferentes tejidos, haciendo especial énfasis en los órganos fértiles de las flores, además de frutos en estadios previos a la maduración.
3. Generar mutantes de pérdida de función y caracterizar en detalle sus fenotipos durante el desarrollo floral para evaluar el grado de conservación funcional de los genes *HEC* de *Arabidopsis* y *Nicotiana benthamiana*.
4. Proponer hipótesis sobre la posible historia evolutiva de la subfamilia *HECATE* en base al conjunto de resultados obtenidos.



Materiales y Métodos

Material vegetal

Utilizamos *Nicotiana benthamiana* cepa LAB (Cauz-Santos et al., 2022; Chase et al., 2022) como accesión silvestre para la realización de este trabajo. Las semillas se sincronizaron sumergiéndolas en agua durante 16 horas y posteriormente se cultivaron en suelo que contenía una mezcla de turba negra: perlita: vermiculita en proporciones 2:1:1, en cámaras climatizadas Sanyo a 25°C luz/ 23°C oscuridad y condiciones de día largo: 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad.

Igualmente utilizamos *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg erecta (Ler) para las pruebas genéticas en la especie modelo. Usamos las líneas transgénicas *ind-1* e *ind-2* descritas y caracterizadas en Liljegren et al., 2000; 2004. Las plantas se estratificaron en oscuridad a 4°C entre 3-4 días para sincronizar la germinación. Luego se cultivaron en cabinas de invernadero con luz natural y complementada con luz fría de 4600lm para complementar el fotoperiodo de día largo. La temperatura de crecimiento fue constante a 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

Líneas transgénicas

Partimos de plantas silvestre de *Nicotiana benthamiana* cepa LAB. Esta se transformó siguiendo la metodología descrita en Wang (2006), como se detalla en el apartado siguiente. La transformación se realizó utilizando *A. tumefaciens* (C58-pMP90) que portaba el vector binario: Ω_1 : Cas9_pU6-26_ t-RNA_ gNibeHEC3-5' _ gNibeHEC3-3'; denominado: Ω_1 : Nibehec3a-CRISPRCas9. La regeneración somática se realizó mediante cultivo *in vitro* y para la caracterización fenotípica utilizamos mutantes bialélicos, denominados *Nibehec3*-CRISPR. Estos se regeneraron en paralelo con explantes sin transformar y se crecieron en iguales condiciones que el ecotipo silvestre.

Además, generamos las siguientes líneas transgénicas de sobreexpresión y de complementación con el promotor de *IND*, en los fondos mutantes de *ind-1* e *ind-2* Ler de Liljegren et al., 2000; 2004.

Línea	Ecotipo	Referencia
<i>Nibehec3</i> -CRISPRCas9	<i>N. benthamiana</i> cepa LAB	Este trabajo
<i>ind-1</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Liljegren et al., 2000; 2004
<i>ind-2</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Liljegren et al., 2000; 2004
35s:: <i>NibeHEC3</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Este trabajo
35s:: <i>AtHEC3</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Este trabajo
35s:: <i>AtIND</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Este trabajo
pIND: <i>NibeHEC3</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Este trabajo
pIND: <i>AtHEC3</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Este trabajo
pIND: <i>AtIND</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Este trabajo
pIND: <i>GUS</i>	<i>A. thaliana</i> (Ler)	Este trabajo

Microorganismos

La siguiente tabla numera las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Especie (Cepa)	Uso	Referencias
<i>Escherichia coli</i> (EZ10)	Transformación de bacterias	Clontech
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58 pMP90)	Transformación de <i>Arabidopsis</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i>	(Koncz and Schell, 1986)

Cultivo de bacterias

Las bacterias se cultivaron en medio LB (*Luria- Bertani medium*) compuesto por triptona (10g/L), extracto de levadura (5.0 g/L) y NaCl (1.0 g/L), ajustando el pH a 7.0. El medio sólido se obtuvo añadiendo 15g/L de agar al LB. Los cultivos líquidos de *E. coli* y *A. tumefaciens* se cultivaron durante 16 horas en agitación constante de 200rpm a 37°C o 28°C, respectivamente. Los cultivos en medio sólido de *E. coli* se incubaron a 37°C durante 16 horas y los de *A. tumefaciens* a 28°C durante 2 días.

Todos los cultivos fueron suplementados con el antibiótico utilizado para la selección de bacterias portadoras del plásmido: Espectinomicina (100µg/mL), Cloramfenicol (33µg/mL), Gentamicina (100µg/mL), Ampicilina (100µg/mL), Kanamicina (50µg/mL) y Rifampicina (100µg/mL).

Aislamiento de ácidos nucleicos

Extracción de plásmidos de DNA

Los plásmidos replicados en *E.coli* se extrajeron utilizando el kit comercial a pequeña escala de "GeneJET Plasmid Miniprep" (Fermentas). Partimos de cultivos líquido de LB (5mL) suplementados con los antibióticos correspondientes según la resistencia del plásmido utilizado. Las extracciones se realizaron en fase estacionaria de *E.coli* siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para las extracciones de los plásmidos a partir de *A.tumefaciens* seguimos el protocolo descrito por Sambrook et al., 1989. Usamos cultivos líquidos de *A.tumefaciens* en 5mL de LB, suplementados con Rifampicina 100µg/mL y gentamicina 100µg/mL más el antibiótico correspondiente que permitiera la selección del vector. Dada la baja calidad y pureza de esta extracción los plásmidos de *A.tumefaciens* se re-transformaron en *E.coli* y posteriormente se realizó la extracción y purificación del plásmido, como se describió anteriormente. Dicho vector se envió a secuenciar o se analizaron los patrones de corte para la verificación de las secuencias.

Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico de *N. benthamiana* colectamos las muestras de hojas jóvenes o meristemos florales en nitrógeno líquido. La extracción se realizó siguiendo el protocolo descrito por Weigel y Glazebrook, 2009. El genómico fue resuspendido en 50 μ L de agua mili-Q con RNAsa.

Las extracciones de DNA genómico de *Arabidopsis* se hicieron a partir de hojas jóvenes colectadas en hielo. La extracción de DNA se realizó siguiendo el protocolo de "Quick DNA prep for PCR" descrito por Weigel & Glazebrook, 2009. El DNA obtenido se resuspendió en 70 μ L de agua mili-Q.

Extracción y purificación de RNA total

Para las extracciones de *N. benthamiana* y *Arabidopsis* colectamos muestras en nitrógeno líquido. La extracción de RNA se realizó utilizando el sistema "E.Z.N.A. Plant RNA kit" (Omega) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA total obtenido se cuantificó en un NanoDrop (ND1000) y la integridad del RNA se determinó por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.5%. La purificación la realizamos siguiendo las indicaciones del "DNA free Kit" (Fermentas).

Manipulación de ácidos nucleicos

Síntesis de cDNA

Partimos de 3 μ g de RNA total de *N. benthamiana* a partir de meristemos vegetativos, reproductivos o órganos florales disectados, según el análisis que fuéramos a realizar. El RNA fue previamente aislado y purificado con DNAsa como se describe en el apartado anterior. Este se transcribió utilizando el sistema SuperScriptIV (Thermo) seleccionando el RNA mediante Oligos dT₁₂₋₁₈ o aleatorios según fuese el caso, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena la polimerasa (PCR)

Esta metodología fue ampliamente utilizada durante el desarrollo de este trabajo. La utilizamos para la amplificación de segmentos de clonación, genotipados, o cuantificación de la expresión génica. En cada caso se utilizaron diferentes combinaciones de oligos y diferentes moldes según fuese la finalidad: DNA genómico, plasmídico, cDNA, etc. Para la amplificación utilizamos dos tipos de polimerasas: *HF Phusion* (Thermo) para amplificaciones de alta fidelidad y la *GoTaq* (Fermenta) para amplificaciones rutinarias como los genotipados. Las condiciones generales utilizadas con cada polimerasa se muestran la siguiente tabla.

	DNA Polimerasa	
	<i>HF Phusion</i>	<i>GoTaq</i>
Solución tampón	1X	1x
MgCl ₂	1mM	2mM
dNTPs	300µM	200 µM
Oligo Fwd	1µM	1µM
Oligo Rev	1µM	1µM
H ₂ O mili-Q	Hasta 50µL	Hasta 50µL
Enzima	0,2U/ µL	0,2U/ µL
Molde	1pg- 10ng	1pg- 10ng

Condiciones de la PCR

Nombre de Ciclo	Número de Ciclos	Programa de PCR			
		Temperatura		Tiempo	
		<i>HF Phusion</i>	<i>GoTaq</i>	<i>HF Phusion</i>	<i>GoTaq</i>
Desnaturalización	1	98°C	95°C	1min	3min
Desnaturalización	35	98°C	95°C	10s	30s
Hibridación		60-67°C	50-60°C	30s	30s
Extensión		72°C	72°C	30s/Kb	60s/Kb
Extensión Final	1	72°C	72°C	5min	5min
Almacenaje	1	10°C	10°C	∞	∞

La temperatura optima de hibridación de los oligos se calculó teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante que nos lo sintetizaba, *IDT Integrated DNA Technologies*.

Purificación de los productos de PCR

Algunos procedimientos como la clonación o la secuenciación requieren segmentos de DNA de alta pureza, por lo que tras la amplificación se realiza la purificación del producto de PCR.

Sí tras la amplificación por PCR se generó un único fragmento, directamente utilizábamos el sistema “NúcleoSpin PCR cleanup” (Macherey Nagel) siguiendo las indicaciones del fabricante con el fin de eliminar rastros de los reactivos utilizados en la PCR. En cambio, cuando la amplificación generaba fragmentos inespecíficos, estos fueron separados por electroforesis con gel de agarosa al 1.5%. El segmento de interés fue recortado del gel y el contenido de DNA fue purificado siguiendo las instrucciones del sistema “NúcleoSpin Gel Cleanup” (Macherey Nagel). Los productos de PCR purificados fueron eluidos en 10µL de agua Mili-Q estéril.

PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para la cuantificación de la expresión génica, primero diseñamos oligos para cada caso utilizando el software Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). En base a los siguientes parámetros:

Temperatura de hibridación	58-62°C
Contenidos CG	40-60%
Tamaño de Amplificación	150-200pb

Para cada pareja de oligos se probó la eficiencia de amplificación en diluciones seriadas de cDNA (1/10, 1/100, 1/1000) para descartar amplificaciones inespecíficas, ineficientes o dimerización entre las parejas de oligos. Seleccionamos los oligos con un intervalo de eficiencia de [90-110]. Para cada reacción de qRT-PCR utilizamos:

Reactivos	Volumen
Premix PyroTaq Eva Green qPCR Mix Plus [5X]	2µL
cDNA [0,002ng/µL]	2µL
Oligo Fwd	0,5µL
Oligo Rev	0,5µL
H ₂ O mili-Q	Hasta 10µL

Las reacciones se realizaron por triplicado y se llevaron a cabo en un termociclador “7500 Fast PCR System”. Los valores de expresión génica se calcularon durante la fase exponencial de la PCR mediante la cuantificación de la fluorescencia, en función del número de ciclos necesarios para superar el umbral de fluorescencia (Ct). Con este valor, se calculó la expresión relativa del gen de interés con respecto a la expresión del gen constitutivo *Elongation Factor* (L25; ID: 107796789), utilizando el método $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct) con la siguiente fórmula:

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

Digestión de DNA con enzimas de restricción

Seguimos el protocolo estandarizado de Maniatis et al., 1982, utilizando enzimas de restricción y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Llevamos a cabo las reacciones durante 2 horas a la temperatura recomendada, utilizando entre 5-10 unidades de enzimas por cada µg de DNA. El resultado fue visualizado mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1%.

Secuenciación

Secuenciación Sanger

Utilizamos este tipo de secuenciación para verificar las secuencias de las amplificaciones de fragmentos de PCR. Se realizó en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología

Molecular y Celular de Plantas (UPV-Valencia) usando un secuenciador capilar “ABI3130XL” (Applied).

Caracterización Funcional

Silenciamiento Genético Inducido por Virus (VIGS)

El ensayo de VIGS se realizó siguiendo el protocolo de Dinesh-Kumar et al., (2003). Los plásmidos fueron clonados siguiendo la metodología de Lic- VIGS, utilizando los vectores de TRV1 (pYL192; Liu et al., 2002) y TRV2pYY13; (Dong et al., 2007).

Edición genética mediante CRISPR- Cas9

Construcción del vector CRISPR/Cas9

La construcción se realizó utilizando la herramienta multiplexing de GoldenBraid (GB) adaptada al sistema CRISPR gRNA-Cas9 mediado por T-DNA (Vasquez- Vilar et al., 2016).

Primero diseñamos dos guías de RNA (gRNA) de veinte nucleótidos, que eran capaz de reconocer las regiones blanqueantes del dominio bHLH de los dos genes *NibeHEC3*. Estas guías se denominaron: *gNibeHEC3-5'* y *gNibeHEC3-3'* señalando la posición dentro de la secuencia codificante de *NibeHEC3*. Dado el alto grado de similitud entre las secuencias de *NibeHEC3*, la *gNibeHEC3-3'* es común para ambas secuencias. Las guías se diseñaron siguiendo las recomendaciones de: <https://gbcloning.upv.es/tools/crispr/> (Vasquez- Vilar et al., 2016). Para cada guía, esta herramienta generó dos oligonucleótidos semicomplementarios, es decir, un segmento de DNA de cadena doble parcialmente complementarios (que contiene las secuencias guías de *gNibeHEC3*), con cuatro nucleótidos libres en cada extremo. Los extremos libres determinan la posición dentro de una unidad transcripcional de GB/CRISPR-Cas9 (Vasquez- Vilar et al., 2016). Cada pareja de oligonucleótido fue diluidas a una concentración de 1M, mezclados en proporción 1:1 e incubados a temperatura ambiente durante 30min. Los productos de doble cadena fueron clonados independientemente en un módulo básico de clonación de GB ('nivel 0') que contiene la secuencia del t-RNA: GB1208_ *gNibeHEC3-5'*; GB1207_ *gNibeHEC3-3'*. Este a su vez se integró en el vector pUPD2 de 'nivel 1' (GB0307): pUPD2: t-RNA_ *gNibeHEC3-5'*; pUPD2: t-RNA_ *gNibeHEC3-3'*. Estas construcciones fueron confirmadas mediante las digestiones del plásmido con enzimas de restricción y la posterior secuenciación.

En el siguiente nivel, ambas construcciones se combinaron con un promotor de PolIII, el promotor U6-26 de *Arabidopsis* (GB1001), dando lugar al 'nivel 2': α_2 : pU6-26_: t-RNA_ *gNibeHEC3-5'*_ *gNibeHEC3-3'*. Para construir el casete final de las *gNibeHEC3*, continuamos al 'nivel 3' ligando a la construcción anterior el vector α_1 : nptII_Cas9_DsRed (GB_UA_2578), generando el vector: c: Cas9_pU6-26_ t-RNA_ *gNibeHEC3-5'*_ *gNibeHEC3-3'*.

La extracción y purificación de los vectores resultantes se realizó usando el *GeneJET Plasmid Miniprep* (Fermentas), con estos se transformó *E.coli*, (cepa EZ10) y se seleccionaron colonias según la resistencia de cada vector. A partir del 'nivel 2' de clonación, las colonias positivas fueron chequeadas mediante una reacción de digestión.

Las reacciones de clonación se realizaron siguiendo las recomendaciones de digestión/ ligación cíclica de <https://gbcloning.upv.es/>; Vázquez- Vilar et al., 2016; 2020. Todas las unidades transcripcionales del sistema CRISPR gRNA-Cas9 se realizaron combinando únicamente módulos de GB que codifican proteínas y los elementos constitutivos de la expresión de la planta (Vázquez-Vilar et al., 2016).

Cultivo *in vitro* y transformación estable de *N. benthamiana*.

La transformación y la regeneración *in vitro* se realizaron siguiendo la metodología de la disco foliar descrita en Wang (2006), la cual se siguió con pequeñas modificaciones.

Se colectaron de 4-6 hojas bien expandidas, de los últimos nodos de crecimiento con 6 semanas de edad de *N. benthamiana* LAB. Las hojas se sumergieron en agua destilada durante aproximadamente 30min, realizando al menos dos cambios durante este tiempo. Para la esterilización, las hojas se sumergieron durante 15 min, en una solución comercial de lejía (10%) y 20µL/L de Tween-20. Posteriormente, se realizó un lavado con etanol 70% e inmediatamente se realizaron al menos 4 lavados sucesivos con agua destilada. A continuación, las hojas se colocaron sobre un papel de filtro estéril y se cortaron los discos utilizando un sacabocados de 0,5 cm de diámetro. Los explantes o discos se encubaron durante 30min en un co-cultivo de *A. tumefaciens* (C58-pMP90) que portaba el vector final de expresión: Ω_1 : Cas9_pU6-26_ t-RNA_gNibeHEC3-5'_ gNibeHEC3-3'.

Las células de *A. tumefaciens* se cultivaron toda la noche en agitación a 28°C en medio LB (Luria-Bertani), compuesto por: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L y NaCl 1.0 g/L, pH 7.0, y suplementado con los antibióticos: espectinomicina (100µg/mL), gentamicina (100µg/mL), y ifampicina (50µg/mL). Estas células fueron re-suspendidas en una solución de MB (Medio Base): 6-bencilaminopurina [1mg/mL], ácido 1-naftalenacético [1mg/mL], acetosiringona [0,1M]; hasta alcanzar una OD: 0,5- 0,7.

A continuación, los explantes se transfirieron a esta solución y se incubaron en oscuridad durante 30min con agitación lenta. Tras esta incubación, los explantes se colocaron en una caja de Petri con MB sólido, durante 3 días a 25°C en oscuridad. Después, los explantes se transfirieron a cajas Petri con medio de recuperación: MB sólido suplementado con carbenicilina [50mg/mL] y cefataxina [100mg/mL], durante 3 días a 25°C en oscuridad. Posteriormente, los explantes se transfirieron a medio de selección: medio de recuperación sólido suplementado con Kanamicina (50µg/mL), haciendo cambios periódicos al menos cada 10 días, hasta que aparecieron los primeros callos y posteriormente los brotes. Los brotes individuales se separaron de los explantes y se transfirieron a un medio de enraizamiento: medio MS con vitaminas [Duchefa], 10% de sacarosa, 0,8% de fitoagar, suplementado con Kanamicina (50µg/mL) hasta la aparición de las primeras raíces. La regeneración orgánica de los brotes se realizó en condiciones de día largo en

una cámara de crecimiento (16 horas de luz/8 horas de oscuridad; 24 C; 60-70% de humedad; 250 mol/m² s de fotones). Además de Kanamicina, los explantes positivos también se podían seleccionar mediante la visualización de fluorescencia DsRED, que funciona como marcador para la detección del transgén, selección positiva adicional en el T0 (clones que se propagan una vez ocurre la regeneración orgánica de los explantes) y como marcador negativo en T1 (la primera generación de plantas a partir de clones T0).

Análisis del DNA genómico editado e identificación de los alelos mutantes de *N. benthamiana*.

De cada posible planta transgénica *Nibehec3* que presentaba cambios morfológicos con respecto al silvestre, se extrajo DNA genómico de las hojas (150 mg de tejido) utilizando la metodología descrita anteriormente. Para cada una de estas muestras se amplificaron las secuencias codificantes de cada uno de los genes *NibeHEC3* por separado, mediante PCR utilizando cebadores específicos de cada gen. Los amplicones se purificaron utilizando el sistema “NúcleoSpin PCR cleanup” (MachereyNagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA purificado se eluyó en 15µL de agua Milli-Q estéril y se envió a secuenciar. Los cromatogramas del DNA genómico editado se analizaron con Inference of CRISPR Edits (ICE) de Synthego V3 (<https://ice.synthego.com/>).

Fijación e inclusión de muestras vegetales en parafinas

El material fue colectado y fijado en FAA (50% etanol, 37% formaldehído y 5% ácido acético glacial) realizando 2 pulsos de vacío durante 10min cada uno, para facilitar la penetración del fijador. A continuación, se sustituyó el FAA, por una solución fresca del mismo fijador y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las muestras se lavaron con etanol 70%. La tinción con eosina y posterior inclusión en parafina de las muestras se llevó a cabo en el servicio de microscopía del IBMCP utilizando un Procesador automático de tejidos (Leica TP 1020). Finalmente, se montaron bloques de parafina para la obtención de cortes histológicos, utilizando para ello una estación de inclusión Leica EG1150H. Para la obtención de cortes histológicos se empleó un microtomo Leica RM-2025, con el que se obtuvieron secciones de 8-10µM de grosor, estas secciones se recogieron sobre portaobjetos de adhesión de polisina Polysina adhesion slides (Thermo) cubiertos con una capa de agua Milli-Q para extender los cortes. Finalmente, el agua se retiró con cuidado con la ayuda de un papel y los portaobjetos con las secciones se dejaron secar sobre una placa calefactora a 40°C toda la noche.

Hibridación *in situ* de RNA

Colectamos botones florales en diferentes estados del desarrollo hasta frutos con 5 días post-antesis. Además, se colectaron frutos en estadios más avanzados previos al comienzo de la lignificación del endocarpo. El material fue fijado, deshidratado y embebido en parafina como se describe en el apartado anterior.

Generamos las sondas marcadas con dioxigenina, a partir de un producto de PCR amplificado con oligos que contenían el dominio de reconocimiento para la T7 polimerasa. siguiendo el protocolo descrito por Coen et al., (1990) y Bradley et al., (1993).

La hibridación *in situ* se realizó según el protocolo descrito por Ferrándiz et al (2000), estandarizado la temperatura de hibridación a 53°C. Los resultados se observaron un microscopio óptico Leica 5000.

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

El análisis de muestras vegetales mediante SEM se llevó a cabo en el servicio de Microscopia Electrónica de la UPV. Las muestras fueron fijadas utilizando una solución de glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato de sodio (NaPi), pH 7,2 [0,1M] durante 14h a temperatura ambiente, luego se lavaron tres veces con la solución NaPi [0,1M] de 10 minutos cada lavado y posteriormente se deshidrataron con soluciones seriadas de etanol de 30%, 70%, 80%, 96%, 100% de 10 minutos cada una. Posterior al tratamiento de fijación y deshidratación las muestras se sometieron a punto crítico y seguidamente se montaron en cintas de carbono para su recubrimiento con partículas de oro- platino. Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio electrónico JEOL, modelo JSM-5410.

Coloración fluroglucinol-HCl

Los tejidos lignificados se visualizaron mediante tinción de Weisner (Phloroglucinol-HCl, Sigma-Aldrich; Clifford, 1974). Esta tinción reacciona con los grupos aldehído en la lignina, dando una coloración rojiza-púrpura característica a la xilema en los haces vasculares. Los frutos se incubaron en floriglucinol al 1%. y se agregaron unas gotas de HCl al 37% (v/v). Los tejidos lignificados aparecieron con una coloración rosa-roja unos 5 minutos más tarde. Las fotografías se tomaron inmediatamente en un macroscópico Leica.

Coloración con azul de anilina para los tubos polínicos

Emasculamos y polinizamos con polen silvestre, 10 flores silvestres y 10 flores *Nibehec3a*- CRISPR, con el fin de analizar el crecimiento de los tubos polínicos a través del tracto de transmisión. Para esto seguimos el protocolo descrito en Balanzà et al., 2014. Posterior a la fijación y el ablandamiento del tejido las muestras fueron observados en un microscopio de fluorescencia estándar Leica 5000 bajo luz UV y filtro DAPI.

Análisis evolutivo

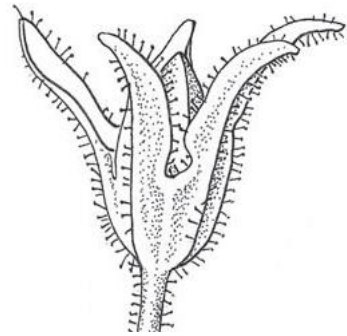
Aislamiento de genes y análisis filogenético

Partimos de las secuencias codificantes de *Arabidopsis thaliana* como referencia para realizar la búsqueda mediante BLAST (Altschul et al., 1990) e identificar cada uno de los genes *HECATE* en las diferentes bases de datos públicas para los genomas de *Nicotiana benthamiana* y las demás especies de Angiospermas utilizadas. La mayoría de los datos consultados provenían de genomas completos y anotados de las siguientes bases de datos publicas: SolGenomicsNetwork (<https://solgenomics.net/search/locus>), Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) y OneKP (<https://sites.google.com/a/ualberta.ca/onekp/>). Las secuencias aisladas fueron alineadas manualmente, utilizando BioEdit, para conseguir el marco de lectura abierto y estas fueron alineadas usando la versión en línea de MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; Katoh et al., 2002) con una penalización de 3.0, un valor de compensación de 1,0 y todas las demás configuraciones fueron predeterminadas.

Para el análisis filogenético de máxima verosimilitud (ML) usamos las secuencias de nucleótidos usando RaxML-HPC2 BlackBox (Stamatakis et al., 2008) a través del CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). El modelo de evolución molecular se calculó usando MEGA7.0 (Kumar et al., 2016). usando el gen bHLH87 de *Amborella trichopoda* como grupo externo. Los árboles filogenéticos se observaron y editaron utilizando FigTree v1.4.3. Todas las secuencias incluidas en los análisis se encuentran publicadas en Ortiz- Ramírez et al 2008.

Microsintenia

Realizamos este análisis de microsintenia para comprobar el entorno genético y el orden de los genes a lo largo del cromosoma en los dos subgenomas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*. La microsintenia se calculó y puntuó utilizando SynFind en la plataforma CoGe (Tang et al. 2015; <https://genomeevolution.org/coge/>). Luego las regiones genómicas seleccionadas y los genes fueron descargados de SolGenomicsNetwork (<https://solgenomics.net/search/locus>) y Newcotiana (<https://newcotiana.webs.upv.es/es/>). La homología génica fue confirmada manualmente con BLAST y el resultado gráfico fue generado utilizando la plataforma en línea de Simple Synteny (<https://www.dveltri.com/simplesynteny/>; Veltri et al., 2016).



Resultados

Análisis filogenético de los genes *HEC1/2/3/IND*

El linaje de genes *HEC/IND* ha sido bien identificado y descrito en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, por fuera de la familia Brassicaceae, este linaje ha sufrido diversos eventos de duplicación durante la diversificación de las demás Angiospermas. Nuestro primer objetivo ha sido generar una hipótesis filogenética acerca de la evolución del linaje *HEC1/2/3/IND* en la diversificación de las plantas con flor, para generar una visión más amplia sobre cómo han podido afectar estos eventos evolutivos a las secuencias de los genes y a su vez como se pueden asociar dichos cambios a las posibles diferencias funcionales entre los genes *HEC/IND* de las Angiospermas.

Iniciamos este análisis con la búsqueda y el aislamiento de los homólogos de los genes *HEC1/2/3/IND* en las bases de datos públicas disponibles y otras privadas del laboratorio de Evo-Devo en plantas de la Universidad de Antioquia (Colombia). Para cada uno de los genes, las búsquedas las realizamos utilizando las secuencias de *Arabidopsis thaliana* como referencia para identificar los ortólogos en todas las especies de Angiospermas disponibles, y haciendo principal énfasis de búsqueda en la familia Solanaceae. Utilizamos BLAST (Altschul et al., 1990) para realizar las búsquedas de las secuencias en las diferentes bases de datos. La mayoría de los datos consultados provenían de genomas completos y anotados, de los que aislábamos la secuencia codificante de cada uno de los genes de interés. Sin embargo, para algunas especies, solo contábamos con los datos públicos de los transcriptomas, por lo que editamos manualmente las secuencias para conseguir el marco de lectura correcto. Solo considerando este último caso, también incluimos secuencias incompletas pero que conservaran el distintivo dominio bHLH. Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas usando la versión en línea de MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; Katoh et al., 2002). El alineamiento se depuró manualmente con BioEdit teniendo en cuenta el dominio bHLH y manteniendo el marco de lectura abierto. Para el modelo de evolución molecular utilizamos las secuencias de nucleótidos. El gen bHLH87 de *Amborella trichopoda* fue utilizado como grupo externo, los árboles se observaron y editaron utilizando FigTree v1.4.3.

Nuestro análisis filogenético para el linaje *HEC1/2/3/IND* se realizó con 176 secuencias que incluía las grandes familias de Angiospermas y sus especies más representativas. Los datos alineados constan de 1867 caracteres, de los cuales 911 eran informativos. La topología del árbol de las Angiospermas sugiere un evento de duplicación temprana previo a su diversificación, que dio lugar a dos grandes clados: *HEC1/2* y *HEC3/IND* (**Fig. Suple 1**). Dentro de cada uno de estos, se han producido duplicaciones adicionales. Por ejemplo, el clado *HEC1/2* se ha separado independientemente dando lugar a los clados *HEC1* y *HEC2*, donde ambos tienen representantes de dos grandes grupos de Angiospermas: Rosidae y Asteridae (**Fig. Suple 1**). Por su parte el clado *HEC3/IND* sólo sufrió duplicaciones adicionales durante la diversificación de las Brassicaceae, dando lugar a los clados *HEC3* e *IND* (**Fig. Suple 1**). Sin embargo, otras rosidae y la mayoría de los asteridae sólo tienen genes pre-duplicación de una sola copia más similares a *HEC3* (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017).

En un análisis filogenético más detallado para la familia Solanaceae, se observaron diferentes tendencias de duplicación para este linaje de genes, denominado:

SolHEC1/SolHEC2/SolHEC3. Los clados *SolHEC1* (BS=99) y *SolHEC2* (BS=99) se separan independientemente y detectamos duplicaciones adicionales, por un lado, dando lugar a *SolHEC1* (Bootstrap BS = 81) y *SolHEC1-1* (BS = 58) y por otro en *SolHEC2* (BS = 92) y *SolHEC2-1* (BS = 99; Fig.9). Así, la mayoría de las Solanaceae tienen dos copias de *HEC1* y dos copias de *HEC2* (Fig.9). Otras duplicaciones adicionales ocurridas en estos clados las detectamos específicamente en las especies *N. benthamiana* y *N. tabacum*, ambas alotetraploides. En *N. benthamiana* identificamos cuatro copias del gen *HEC1* y tres copias de *HEC2*, mientras que en *N. tabacum* encontramos una copia de *HEC1* y tres copias de *HEC2* (Fig.9). Esto contrasta directamente con el clado *SolHEC3* de las Solanaceae, donde identificamos una sola copia del gen *HEC3* (BS = 100) para la mayoría de las especies, con la misma excepción para las especies tetraploides de *N. benthamiana* y *N. tabacum*, que poseen dos copias del gen *SolHEC3* cada una (Fig.9).

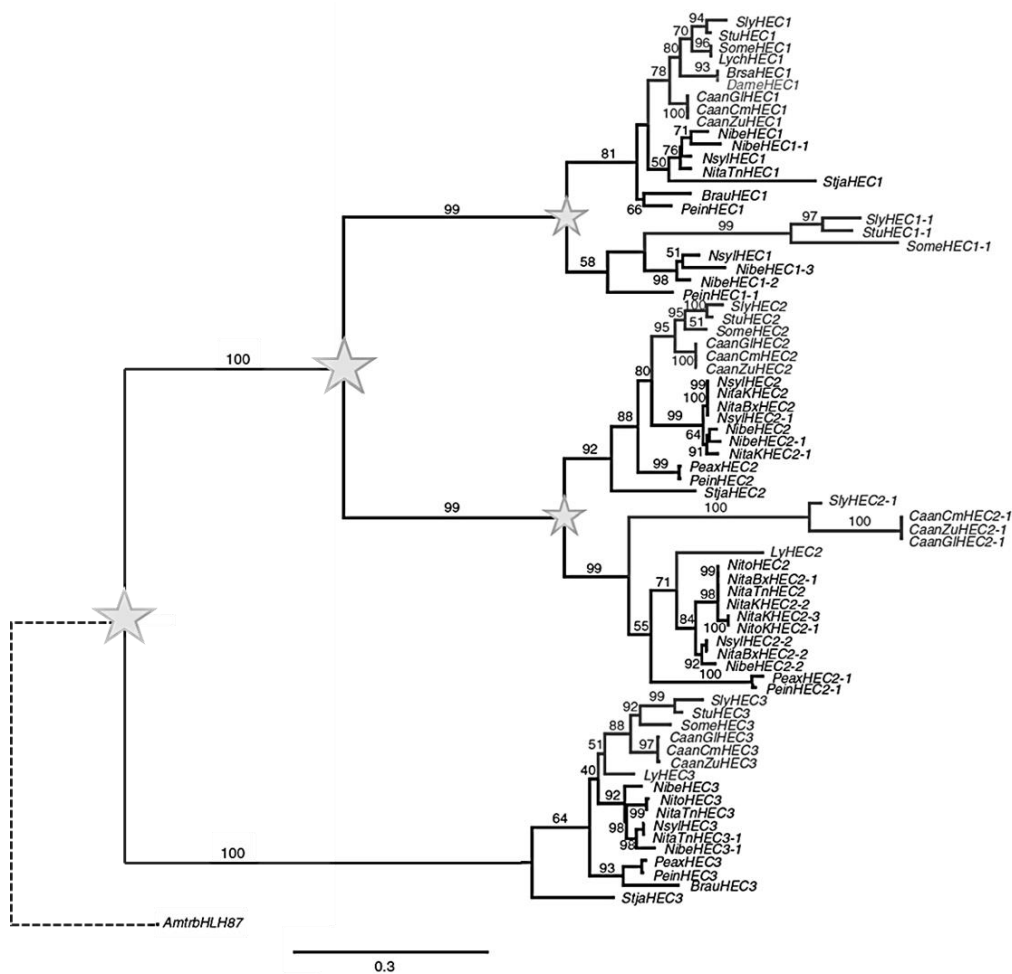


Fig. 9. Árbol de máxima verosimilitud de los genes *HECATE/INDEHISCENT* en Solanaceae. La topología recupera una división entre los clados *HEC1/2* y *HEC3* que es anterior a la diversificación de las Angiospermas, seguida de los eventos de duplicación dentro de *HEC1* y *HEC2* específicos de Solanaceae. Dado que el gen *IND* es exclusivo de Brassicaceae, las Solanaceae solo poseen copias más similares a los genes *HEC3*. Utilizamos el gen *bHLH87* de *Amborella trichopoda* (*AmtrbHLH87*) como grupo externo. Las estrellas simbolizan los eventos de duplicación. Los números de las ramas indican los soportes de *bootstrap* (BS) y la barra es la escala que indica el número de sustituciones dividido por la longitud de la secuencia. Adaptado y modificado de Ortiz- Ramírez et al 2018.

Adicionalmente, incluimos un análisis filogenético resumido que incluye únicamente las especies de *N. benthamiana* y *A. thaliana* para soportar la similitud entre los clados de ambas especies (Fig.10). Como era de esperar, se refleja la historia evolutiva antes descrita para estos genes: la separación entre los clados *HEC1/2* (BS=98) y *HEC3* (BS=98) y las duplicaciones propias ocurridas en *N. benthamiana*. Sin embargo, cabe destacar que para el clado *HEC3*, los genes *HEC3/IND* de *Arabidopsis* parecen acumular mutaciones con respecto sus ortólogos *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* (Fig.10). Estas diferencias entre las secuencias también nos podrían sugerir cambios funcionales con respecto a los genes *HEC3* previos a los eventos de duplicación ocurridos en Brassicaceae.

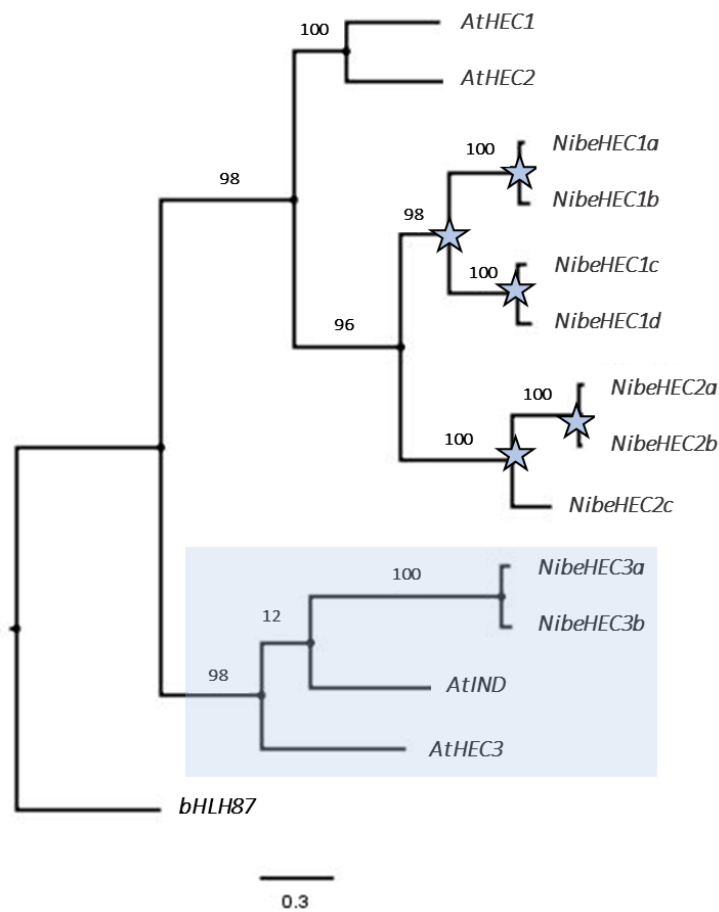


Fig. 10. Resumen del árbol de máxima verosimilitud de los genes *HECATE/INDEHISCENT*. Para esta hipótesis filogenética solo utilizamos las secuencias codificantes de los genes *NibeHECATE1/2/3/* de *N. benthamiana* y los genes *HECATE 1/2/3/INDEHISCENT* de *A. thaliana*. Se utilizó *bHLH87* de *Amborella trichopoda* como grupo externo. La topología recupera la separación entre los clados *HEC1/2* y *HEC3* que es anterior a la diversificación de las Angiospermas, seguida de los eventos de duplicación ocurridos en los clados *HEC1* y *HEC2* (marcados con estrellas), propios del género *Nicotiana*. Los números de rama indican los soportes de BS y la barra indica el número de sustituciones dividido por la longitud de la secuencia.

Nuestros resultados indican que el linaje de *HEC1/2/3/IND* ha sido sometido a distintos eventos de duplicación a lo largo de su historia evolutiva, lo que ha generado diferentes complementos genéticos de cada uno de estos genes en las Angiospermas, principalmente entre la familia Brassicaceae y Solanaceae. En general, las especies de Solanaceae tienen más copias de los genes

HEC1/2 que Brassicaceae, mientras que carecen de ortólogos de *IND*, pero tienen homólogos *HEC3* previos a la duplicación de Brassicaceae.

Expresión de los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* durante el desarrollo de *N. benthamiana*.

Análisis mediante qRT PCR.

Para caracterizar los patrones de expresión de los 9 ortólogos previamente identificados de los genes *HEC1/2/3* en *N. benthamiana* (**Fig.9; 10**) primero realizamos una búsqueda en el atlas de expresión correspondiente (Versión 6) disponible en la página web: <https://sefapps02.qut.edu.au/atlas/tREX6.php>. Aquí recopilan y grafican los patrones de expresión para cada uno de los transcritos para los que se tiene información extraída a partir de análisis transcriptómicos por RNA-seq en los distintos órganos vegetativos y reproductivos de *N. benthamiana*: tallos, ápices, raíces, flores, cápsula, hojas, plántula y callos.

Iniciamos la búsqueda identificando las secuencias codificantes de cada uno de los genes *HEC1/2/3* de *N. benthamiana* (previamente aislados para el análisis filogenético), en la base de datos: *QUT/Nicotiana benthamiana Genome & Transcriptome* (<https://sefapps02.qut.edu.au/>). Utilizando la *Version 6 Gene Expression Atlas*, introdujimos el código de identificación (*Trans ID*) de cada transcrito aislado y copiamos el mapa de expresión (**Tabla Supl. 1; Fig. 11**). La búsqueda arrojó datos conjuntos para la pareja de genes duplicados en los dos subgenomas: *NibeHEC1a-*, *NibeHEC1c-d*, *NibeHEC2a-b* y *NibeHEC3a-b*, y para el único gen *NibeHEC2c* identificado. La correspondencia de cada uno de los códigos de identificación se encuentra en la **Tabla suplementaria 1**.

El mapa grafica el porcentaje de expresión relativa detectado para los diferentes transcritos. En la **figura 11** se compilan estos datos, mostrando que los genes *NibeHEC1* y *NibeHEC2* se expresan principalmente en plántulas y tejidos vegetativos de *N. benthamiana*, siendo prácticamente indetectables en tejidos reproductivos, mientras que los genes *NibeHEC3* se expresan mayoritariamente en los tejidos vegetativos, flores en antesis y frutos (cápsulas) de *N. benthamiana* (**Fig. 11**).

Para corroborar estos datos, analizamos la expresión de los diferentes ortólogos mediante qRT-PCR en plántulas de 3-4 días post- germinación, hojas, botones florales y flores completas en antesis de *N. benthamiana*. Extrajimos el RNA total de cada uno de estos tejidos, a partir de diferentes plantas silvestres de *N. benthamiana* y generamos los cDNAs correspondientes con oligos aleatorios. Para cuantificar los niveles de expresión, diseñamos oligos teniendo en cuenta la proximidad filogenética entre los genes *NibeHEC1/2/3* (**Fig. 9; 10**) y la similitud entre cada par de secuencias codificantes, de modo que detectamos conjuntamente los pares de genes equivalentes de los dos subgenomas: *NibeHEC1a-b*; *NibeHEC1c-d*; *NibeHEC2a-b*, *NibeHEC2c* y *NibeHEC3a-b* (**Tabla Supl. 2; Fig. 11**).

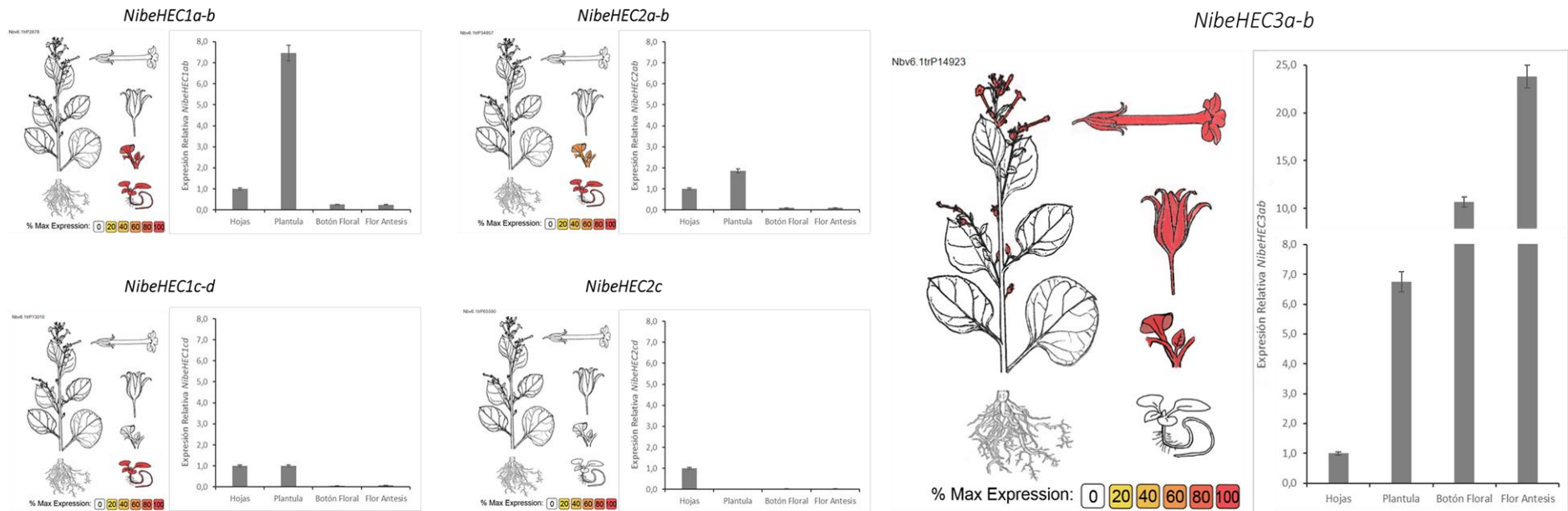


Fig. 11. Análisis de los patrones de expresión de los ortólogos de los genes *HEC1/2/3* en *N. benthamiana*. Se muestra la expresión de los genes *NibeHEC1a-b*; *NibeHEC1c-d*; *NibeHEC2a-b*, *NibeHEC2c* y *NibeHEC3a-b*, teniendo en cuenta su proximidad filogenética. Para cada pareja de genes se muestran, a la izquierda, el atlas de expresión en tallos, ápices, raíces, flores, cápsula (fruto), hojas y plántula; mientras que la derecha se muestran los niveles de expresión mediante qRT-PCR en hojas, plántulas, botones florales y flores en antesis de *Nicotiana*. Nótese como los genes *NibeHEC1/2* se expresan principalmente en los tejidos vegetativos, por el contrario de los genes *NibeHEC3a-b* que además se expresan en flores y frutos de *N. benthamiana*.

Mediante este análisis confirmamos que los genes *NibeHEC1a-b*, *NibeHEC1c-d* y *NibeHEC2a-b* se expresan principalmente en hojas y plántulas 3-4 días después de la germinación, mientras que el gen *NibeHEC2c* se detectó únicamente en hojas de *N. benthamiana* (Fig. 11). En botones florales y flores en antesis también se detectaron cantidades mínimas de los genes *NibeHEC1a-b* y *NibeHEC2a-b* (Fig. 11). A su vez, los genes *NibeHEC3a-b* también se detectaron en hojas y plántulas de *Nicotiana*, aunque su expresión se incrementaba fuertemente en botones florales y flores en antesis. Los niveles de expresión de los genes *NibeHEC3a-b* aumentaban hasta 10 veces respecto a los niveles en tejidos vegetativos en botones florales, y hasta 20 veces en flores en antesis (Fig. 11).

Con estos análisis pudimos determinar que las diferentes copias de los genes *NibeHEC1/2* se expresan principalmente en hojas y meristemos vegetativos de *N. benthamiana*, con una expresión residual en botones florales y flores en antesis, mientras que los genes *NibeHEC3ab*, además de estos mismos órganos, se expresan mucho más abundantemente en flores y frutos de *N. benthamiana* (Fig. 11). Los datos no concordaban exactamente con los reflejados en el atlas de expresión público, probablemente por diferencias en el muestreo, pero si coincidían en mostrar que la expresión de los genes *NibeHEC1/2* estaba principalmente asociada a tejidos vegetativos mientras que la de *NibeHEC3* era mayoritaria en tejidos reproductivos.

Dado que nuestro principal interés era entender el papel de los genes *NibeHEC* en el desarrollo floral y en especial del gineceo de las Angiospermas, y los patrones de expresión analizados indicaban que solo los genes *NibeHEC3* parecían estar asociados al desarrollo reproductivo, decidimos realizar un análisis por hibridación *In situ* para conocer con más detalle los patrones de expresión de los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*.

Análisis por hibridación in situ.

Con los análisis anteriores confirmamos que *N. benthamiana* tiene dos copias del ortólogo de *HEC3*, denominados: *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*. El porcentaje de identidad entre ambas secuencias es el número de coincidencias en cada cien posiciones de nucleótidos y corresponde al 87%, lo que se traduce en un porcentaje de similitud aminoacídica es del 91%. Estos datos fueron extraídos de los alineamientos realizados en MAFFT para las secuencias de los genes de *NibeHEC3* y evidencian el alto grado de homología entre ambos transcritos. (Fig.12; Tabla Supl.2).

Para investigar los patrones de expresión espacio- temporales de los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*, realizamos un análisis de *hibridación de RNA in situ* en meristemos vegetativos y reproductivos de *N. benthamiana*. Específicamente, incluimos botones florales con diferentes estados del desarrollo hasta frutos con 5 días post- antesis. Además, para detectar la expresión de los genes *NibeHEC3* en frutos, utilizamos estadios más avanzados pero previos al comienzo de la lignificación del endocarpo.



Fig. 12. Alineamiento de secuencias de proteínas de AtHEC3/ AtIND de *Arabidopsis* y NibeHEC3a/ NibeHEC3b de *N. benthamiana*. La variación en las escalas de grises refleja el grado de conservación entre los aminoácidos de la misma columna: de menos conservado en gris claro a conservado entre las dos especies en negro.

Para este procedimiento diseñamos una única sonda de RNA que reconociera simultáneamente la región aguas arriba del dominio bHLH de los transcritos de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*, dada la similitud entre ambas secuencias codificantes (Fig. 12). Como control negativo utilizamos la sonda sentido equivalente, con la que no detectamos señal (Fig. 18). Para generar las sondas de RNA, amplificamos un fragmento de 387 pb a partir de cDNA de flores en antesis de *N. benthamiana*.

Los resultados mostraron que los genes *NibeHEC3* se expresaban en etapas tempranas del desarrollo vegetativo, sobre las tres capas indiferenciadas del meristemo (Fig.13A). Durante el desarrollo de la hoja, la expresión de los genes *NibeHEC3* parecía restringirse a la zona donde se diferenciarán los primordios foliares y, posteriormente, hacia la cara adaxial de los primordios foliares (Fig.13B, C; 14A).

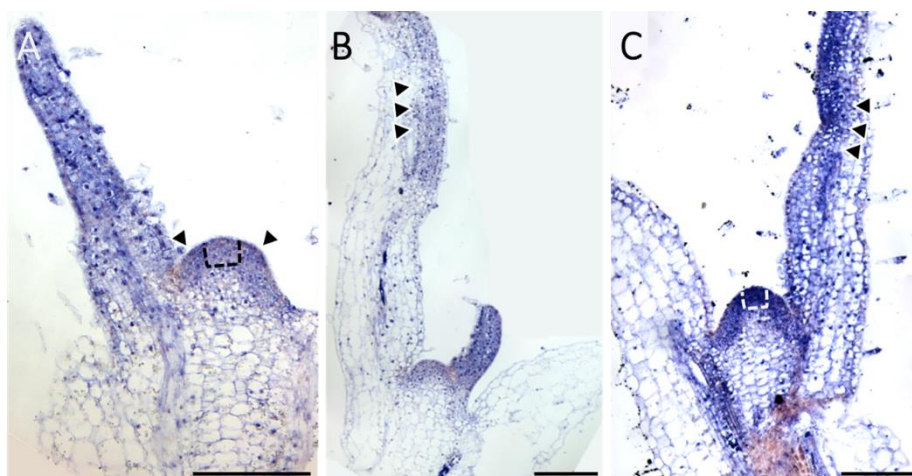


Fig. 13. Análisis de expresión por hibridación *in situ* de los genes *NibeHEC3* en el meristemo vegetativo de *N. benthamiana*. Los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* se expresan en las capas indiferenciadas del meristemo vegetativo. Las flechas señalan la expresión de los genes *NibeHEC3* sobre las zonas que darán lugar a los primordios foliares (en A.) y sobre la cara adaxial de los primordios de hojas (en B, C.). Las líneas punteadas delimitan el meristemo vegetativo. Ecs: 200µm.

Durante el desarrollo floral de *N. benthamiana* los genes *NibeHEC3* se detectaron durante la diferenciación de todos los primordios florales: en sépalos, pétalos, estambres y carpelos (**Fig. 14B-F**). Posteriormente, en el gineceo, previo a la elongación del estilo, los genes *NibeHEC3* se detectaron en la placenta y en la región más distal del carpelo (en el estilo y el estigma); así como en los ápices de los pétalos y en las anteras (**Fig.14F-G**).

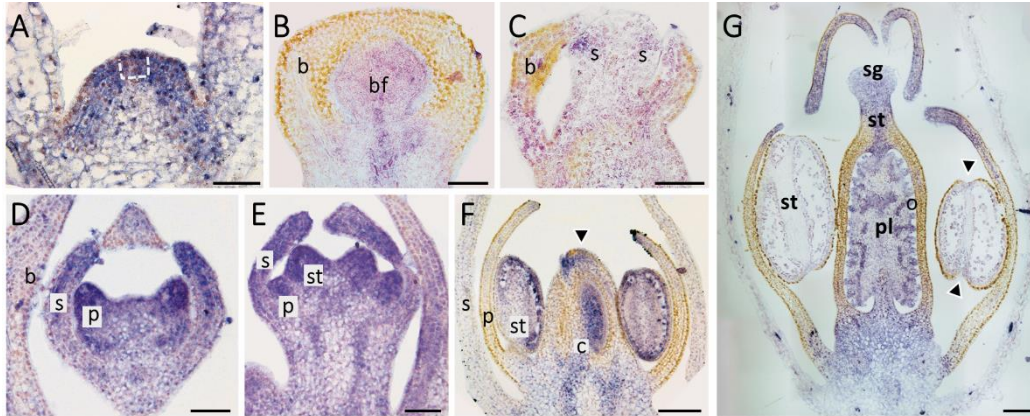


Fig. 14. Análisis de expresión por hibridación *in situ* de los genes *NibeHEC3* en el desarrollo de *N. benthamiana*. **A.** Meristemo Vegetativo. **B-G.** Secciones longitudinales en distintos estadios de meristemos florales durante el desarrollo. Nótese la expresión de los genes *NibeHEC3* previa a diferenciación de cada uno de los órganos florales. Las flechas señalan la expresión de los genes *NibeHEC3* en la región más apical del gineceo (en **F.**) y la zona de dehiscencia de las anteras (en **G.**). Las líneas punteadas delimitan el meristemo vegetativo. **b:** bráctea; **bf:** botones florales; **s:** sépalos; **p:** pétalos; **st:** estambres; **c:** carpelos; **o:** óvulos; **pl:** placenta; **st:** estilo; **sg:** estigma. Esc: **A, C, E-G:** 200µm; **B, D:** 100µm

En el desarrollo del gineceo, la expresión de los genes *NibeHEC3* se detectó sobre la base del gineceo, en los nectarios, la placenta y los óvulos (**Fig.14G**). Más tarde, con la elongación del estilo y la diferenciación de los tejidos de transmisión, estos genes se detectaban claramente a lo largo del tracto de transmisión y la región estilar (**Fig.14G; 15**). Los transcritos de *NibeHEC3* se observaron también sobre la zona de diferenciación de las papilas estigmáticas y la cara interna de las paredes del estilo (tejidos que permiten la elongación de los tubos polínicos), así como también en el interior de las paredes del pistilo, concretamente en el septo y los óvulos (**Fig. 15**). Estos patrones de expresión los detectamos hasta las etapas previas a la antesis durante el desarrollo floral.

En post-antesis, en las primeras etapas del desarrollo del fruto, la expresión de los genes *NibeHEC3* parecía restringirse a las semillas, específicamente sobre la testa (**Fig. 16**). Sin embargo, con los cortes transversales sobre el tercio medio superior del fruto, detectamos que la expresión se mantenía en el septo y la cara interna de las paredes del fruto. Específicamente, detectamos una expresión más abundante en las regiones que posteriormente diferenciarán las zonas de dehiscencia (**Fig. 16A-C**).

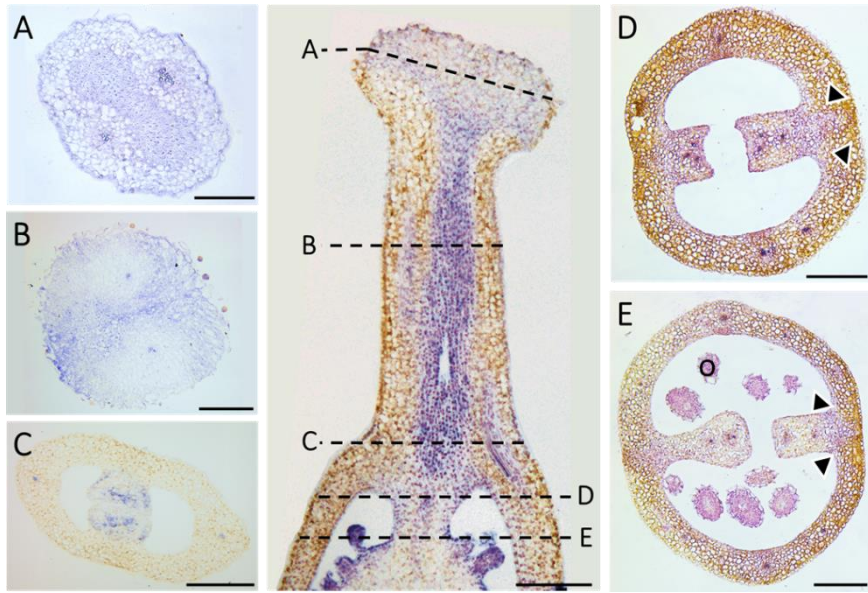


Fig. 15. Expresión de los genes *NibeHEC3* en el gineceo de *N. benthamiana*. En la imagen central de referencia se muestra un corte longitudinal de la región más distal del gineceo en una flor en pre-antesis. Nótese como la expresión de los genes *NibeHEC3* se concentra sobre la región estigmática, donde se proyectarán las papilas estigmáticas y en el estilo, a lo largo de tejido de transmisión del gineceo. Las líneas punteadas indican la correspondencia de las imágenes **A-E** que son los cortes trasversales aproximados de la región más distal gineceo. Las flechas indican la expresión de los genes *NibeHEC3* hacia la cara interna de las paredes del carpelo. **o**: óvulo. Esc: **A, C-E**: 200 μ m; **B**: 100 μ m.

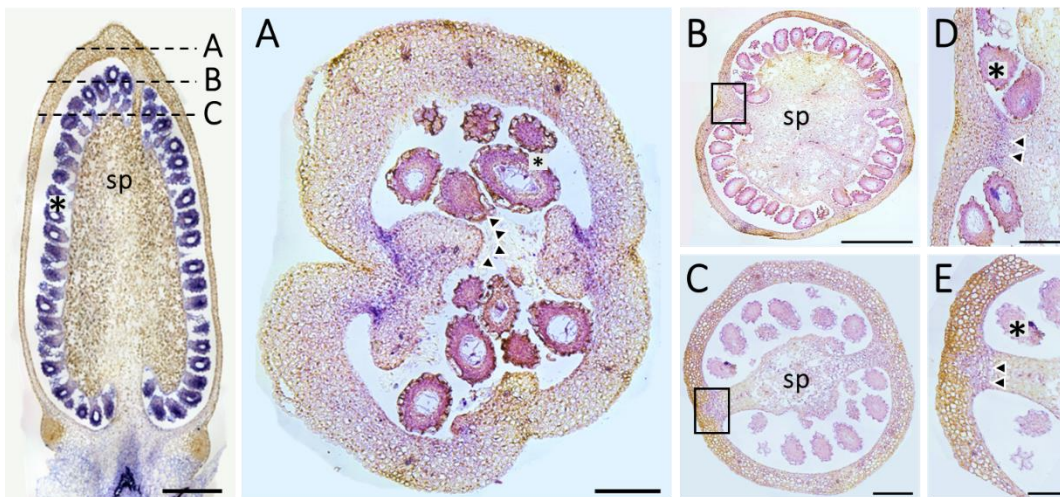


Fig. 16. Expresión de los genes *NibeHEC3* en el fruto *N. benthamiana*. En la imagen de referencia (izquierda) se muestra el corte longitudinal de un fruto de alrededor de 7 días post-antesis donde se detecta la expresión de los genes *NibeHEC3* en semillas. Las líneas punteadas indican la correspondencia de los cortes trasversales aproximados, dirigidos hacia el tercio más distal del fruto de las imágenes **A,B,C**. Nótese como la expresión de los genes *NibeHEC3* se concentra en la cara interna de las paredes del fruto, sobre las zonas de dehiscencia marcadas con las flechas. Los recuadros señalan las zonas de las fotografías aumentadas en **D**. y **E**. que corresponden a las imágenes en **B**. y **C**. respectivamente. Los asteriscos (*) indican las semillas. **sp**: septo. Esc: referencia longitudinal; **B**: 500 μ m; **A,C,D**: 200 μ m; **E**:100 μ m

Otro de los patrones de expresión destacados fue la detección de *NibeHEC3* en las anteras (**Fig.17**). Aquí, durante todo el desarrollo floral, se observó expresión sobre el tejido conectivo, en el interior de los sacos de polen, sobre el tapetum y en las microsporas, además de la zona de diferenciación del estomio (**Fig.17A-B**). Este patrón de expresión se mantuvo en el endotecio hasta la degradación del tejido conectivo y a lo largo de la zona de dehiscencia de las anteras hasta las etapas previas a la antesis de la flor (**Fig.17C-F**).

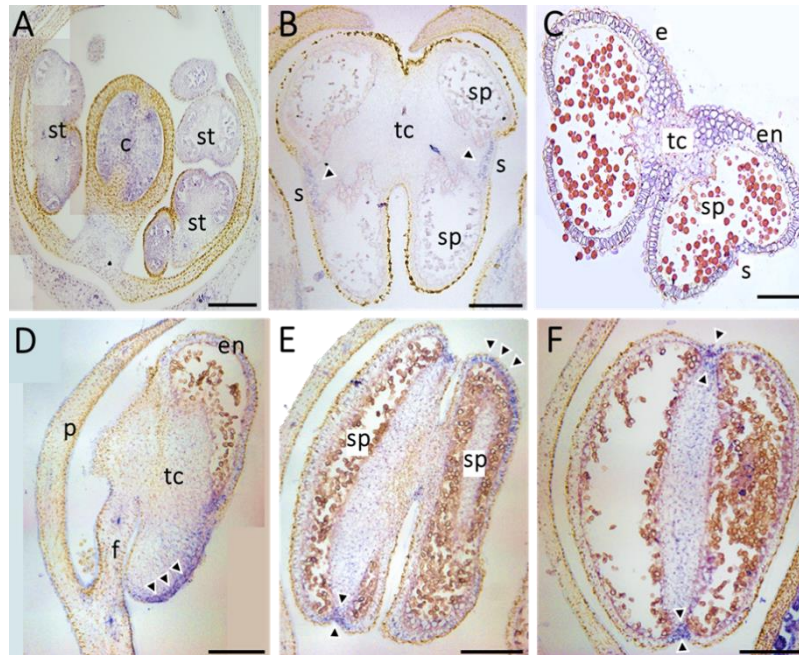


Fig.17. Expresión de *NibeHEC3* en las anteras de *N. benthamiana*. A. Cortes transversales de un botón floral, donde se muestra el carpelo en el centro de la flor rodeado por estambres. B-C. Corte transversal de anteras. D-F. Cortes longitudinales de anteras. Nótese la expresión de los genes *NibeHEC3* en estomio y sobre la margen del endotecio en los diferentes estadios del desarrollo. Las flechas indican el endotecio (en D, E) y el estomio (en B, E, F). p: pétalo; c: carpelo; e: epidermis; en: endotecio; tc: tejido conectivo; sp: saco polínico; s: estomio; f: filamento. Esc: A-F: 200 μ m.

En resumen, los genes *NibeHEC3* se expresan en meristemos vegetativos y durante todo el desarrollo floral, principalmente sobre la región más distal del gineceo, que comprende el estilo y el estigma, además de la zona de dehiscencia de las anteras y el fruto de *N. benthamiana*. Nuestros patrones de expresión contrastan con los reportados para *Arabidopsis*, donde los genes *HEC1/2/3* tienen expresión diferencial durante el desarrollo floral. La expresión de los genes *HEC1/2/3* solapa en estadios tempranos del desarrollo floral de *Arabidopsis*, donde se expresan en los óvulos, en el estigma y el tracto de transmisión en desarrollo (Gremski et al., 2007) y difieren en la expresión de los óvulos donde solo se detectan los genes *HEC1* y *HEC2*, mientras que *HEC3* se mantiene expresado en el tracto de transmisión y en el funículo hasta la antesis, pero no se detecta en el estigma (Gremski et al., 2007).

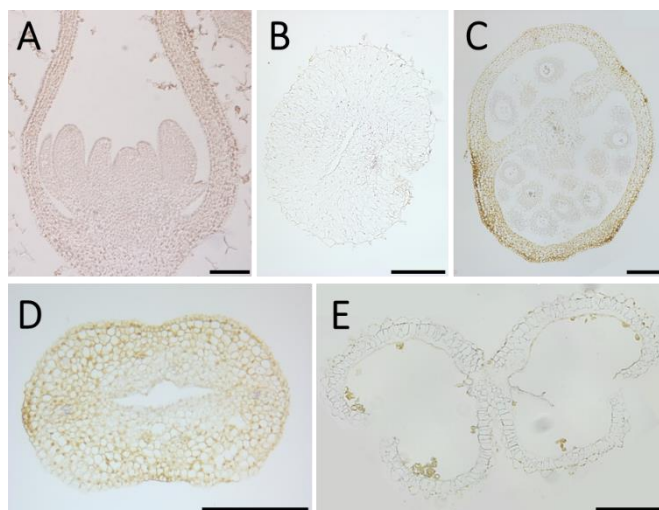


Fig. 18. Control negativo del análisis de expresión por hibridación *in situ* de los genes *NibeHEC3*. Sonda sentido (*sense*) de los genes *NibeHEC3* que no muestra señal en ninguno de los tejidos probados. **A.** corte longitudinal de un botón floral, **B-E:** cortes transversales del estilo (en **B, D.**), fruto (en **C.**) y anteras (en **E.**). Esc: 200 μ m.

Identificación de los mutantes: *Nibehec3*-CRISPR/ *Nibehec3*-TRV

El objetivo principal de esta tesis doctoral es desarrollar una hipótesis evolutiva y funcional que nos permita entender el papel de los genes *HEC*, previos a la diversificación de las Brassicaceae, en la evolución morfo-anatómica del gineceo y fruto de las Angiospermas. Puesto que los genes *NibeHEC3* son los únicos representantes del linaje que parecen expresarse significativamente en tejidos reproductivos, decidimos restringir este estudio a la caracterización funcional de dichos ortólogos de *HEC3* en la eudicotiledónea *N. benthamiana*.

Utilizamos dos tipos de metodologías que nos permitieran determinar su función biológica, generando cambios fenotípicos producto del silenciamiento transitorio o la mutación estable de los genes *NibeHEC3*: Silenciamiento Genético Inducido por Virus (VIGS; Dong et al., 2007) y el sistema CRISPR-Cas9 adaptado a la herramienta multiplexing de GoldenBraid (GB; Vazquez- Vilar 2016).

Silenciamiento Genético Inducido por Virus (VIGS)

El VIGS es un método rápido y eficiente de explorar la función de un gen, ya que permite evaluar las consecuencias de su pérdida de función a través de la reducción transitoria de los mRNA específicos del mismo (Dong et al., 2007). El VIGS ha sido ampliamente utilizado para la caracterización funcional en numerosas especies de Angiospermas incluida *N. benthamiana* (Dong et al., 2007). Así, en la primera fase de este trabajo, utilizamos VIGS para realizar la caracterización funcional de los genes *NibeHEC3* de modo preliminar.

VIGS utiliza un vector viral TRV, al cual le insertamos un segmento (349pb) de la secuencia codificante de los genes *NibeHEC3* ubicada aguas arriba del dominio bHLH. Dado que las

secuencias codificantes de los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* se corresponden con una identidad del 91% generamos una única construcción TRV2, diseñada para reducir simultáneamente los niveles de ambos transcritos en plantas de *N. benthamiana*.

Para la amplificación del segmento, diseñamos oligos que reconocieran ambas secuencias de *NibeHEC3* y los amplificamos a partir de cDNA de flores en antesis. En el vector LIC-TRV2 (pYY13; Dong et al., 2007) clonamos el segmento amplificado, generando el vector de silenciamiento: LIC-TRV2:*NibeHEC3*. Éste, junto con su vector de expresión TRV1 (pYL192; Liu et al., 2002), se infiltró sobre la superficie abaxial de las hojas de 30 plántulas silvestres (en dos rondas de 15 plántulas cada una) de *N. benthamiana*, que se denominaron: *Nibehec3*-VIGS. Adicionalmente se infiltraron 10 plántulas silvestres con los controles TRV1+TRV2-LIC:*PDS*, como control positivo de transformación, y TRV1 +TRV2:vacio como control negativo. Además, 20 plántulas no tratadas se cultivaron bajo las mismas condiciones de crecimiento. El montaje experimental se realizó en dos rondas con la mitad del material descrito en cada tratamiento. A todas las plantas se les hizo un seguimiento durante 8 semanas y para su caracterización fenotípica se utilizaron entre 8-12 flores de cada planta.

En las flores de *Nicotiana benthamiana* en antesis, después de la apertura del limbo, se distinguen todos sus órganos fértiles a la altura de éste: cinco estambres cuyo filamento está fusionado completamente al tubo en toda su longitud, y un gineceo bicarpelar situado en el centro del cuarto verticilo, que comprende un ovario bilocular corto con una placenta central y un estilo largo y fino, de alrededor de 3 cm de longitud, que finaliza en un estigma con morfología radial (Chase et al.,2022).

En las plantas tratadas *Nibehec3*-VIGS, el 88% de las flores analizadas mostraron cambios fenotípicos en comparación con las plantas no tratadas (**Tabla 1**). Algunas de estas plantas tenían un estilo más corto en comparación con las no tratadas, lo que causaba que en una vista distal de las flores en antesis *Nibehec3*-VIGS, el estigma no fuera visible a la altura del limbo, rodeado por las anteras (**Fig.19A-B**). Al comparar el tamaño del estilo con el de las plantas silvestres, observamos una reducción aproximada de un 1/3 de longitud en la región estilar en las plantas *Nibehec3*-VIGS al compararlo con las no tratadas (**Fig.19C**), aunque en general, los estilos no mostraban alteraciones evidentes en su morfología. Algunos gineceos *Nibehec3*-VIGS mostraron cambios en la morfología del estigma con respecto a las plantas silvestres, bien por una inserción anormal del estigma en el estilo (**Fig.19D-G**) o bien por mostrar cavidades o fusión apical incompleta (**Fig.19G**).

Construcción VIGS	Nº plantas inoculadas (muertas)	Nº plantas con Fenotipo	Nº flores/plantas observadas	Nº flores/planta con fenotipo	Nº total de flores con fenotipo	%flores con fenotipo
<i>TR1+LicTRV2:NibeHEC3</i> <i>Nibehec3</i> -VIGS	30 (5)	25	8-12	6-10	264/300	88%
<i>TR1+LicTRV2:PDS</i> control positivo	13(2)	11(85%)*	10	10	0	0
<i>TR1+LicTRV2:Vacio</i> control negativo	14(1)	0	5	0	0	0

Tabla 1. Frecuencias obtenidas tras el tratamiento VIGS en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

*: plantas con sectores blancos, consecuencia del silenciamiento del gen *PDS*.

Tanto *N. benthamiana* como *Arabidopsis* tiene frutos secos dehiscentes. En *Arabidopsis* el gen *IND* es necesario para la correcta diferenciación de la zona de dehiscencia del fruto (Liljegren et al., 2004). Por otro lado, los análisis filogenéticos indican que *IND* es un parálogo de *HEC3* presente únicamente en la familia Brassicaceae (Kay et al., 2013; Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017). Dado que *N. benthamiana* desarrolla frutos secos dehiscentes, pero no tiene ortólogo de *IND*, nos preguntamos si los genes *NibeHEC3*, que además se expresan en los frutos, son necesarios para la diferenciación de la zona de dehiscencia en *N. benthamiana*, como lo hace *IND* en *Arabidopsis*.

Como se mencionó anteriormente, las plantas *Nibehec3*-VIGS tenían claros defectos morfológicos en la región más distal del gineceo y, en consecuencia, las plantas *Nibehec3*-VIGS producían pocos frutos con un bajo número de semillas, probablemente a partir de aquellos con fenotipo menos severos, que si parecían abrirse al final del desarrollo. Esto podía interpretarse como que *NibeHEC3* no era necesario para la dehiscencia del fruto, pero también podía ocurrir que en esas plantas la expresión residual de *NibeHEC3* podía ser suficiente para dirigir la diferenciación de la zona de dehiscencia. Así, indujimos partenocarpia por tratamiento hormonal en flores *Nibehec3*-VIGS con efectos fenotípicos severos. Tras este tratamiento, los frutos silvestres se desarrollaron normalmente y son dehiscentes mientras que los frutos *Nibehec3*-VIGS eran indehiscentes, incluso semanas después su madurez (Fig.19H-I).

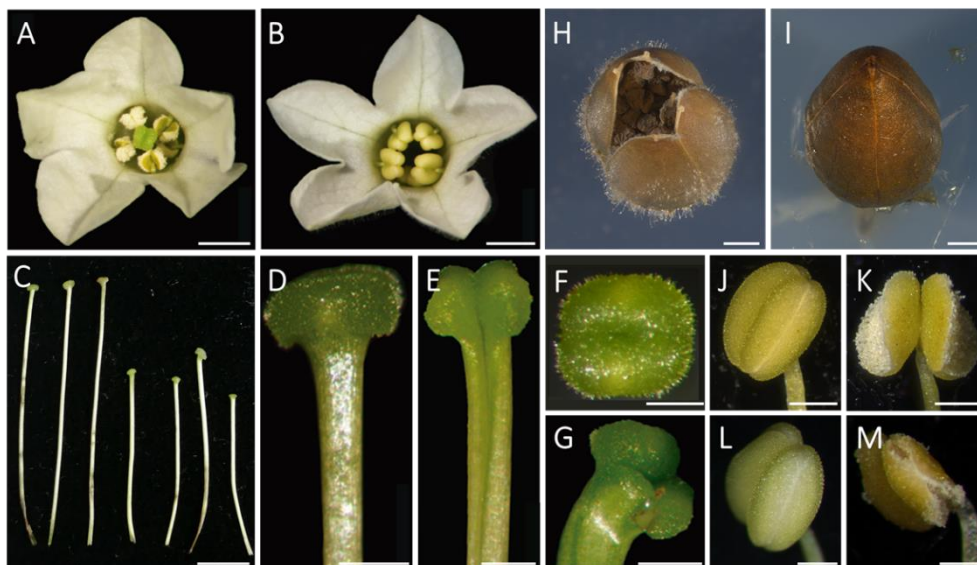


Fig. 19. Fenotipo de las plantas *Nibehec3*-VIGS en las flores de *N. benthamiana*. A-B. Vista superior de las flores en antesis de las plantas silvestres (en A.) y tratadas con VIGS (en B.). C. Comparación de la longitud de los estilos silvestre (a la derecha) y plantas tratadas (en la izquierda). D. Vista frontal del estigma silvestre, nótese la morfología de disco y la proyección de las papilas estigmáticas. E. Vista frontal del estigma en plantas tratadas con VIGS. Se observan los cambios morfológicos asociados a la fusión incompleta del estilo y el estigma. F-G. Vista superior del estigma silvestre (en F.) y plantas tratadas (en G.). H. Fruto seco dehiscente de *N. benthamiana* silvestre. I. Fruto indehiscente de las plantas *Nibehec3*-VIGS. J-K. Anteras de las plantas silvestres previas a la antesis (en J.) y en antesis (en K.). Se muestra la apertura completa del estomio para la liberación de los granos de polen. L-M. Anteras de las plantas tratadas con VIGS en pre-antesis (en L.) y post-antesis (en M.). Nótese como las anteras de las plantas tratadas con VIGS (en B, M.) se mantienen indehiscentes hasta después de la antesis de la flor. Esc: A-C: 5mm; D-G: 500µm; H-I: 1mm; J-M: 500µm

Un fenotipo inesperado que observamos en las flores de *Nibehec3*-VIGS fueron anteras parcialmente indehiscentes. En las flores silvestres las anteras se abren a través del estomio para liberar los granos de polen durante la apertura del limbo (**Fig.19A-B; J-M**; Chase et al.,2022). Sin embargo, en las flores *Nibehec3*-VIGS las anteras mostraron diferentes grados de apertura. En las flores con fenotipo más severo, las cinco anteras de las flores *Nibehec3*-VIGS permanecían cerradas pasada la antesis (**Fig.19B**). En los casos moderados, una o dos anteras eran total o parcialmente dehiscentes, y las flores que presentaban fenotipos más leves tenían entre tres o cuatro anteras total o parcialmente dehiscentes (**Fig.19M**).

En resumen, las plantas *Nibehec3*-VIGS parecen exhibir fenotipos en la región más distal del gineceo, posiblemente asociado a los defectos de fusión observados en el estilo y el estigma. De igual manera, estas plantas poseen anteras y frutos indehiscentes, lo que podría asociar a los genes *NibeHEC3* con la formación y diferenciación de las zonas de dehiscencia de anteras y frutos.

Para evaluar la eficiencia del silenciamiento en las plantas *Nibehec3*-VIGS y correlacionar que los cambios observados eran producto de la reducción de los genes *NibeHEC3*, evaluamos los niveles de ambos transcritos a partir de cDNA extraído de los gineceos de flores en antesis que presentaban cambios morfológicos evidentes con respecto a los de plantas no tratadas.

Dado que la similitud aminoacídica es del 91% entre las secuencias de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*, el fragmento utilizado para el VIGS debía dirigir el silenciamiento de ambos, y por tanto cuantificamos los niveles de los dos transcritos simultáneamente, diseñando oligos que amplificaran hacia la región 3' del dominio bHLH, fuera de la región utilizada en el vector LIC-TRV2:*NibeHEC3*, verificando por otro lado la presencia del vector TRV1 como control de transformación. Los resultados obtenidos mediante RT-PCR y qRT-PCR mostraron que los niveles transcripcionales de los genes *NibeHEC3* estaban reducidos en las plantas *Nibehec3*-VIGS en comparación con las plantas tratadas con el vector TRV2:Vacio (**Fig.20**). Esto indica que el tratamiento fue eficiente y que la reducción en los niveles de expresión de los transcritos *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* podría estar asociada a los cambios fenotípicos observados en las flores de *Nibehec3*-VIGS.

Estos datos preliminares nos permiten general hipótesis acerca de la historia funcional de los genes *HEC3* previos a los eventos de duplicación ocurridos en Brassicaceas, donde estos genes podrían estar asociados a la correcta formación del estilo, el estigma y la formación de la zona de dehiscencia en anteras y frutos. Sin embargo, para probar esta hipótesis, nos interesaba tener mutantes estables de pérdida de función que nos permitieran confirmar los fenotipos anteriormente descritos y definir la contribución de cada uno de los genes *NibeHEC3* en el desarrollo de *N. benthamiana*. Por ello, decidimos complementar este análisis funcional utilizando el sistema CRISPR-Cas9 adaptado por GB (Vazquez- Vilar 2016).

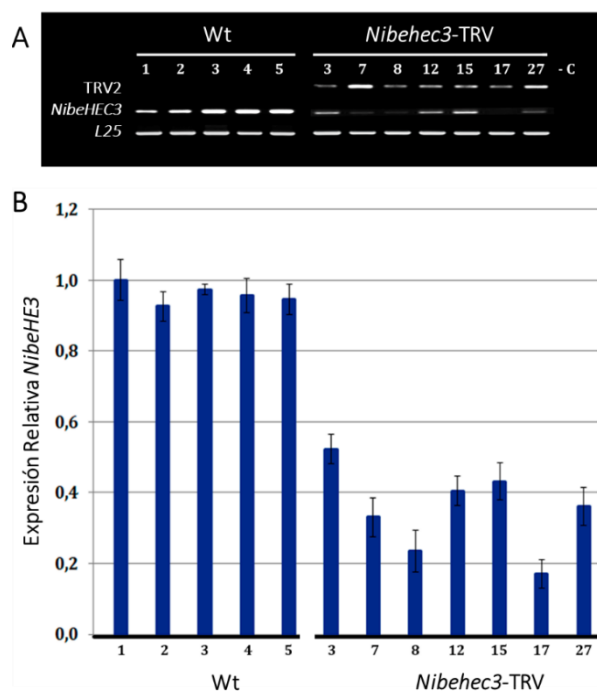


Fig. 20. Identificación de las plantas *NibeHEC3*-VIGS. A-B. Comparación de los niveles de expresión de *NibeHEC3* de plantas silvestres y tratadas por VIGS, mediante RT-PCR semicuantitativa (en **A.**) y qRT-PCR (en **B.**) utilizando cDNA de gineceos que exhibían cambios morfológicos en relación con los gineceos de plantas no tratadas. Los números corresponden a los individuos analizados. Los valores son la media y la desviación estándar de tres réplicas técnicas (en **B**). Se utilizó el gen *Factor de Elongación (L25)* como control endógeno.

Sistema CRISPR-Cas9 adaptado a la herramienta multiplexing de GoldenBraid

Iniciamos esta nueva aproximación funcional utilizando el sistema CRISPR gRNA-Cas9 mediado por t-DNA y adaptado a la herramienta *multiplexing* de GoldenBraid (GB; Vasquez-Vilar et al., 2016). La construcción *multiplexing* denominada: $\Omega 1:NibeHEC3$ -CRISPR, está compuesta de varias unidades transcripcionales, todas con promotor pCaMV35S: nptII, para selección positiva de Kanamicina; Cas9, para dirigir la edición del genoma; DsRed, utilizado como marcador de selección positiva adicional en T0 y como marcador de detección del transgén en T1; tres guías de gRNA, *gNibeHEC3a-5'*, *gNibeHEC3b-5'* y *gNibeHEC3ab-3'*, dirigidas al reconocimiento de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*, con una guía adicional que reconoce simultáneamente los genes *NibeHEC3ab*. El nombre de las guías hace referencia a la posición dentro de la secuencia codificante de los genes *NibeHEC3* (**Fig.21**).



Fig. 21. Construcción final para la edición de las gRNA utilizado el sistema CRISPR-Cas9 adaptado a GoldenBraid (GB). Esta construcción contiene las gRNA dirigidas al reconocimiento de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* en *N. benthamiana*. Las flechas indican la dirección de la transcripción del promotor (forma de *L* invertida) y la secuencia codificante, la T hace referencia la terminador de la transcripción. Figura tomada y adaptada de Vasquez-Vilar et al., 2021

La transformación se realizó en explantes de hoja de *N. benthamiana* y la regeneración organogénica se hizo *in vitro* siguiendo la metodología de disco foliar (Wang 2006). De los 40 brotes regenerados en T0, 9 no eran resistentes para la selección NptII, DsRed; y de los 31 restantes diferenciamos dos grandes poblaciones que presentaban cambios fenotípicos durante el desarrollo floral en comparación con las plantas silvestres:

- (1) Esta población tenía un desarrollo vegetativo normal, al compararlo con las plantas silvestres. Durante el desarrollo reproductivo, las flores alcanzaban la expansión completa de todos sus órganos y se desarrollaban hasta la antesis, donde comenzaba la senescencia floral producto de la no fertilización completa del ovario. Durante la antesis, las flores exhibían cambios fenotípicos similares a los observados en las plantas *Nibehec3-VIGS*: anteras indehiscentes, defectos en la elongación del estilo y en la morfología del estigma (**Fig. 22A-F**).
- (2) La segunda población parecía tener un desarrollo vegetativo más lento, en comparación con las plantas silvestres. Eran plántulas más pequeñas que no alcanzaban la expansión completa de sus hojas. La mayoría de las flores que producían abortaban antes de llegar a la antesis, es decir, no alcanzaban la expansión completa de todos sus órganos, por lo que se aceleraba su senescencia. Aun así, las flores jóvenes compartían algunos de los fenotipos descritos para la población 1, además de tener pétalos más cortos. Este fenotipo parecía estar asociado a una elongación más lenta de los pétalos durante el desarrollo floral, lo que causaba la contracción del estilo o que este sobresaliera de los pétalos (**Fig.22G-L**)



Fig. 22. Comparación fenotípica de las poblaciones *NibeHEC3a*-CRISPR. **A.** Secuencia en el desarrollo de *N. benthamiana* silvestre. Se muestra la elongación progresiva de los pétalos y como estos mantienen protegidos los órganos fértiles de la flor hasta la antesis. **B.** Gineceo silvestre en antesis a escala con **A**. El estilo se extiende completamente a través del tubo hasta la apertura completa del limbo. **C.** Morfología del estigma silvestre. **D.** Anteras dehiscentes de flores silvestres en antesis. **E-F.** Fenotipos de la *población 1*. Se muestra la elongación de los pétalos hasta la antesis donde se exponen las anteras indehiscentes y un estilo más corto (en **E.**) con cambios morfológicos en el estigma (en **F.**). **G-L.** Fenotipos de los miembros de la *población 2*. **G.** Flores previas a la antesis con fenotipo de pétalos cortos. Se muestra como el estilo sobresale por encima de los pétalos. **H.** Estilo contraído producto de la elongación más lenta de los pétalos durante el desarrollo floral. Además de cambios morfológicos en el estigma (en **I.**) y anteras indehiscentes (en **J.**). **K-L.** Flores abortadas de la *población 2*, producto de los defectos en el desarrollo. Esc: **A, B, E:** 5mm; **C, F, I:** 500 μ m; **D, G, H, J-L:** 1mm

Teniendo en cuenta la naturaleza clonal de estas transgénicas y que los brotes son producto de un proceso cíclico de dediferenciación celular que puede dar lugar a la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas, decidimos hacer un análisis de ploidía a 5 individuos de cada población. Detectamos que la *población (2)* con fenotipo de pétalos cortos era octaploide, por lo que no se siguió considerando para los análisis posteriores. Así, los siguientes datos descriptivos acerca de la caracterización funcional de *NibeHEC3* se realizaron sobre la *población (1)*, que es alotetraploide, igual que las plantas silvestres de *N. benthamiana* y la que denominamos: *NibeHEC3-CRISPR*

Identificación de los alelos mutantes de *N. benthamiana*.

A los 10 explantes que sobrevivieron a la regeneración (población *NibeHEC3-CRISPR T0*) y que presentaba cambios morfológicos con respecto al silvestre se les extrajo DNA genómico de hojas y amplificamos un segmento mixto por PCR que contenía las regiones codificantes de los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* simultáneamente. Dado la similitud entre ambas secuencias, fue difícil diferenciarlas mediante el diseño de oligos específicos para cada gen, por tanto, diseñamos digestiones del DNA con enzimas de restricción dirigidas a seleccionar cada uno de los genes por separado. Así, al producto de PCR mixto (que en principio era resultado de la amplificación de los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*) se digirió independientemente con *SpeI* para seleccionar un segmento de DNA que contenía la secuencia codificante de *NibeHEC3a* y de igual modo, se realizó para seleccionar el gen *NibeHEC3b*, al digerirlo con *XmnI*. Ambos segmentos así diferenciados fueron purificados independientemente y enviados a secuenciar. Por un lado, revisamos manualmente el resultado completo de la secuenciación utilizando la plataforma CRISPR-ID version1.1 (<http://crispid.gbiomed.kuleuven.be/>), alineándolo con la secuencia de cada gen independientemente, con el fin de identificar mutaciones en las secuencias codificantes adyacentes a las gRNA utilizadas. Por otra parte, comparamos los cromatogramas entre las plantas silvestres y las plantas *Nibehec3-CRISPR* secuenciadas, utilizando la plataforma Synthego V3 (<https://ice.synthego.com>) (**Fig.23**). Con ambas formas de análisis únicamente detectamos inserciones de un par de bases (+1) sobre la guía g*NibeHEC3a-5'*, dirigida a la mutación del gen *NibeHEC3a*.

A continuación, se muestran los resultados compilados para cada uno de genotipos obtenidos a partir de diferentes explantes.

No. Planta	g <i>NibeHEC3a-5'</i>	g <i>NibeHEC3b-5'</i>	g <i>NibeHEC3ab-3'</i>		Genotipo
			g <i>NibeHEC3a-3'</i>	g <i>NibeHEC3b-3'</i>	
3	<i>3a-1/3a-2</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/hec3a-2/HEC3b</i>
11	<i>3a-1/+</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/HEC3a-2/HEC3b</i>
12	<i>3a-1/+</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/HEC3a-2/HEC3b</i>
20	<i>3a-1/3a-2</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/hec3a-2/HEC3b</i>
22	<i>3a-1/3a-2</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/hec3a-2/HEC3b</i>
25	<i>3a-1/+</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/HEC3a-2/HEC3b</i>
28	<i>3a-1/3a-2</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/hec3a-2/HEC3b</i>
30	<i>3a-1/3a-2</i>	Wt	Wt	Wt	<i>hec3a-1/hec3a-2/HEC3b</i>
33	<i>+/3a-2</i>	Wt	Wt	Wt	<i>HEC3a-1/hec3a-2/HEC3b</i>
43	<i>+/3a-2</i>	Wt	Wt	Wt	<i>HEC3a-1/hec3a-2/HEC3b</i>

Con nuestro análisis encontramos mutaciones (+1) sobre la guía gNibeHEC3a-5', en la posición 189pb (63aa) del gen *NibeHEC3a*. Algunas plantas presentaban mutaciones bialélicas con una inserción de una timina (+T) en un cromosoma, alelo que denominamos *Nibehec3a-1* (CCCACCACCATCCTCCCTC), y con una inserción de adenina (+A) en el otro cromosoma, que denominamos alelo *Nibehec3a-2* (CCCACCACCAACCTCCCTC) (**Fig. 24**). Estos cambios afectan de un modo muy similar a la secuencia predicha de las proteínas resultantes NibeHEC3a-1 y NibeHEC3a-2: la posición 63aa de la proteína silvestre NibeHEC3a corresponde al aminoácido leucina (Leu, L), mientras que en la proteína predicha para el alelo *Nibehec3a-1* hay un cambio de este aminoácido por una prolina (Pro, P) y en la proteína predicha para el alelo *Nibehec3a-2*, cambia por una glutamina (Gln, Q) en esa misma posición. Además, la inserción en ambos alelos de un nucleótido adicional genera un cambio de la pauta de lectura que produce una proteína truncada sin el dominio bHLH y de tan solo 82 aminoácidos (**Fig. 24**).

Dado que estas mutaciones se generan en la misma posición y causan prácticamente el mismo producto proteico, los consideramos como equivalentes a los efectos de la edición de *NibeHEC3a*, las cuales en adelante se considerarán homocigotas mutantes para el gen *NibeHEC3a*, independientemente de que portarán el alelo *Nibehec3a-1* o el *Nibehec3a-2*. Por otro lado, en la secuencia codificante del gen *NibeHEC3b*, para todas las plantas analizadas, no detectamos mutaciones en ninguna de las guías utilizadas, indicando que la edición genética de este locus no había sido eficiente, por lo que la caracterización funcional la realizamos con distintas plantas *Nibehec3-CRISPR* portadoras del genotipo (T0): *Nibehec3a -/-* y *NibeHEC3b +/-*.

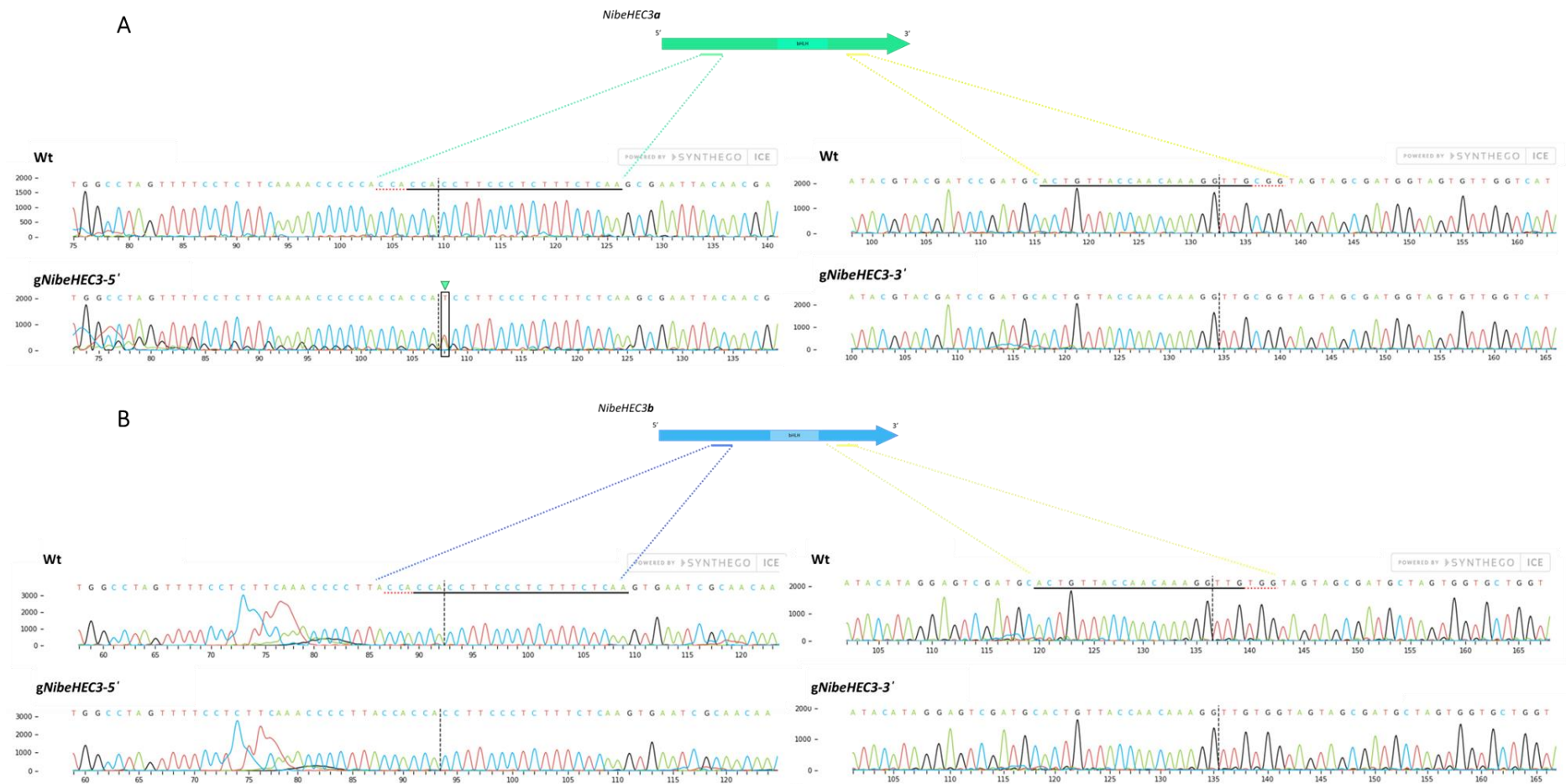


Fig.23. Identificación del mutante *NibeHEC3a*- CRISPR. Comparación las secuencias de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*, donde se muestran los cromatogramas de las plantas silvestres y las plantas *Nibehec3*-CRISPR, utilizando la plataforma Synthego V3. Nótese la posición de las gRNA flanqueando el dominio bHLH. Guía de g*NibeHEC3- 5'* en verde, corresponde al gen de *NibeHEC3a* (en **A.**); g*NibeHEC3- 5'* en azul de *NibeHEC3b* (en **B.**) y g*NibeHEC3ab-3'* es común para ambas secuencias de *NibeHEC3* en amarillo. El triángulo señala la inserción (+1) detectada en *NibeHEC3a* (en **A.**)

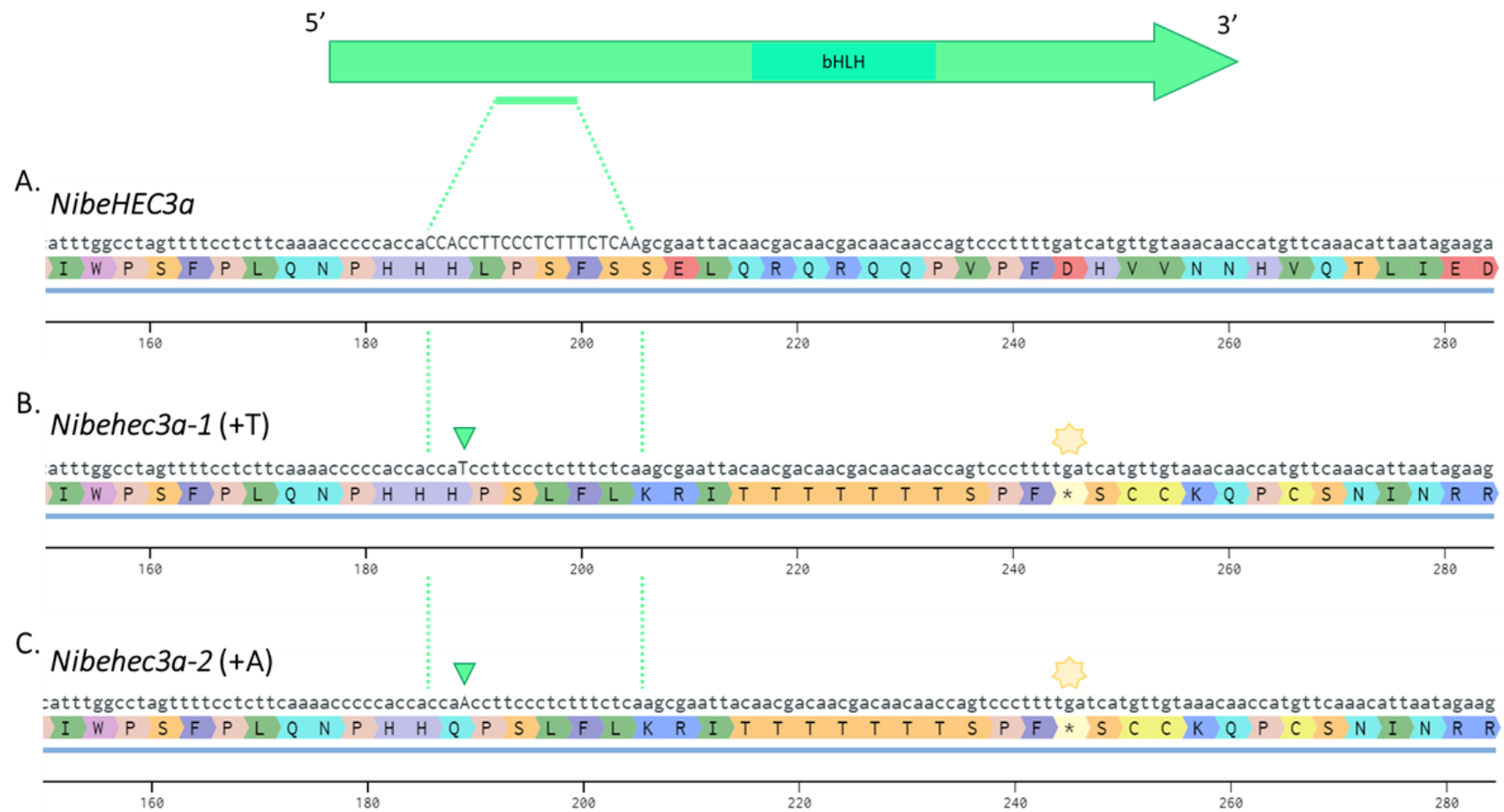


Fig. 24. Cambios en la secuencia de *NibeHEC3a*- CRISPR. Los cambios en la secuencia proteica de *NibeHEC3a* son producto de una mutación bialélica, que cambia el marco de lectura, dado a la inserción (+1) diferencial sobre la guía g*NibeHEC3*- 5'. **A.** Secuencia silvestre de *NibeHEC3a*. En mayúsculas se diferencia la secuencia de g*NibeHEC3*- 5'. **B.** alelo 1 de *NibeHEC3a* donde se detecta una inserción de timina (+T). **C.** alelo 2 de *NibeHEC3a* con una inserción de adenina (+A). Las líneas puntadas delimitan las secuencias de g*NibeHEC3*- 5'. El triángulo señala las inserciones en la posición 89pb de la g*NibeHEC3*- 5'. La estrella, el codón de parada prematuro.

Caracterización Funcional del Ortólogo de *HEC3* en *Nicotiana benthamiana*

NibeHEC3a es necesario para el correcto desarrollo del gineceo de *N. benthamiana*.

Realizamos la caracterización fenotípica de las plantas transgénicas de *N. benthamiana* que portaban una mutación bialélica en el gen *NibeHEC3a* y que denominamos: *Nibehec3a*-CRISPR. Para el análisis fenotípico colectamos entre 10-15 flores aleatoriamente de cada una de las plantas transgénicas, en T0, portadoras de la mutación bialélica y con genotipo *Nibehec3a* -/- *NibeHEC3b* +/+. Estas observaciones revelaron que, a pesar de que todas las plantas analizadas portaban la misma mutación estable, no todas las flores *Nibehec3a*-CRISPR mostraban la misma severidad en sus alteraciones fenotípicas.

El seguimiento de los cambios observados se realizó durante 10 semanas, registrándose en el material en fresco haciendo fotografías. Por otro lado, parte del material fue colectado con distintos fines: Colectamos material para genotipar y realizar el análisis de las secuencias; separamos muestras para fijarlas y verificar la integridad de los tejidos, para realizar análisis histológicos mediante coloraciones diferenciales y para la observación más detallada de la superficie celular utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM). Todo el material fue colectado en paralelo con su respectivo homólogo silvestre para permitir la comparación entre fenotipos.

Como se ha descrito en el apartado de introducción, la flor de *N. benthamiana* es completa y se compone de cuatro verticilos concéntricos: sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Los pétalos son blancos, están fusionados entre sí a lo largo del tubo y permanecen libres en el limbo. Los cinco estambres están fusionados por el filamento al tubo. En el centro, se encuentran los dos carpelos fusionados, donde se distingue un largo estilo y el estigma, formado por dos lóbulos con numerosas papilas estigmáticas (Chase et al., 2022).

Durante el desarrollo floral y hasta antes de la antesis, en las plantas *Nibehec3a*-CRISPR no se observaron cambios morfológicos evidentes en los verticilos estériles de la flor (**Fig. 25A, D**). Sin embargo, durante la antesis, la apertura del limbo permitía distinguir dos cambios fenotípicos en comparación con las plantas silvestres: El estigma no sobresalía a la altura del limbo en el centro de la flor y los estambres eran indehiscentes (**Fig. 25B-C, E-F**).

Las flores *Nibehec3a*-CRISPR mostraron cambios fenotípicos en la formación del gineceo en comparación con las plantas silvestres. El fenotipo más habitual (~93%) fue la reducción de la longitud del estilo, hasta un 40% más corto en comparación con el silvestre (**Fig. 25G-I**). En algunas de las flores con este fenotipo, el estilo parecía girar sobre sí mismo con respecto al eje de crecimiento. Además, se observaban cambios en la morfología del estigma y una reducción en el tamaño de las papilas estigmáticas en comparación con la morfología de disco del estigma silvestre (**Fig. 26B-C; E-H**). En otros casos más severos, es de resaltar que la región del estigma estaba completamente ausente en el mutante *Nibehec3a*-CRISPR, es decir, en algunas flores mutantes no podía distinguirse la región estigmática de la porción estilar, dado que no había una clara diferenciación celular entre ambas porciones del gineceo, y era clara la ausencia total de papilas estigmáticas (**Fig. 26E-H**). Este fenotipo recuerda al mutante triple *hec1 hec2 hec3* de *Arabidopsis*, el cual carece completamente de estigma (Gremski et al., 2007). Igualmente, algunos

de los gineceos tenían defectos en la fusión de su región más distal, en el estilo y el estigma, que estaban parcialmente separados en dos partes (Fig.26. D, E).

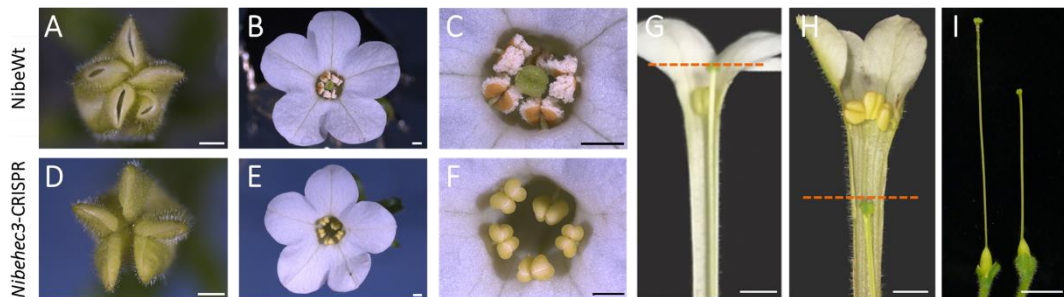


Fig. 25. Fenotipo de *Nibehec3a*-CRISPR en el gineceo de *N. benthamiana*. A-C. Flor silvestre de *Nicotiana* en pre-antesis (en A.) y antesis (en B-C.), aquí, pueden observarse los pétalos libres, las cinco anteras dehiscentes y el estigma en el centro del limbo. C, F. Fotografías aumentadas del centro de la flor, que muestra la posición concéntrica de los verticilos fértiles de la flor: silvestre (en C.) y mutante *Nibehec3*-CRISPR (en F.). D-E. Flor mutante *Nibehec3*-CRISPR en pre-antesis (en D.) y antesis (en E-F.). En antesis, nótese las anteras indehiscentes y la ausencia del estigma en el centro del limbo. G-H. Fotografía de un corte transversal de una flor en antesis del silvestre (en G.) y el mutante *Nibehec3*-CRISPR (en H.). La línea punteada amarilla muestran la elongación del estilo. I. Fotografía comparativa del gineceo en antesis de *N. benthamiana*: silvestre (a la izquierda) y mutante *Nibehec3*-CRISPR (a la derecha), aquí se evidencia la reducción en la longitud del estilo del mutante *Nibehec3*-CRISPR. Esc: A-F: 1mm; G-I: 0,5cm

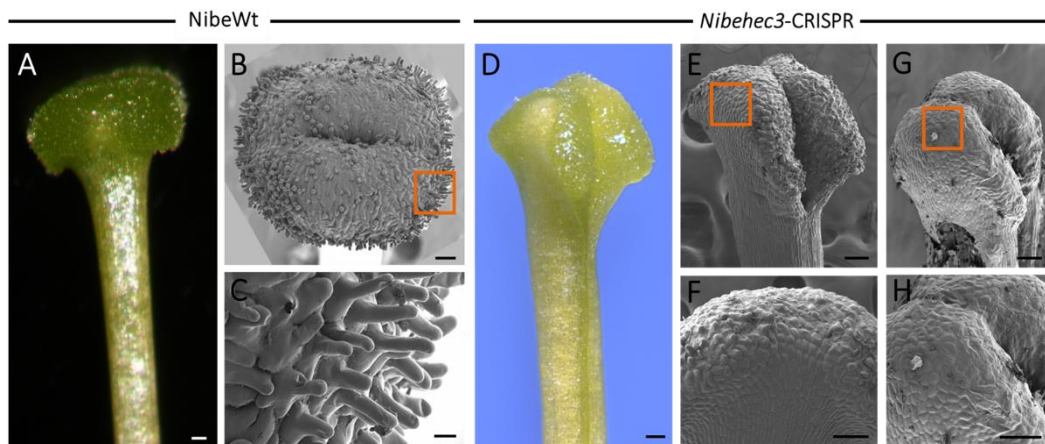


Fig. 26. Fenotipo de *Nibehec3a*-CRISPR en el estigma de *N. benthamiana*. A-C. Estilo de una flor silvestre de *Nicotiana* en antesis, nótese la morfología en forma de disco de un estilo silvestre (en B.) y los defectos de fusión de la región estilar y estigmática en un gineceo *Nibehec3*-CRISPR (en D, E, G.) D-H. Cambios morfológicos en el estilo de *Nibehec3*-CRISPR en antesis. El recuadro amarillo es una fotografía ampliada de la región lateral donde se observa una clara elongación de las papilas estigmáticas del silvestre (en C.) y una reducción completa de estas en el mutante (en F, H.). Esc: A, B, D-H: 100µm; C:20µm

Teniendo en cuenta los cambios en la morfología del estigma y la longitud del estilo, unido a que la mayoría de las flores *Nibehec3a*-CRISPR no se fecundaban, decidimos evaluar la integridad del tejido del tracto de transmisión y la tasa de migración de los granos de polen en las plantas transgénicas.

Inicialmente realizamos cortes transversales de la región estigmática de las plantas silvestres y las plantas *Nibehec3a*-CRISPR. Estos fueron teñidos mediante una coloración diferencial de Safranina- Alcian blue, que tienen afinidad por las paredes con crecimiento secundario tiñéndolas de rosado oscuro y las paredes con crecimiento primario fueron teñidas en azul, respectivamente (Balanza et al, 2014).

En los cortes transversales de la región estigmática de las plantas silvestres se observa una región central de células con pared secundaria, de color rojo, inmersa en una medula de parénquima de color azul (**Fig. 27A**). Esta región es el tracto de transmisión que en su porción central se degrada para permitir la elongación de los granos de polen (**Fig.27A**; Gasser & Robinson-Beers, 1993; Riechmann & Wellmer, 2014). En las plantas *Nibehec3a*-CRISPR no se diferencia un tracto de transmisión concéntrico como en el silvestre, con coloración diferencial (**Fig. 16A-B**); es decir, no se distingue una médula que permita la migración del polen (**Fig. 27B**). Aquí también es evidente el cambio de morfología simétrica radial del estigma de las plantas silvestres a una fusión incompleta de este en las plantas *Nibehec3a*-CRISPR (**Fig. 27B**).

La formación incorrecta del canal de transmisión podría estar asociada a la esterilidad de las plantas *Nibehec3a*-CRISPR. Para comprobarlo, se realizó un ensayo del crecimiento del tubo polínico a través del tracto de transmisión (**Fig. 27C-E**). Emasculamos 10 flores silvestres y 10 flores de plantas *Nibehec3a*-CRISPR que presentaban cambios morfológicos en el estigma y exhibían un estilo más corto. En ambos casos se aplicó polen silvestre. En el ensayo sobre los estigmas silvestres, los granos de polen germinaban en el estigma y crecían a través del estilo hasta llegar al saco embrionario (**Fig. 27C**). En comparación, sobre los estigmas *Nibehec3a*-CRISPR los granos de polen no lograban crecer a través del estilo (**Fig. 27D-E**).

Los resultados indican que el gen *NibeHEC3a* tiene funciones en el desarrollo del gineceo de *N. benthamiana*: en la elongación del estilo, la morfología y diferenciación de los tejidos del estigma, en particular la formación de las papilas estigmáticas, y la formación del tracto de transmisión (**Fig. 25, 26; 27**). Estos resultados nos recuerdan a los reportados para el mutante triple *hec1 hec2 hec3* de *Arabidopsis*, que no desarrolla papilas estigmáticas ni tracto transmisor (Gremski et al., 2007). Así, nuestros datos nos podrían estar indicando que solo *NibeHEC3a* es suficiente para realizar las funciones en el correcto desarrollo del gineceo.

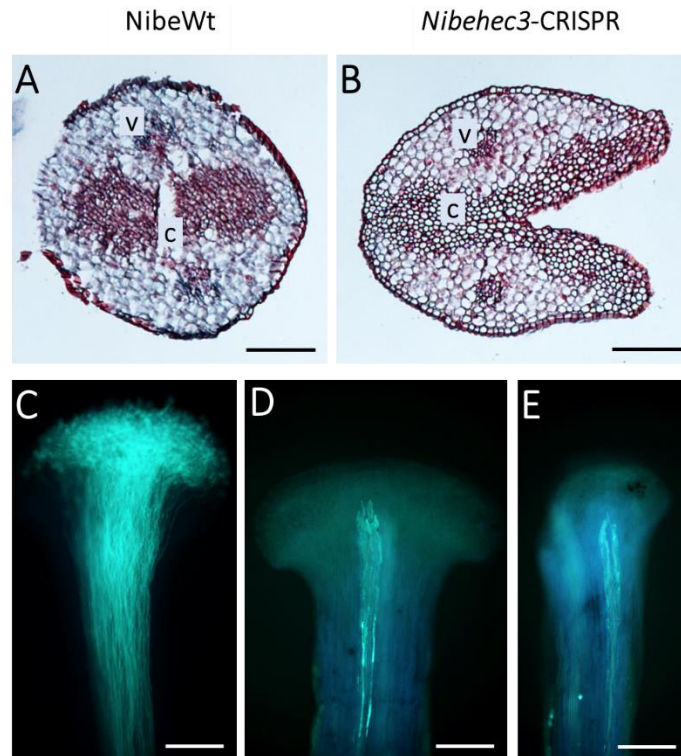


Fig. 27. Fenotipo de las plantas *Nibehec3a*-CRISPR en el tracto de transmisión. A-B. Cortes transversales de la región estigmática teñidos con safranina y alcian blue de las plantas silvestres (en **A.**) y mutante *Nibehec3*-CRISPR (en **B.**). **A.** Nótese la morfología en forma de disco del estilo silvestre, con un canal de transmisión concéntrico que permite la migración del polen. **B.** Aquí se muestra el canal de transmisión ensanchado, además de los defectos de fusión de la región estilar en las plantas *Nibehec3*-CRISPR. **C-E.** Ensayo del crecimiento del tubo polínico a través del tracto de transmisión de un gineceo silvestre (en **C.**) y el mutante *Nibehec3*-CRISPR (en **D-E.**). Nótese como los granos de polen que migran a través del estilo (en **C.**), mientras que en los gineceos mutantes no hay polen germinado y solo los haces vasculares son los que emiten autofluorescencia. **v:** haz vascular; **c:** canal de transmisión. Esc: **A-B:** 500 μ m; **C-E:** 200 μ m

NibeHEC3a está asociado a la dehiscencia del fruto de *N. benthamiana*.

N. benthamiana y *Arabidopsis* poseen frutos secos dehiscentes, es decir, que al final de la madurez los frutos se abren para facilitar la dispersión de las semillas (Chase et al., 2022; Knapp 2002). El proceso de dehiscencia ocurre cuando el endocarpo de los frutos se lignifica. Esto genera tensión sobre el tejido parenquimático de la zona de dehiscencia, lo que produce la apertura del fruto y permite la dispersión de la semilla (Knapp 2002). En *Arabidopsis*, la función más relevante en la diferenciación de la zona de dehiscencia de los frutos lo desempeña el gen *IND*, un parálogo de los genes *HEC3*, que solo está presente en Brassicaceae (Liljegren et al., 2004; Kay et al., 2013; Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017). La aparición del gen *IND* está asociada con el evento de duplicación de genoma completo ocurrido previamente a la diversificación de la familia Brassicaceae. Esto podría explicar la neofuncionalización en este clado y la adquisición de esta función tan específica en el desarrollo del fruto. Alternativamente, podría tratarse de un evento de subfuncionalización, por lo que era posible especular que los genes *NibeHEC3a* podrían estar haciendo esta función en los frutos de *N. benthamiana*, algo que apoyaban tanto los fenotipos obtenidos mediante el tratamiento de VIGS (Fig. 19) como los estudios de expresión de *NibeHEC3* (Fig. 16).

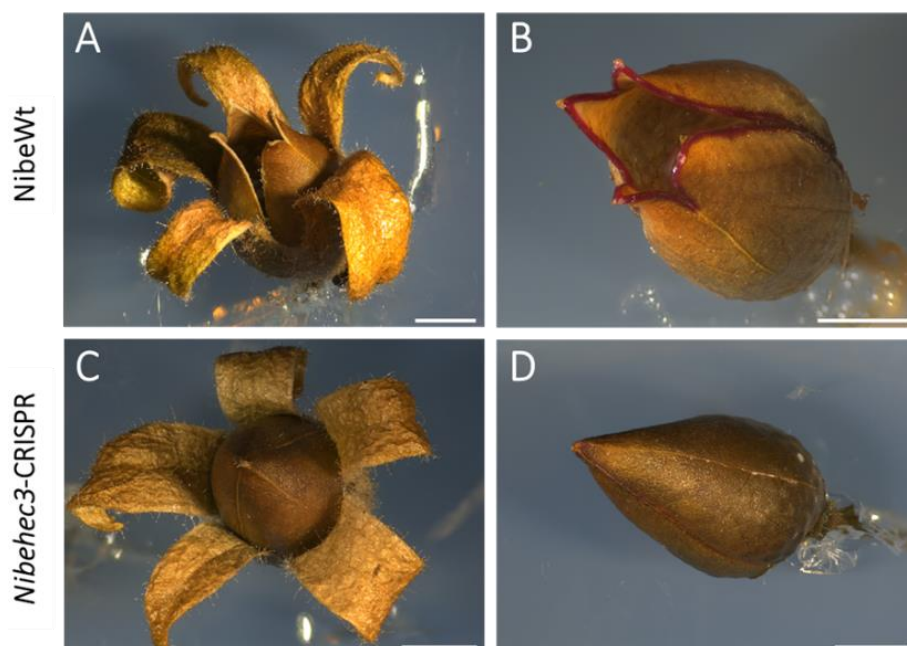


Fig. 28. Fenotipo *Nibehec3a*-CRISPR en frutos partenocárpicos de *Nicotiana*. A-B. Fruto seco- dehiscente de *N. benthiana* silvestre, nótese la diferenciación de la capa lignificada mediante la coloración rojiza por fluoroglucinol-HCl. C-D. Fruto partenocárpico de *Nibehec3*- CRISPR con los mismos días port-tratamiento que el mostrado en A. El fruto *Nibehec3a*-RSPR es indehiscente, no diferencia la capa celular lignificada en la zona de dehiscencia del fruto; no hay coloración rojiza. Esc:2mm

Como ya se ha descrito, las plantas *Nibehec3a*-CRISPR tienen problemas de fertilidad, producto de la falta casi completa de papilas estigmas y del tracto de transmisión, lo que se traduce en la ausencia de fecundación de los óvulos y por consiguiente el desarrollo fallido del fruto. Puesto que la dehiscencia se produce en frutos maduros, prácticamente ausentes en las plantas *NibeHEC3a*-CRISPR, decidimos inducir partenocarpia en los gineceos silvestres y transgénicos de *N. benthiana* mediante un tratamiento hormonal de auxinas y giberelinas (Balanzà et al., 2014) sobre flores emasculadas previamente a la antesis (y por tanto no polinizadas). Tras este tratamiento, tanto los frutos silvestres como los de las plantas *Nibehec3a*-CRISPR crecieron con normalidad. Al alcanzar la madurez, los frutos partenocárpicos silvestres se abrieron de igual modo que los frutos típicos silvestres autopolinizados. La apertura se produce a lo largo de las cuatro zonas de dehiscencia ubicadas en la porción más distal del fruto, que corresponden a la nervadura central y a los dos márgenes fusionados del carpelo (Fig. 28A; Knapp 2002). En cambio, los frutos partenocárpicos *Nibehec3a*-CRISPR son indehiscentes, aún semanas después de la apertura de los frutos silvestres (Fig. 28C).

Así, analizamos el patrón de lignificación de los frutos partenocárpicos mediante una coloración diferencial de fluoroglucinol-HCl. Esta tinción reacciona con los grupos aldehído de las paredes celulares lignificadas generando la coloración de rojo intenso (Riechmann & Wellmer, 2014). Los frutos partenocárpicos silvestres mostraron las cuatro franjas estrechas de lignificación en su porción más distal, en concordancia con las zonas de dehiscencia (Fig. 28B). Por el contrario, los frutos partenocárpicos *Nibehec3a*-CRISPR son indehiscentes (Fig. 28C) y no mostraron ninguna coloración rojiza a lo largo de los ejes de dehiscencia (Fig. 28D). Estos resultados indican que *NibeHEC3a* es necesario para la correcta diferenciación de la zona de dehiscencia de los frutos de

N. benthamiana, la misma función que el gen *IND* desempeña en *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2004).

***NibeHEC3a* desarrolla un papel importante en la dehiscencia de las anteras *N. benthamiana*.**

Durante el seguimiento de las plantas VIGS, detectamos que las plantas *Nibehec3*-VIGS parecían tener anteras parcialmente indehiscentes. Sin embargo, hasta el momento no se ha asociado directamente a los genes del linaje *HEC1/2/3/IND* con la diferenciación de los tejidos de la zona de dehiscencia en las anteras (Kay et al., 2013; Gremski et al., 2007; Liljegren et al., 2004), por lo que debíamos descartar que pudiera ser algún artefacto de la técnica utilizada. Así, la confirmación de este fenotipo en mutantes estables nos podría indicar una nueva función de los genes *HEC3/IND*, en la diferenciación de la zona de dehiscencia de las anteras, para los genes *HEC3* previos a la diversificación de las Brassicaceae.

En *N. benthamiana*, la dehiscencia de las anteras comienza con la degradación del tejido conectivo y las paredes adyacentes al estomio; esto, junto con la división y la expansión de los granos de polen, genera tensión a lo largo del estomio produciendo la dehiscencia de las anteras (Fig. 3; 29C; Koltunow et al., 1990). En las flores silvestres de *N. benthamiana* las anteras se abren para liberar el polen maduro durante la antesis de la flor, mientras que las anteras de las plantas *Nibehec3a*-CRISPR son indehiscentes (Fig. 29B, E; Fig. 30).

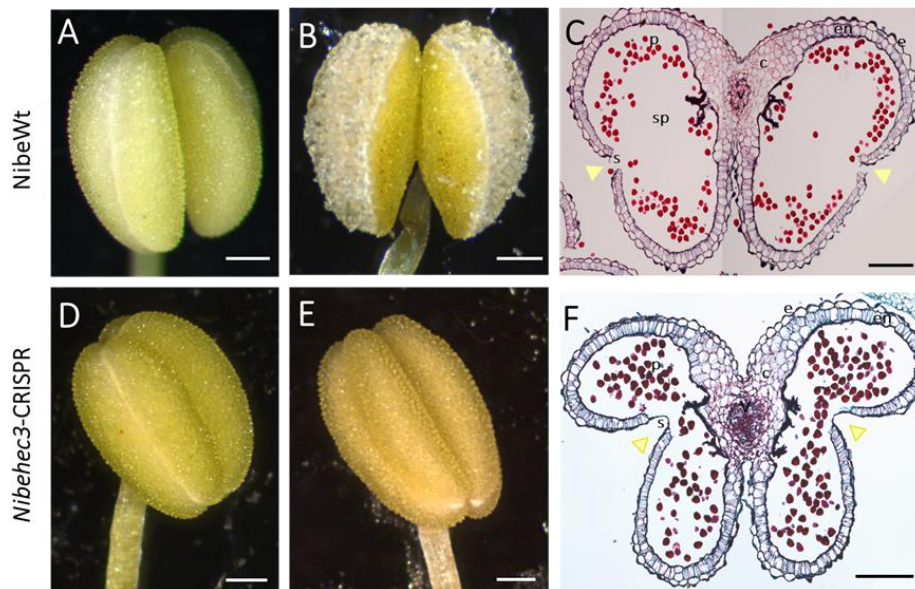


Fig. 29. Fenotipo de *Nibehec3a*-CRISPR en anteras de *N. benthamiana*. A. Anteras silvestres de *N. benthamiana* en pre-antesis con diferenciación del estomio longitudinal. B. Antera silvestre con apertura completa del estomio durante la antesis. C, F. Fotografía de campo claro de un corte transversal de una antera silvestre (en C.) en antesis teñidas con safranina- alcian blue y mutante (en F.). Nótese la unión completa de los sacos embrionarios por la degradación del tejido conectivo, así como la rotura del estomio en la antera silvestre (en C.) y el engrosamiento del estomio en la antera mutante que no permite la dispersión del polen (en F.). D-E. Antera mutante *Nibehec3*-CRISPR en pre-antesis (en D.) y post antesis (en E.) donde se muestra la diferenciación del estomio. E. La antera mutante *Nibehec3*-CRISPR es indehiscente, se muestra la constricción de la antera debido a la deshidratación en post-antesis. Las flechas amarillas indican el estomio. e: epidermis; en: endoteco; c: tejido conectivo; v: has vascular; sp: saco polínico; p:

Los cortes histológicos muestran que los pasos previos a la dehiscencia de las anteras, como la degradación de los tejidos circundantes al estomio, sí ocurren en las plantas *Nibehec3a*-CRISPR (Fig. 29C, F). Sin embargo, los tejidos a lo largo de la región del estomio parecen desarrollar una cutícula más resistente y persistente, que no permite la dehiscencia de las anteras, incluso después de la antesis (Fig. 30E-H).

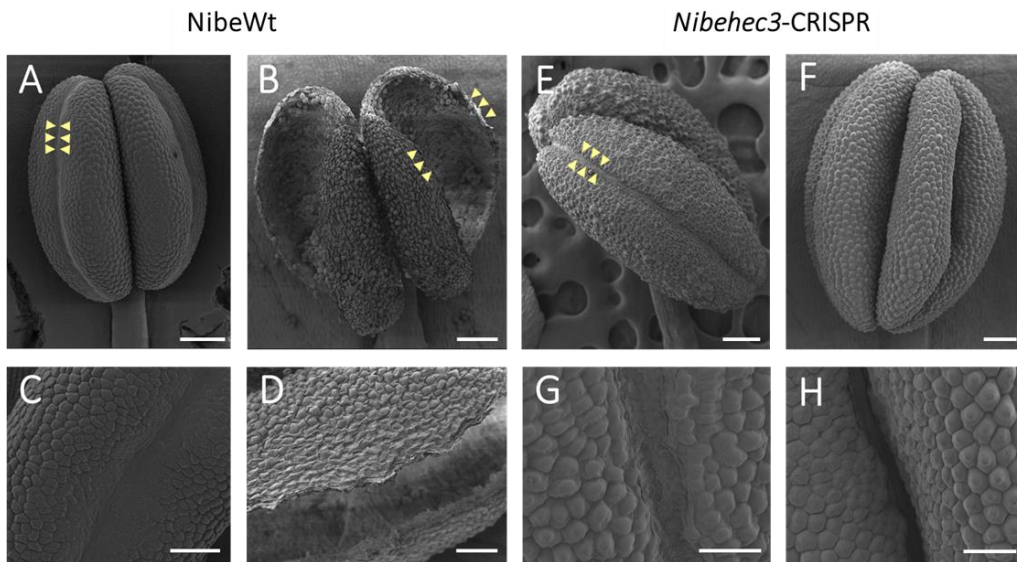


Fig. 30. Fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM) del fenotipo de *Nibehec3a*-CRISPR en anteras de *N. benthamiana*. **A, C.** Antera silvestre en pre-antesis donde se diferencia el estomio longitudinal. **B, D.** Teca silvestre en post-antesis con apertura del estomio. **E-H.** Anteras indehiscentes del mutante *Nibehec3*- CRISPR en post-antesis, nótese la fuerte diferenciación del estomio (en **G.**) y la constricción de la antera (**F-H.**). **C, D, G, H.** Fotografía ampliada de las regiones con flechas amarillas que muestran la morfología del estomio. Esc: **A-B, E-F:** 200µm; **C-D, G-H:** 100µm

Las plantas *Nibehec3*-CRISPR presentaban diversos fenotipos asociados a la infertilidad, con defectos en la elongación y desarrollo de los tejidos del estilo como el tracto de transmisión, defectos en la formación de las papilas estigmáticas, además de problemas asociados a la fusión incompleta de la región más distal del gineceo. En frutos también aparecieron asociados a la diferenciación de las zonas de dehiscencia, además de la novedosa función en la apertura de las anteras. A excepción del último fenotipo, nuestros patrones de expresión y las mismas funciones han sido reportadas en su conjunto para los genes *HEC1/2/3/IND* en *Arabidopsis*. Estos datos parecen indicar como el linaje *HEC/IND* se han especializado en la correcta formación del estilo y el estigma, además de promover la fusión del carpelo y la diferenciación de los tejidos de dehiscencia.

Entendiendo la evolución de los genes homeólogos *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*

El linaje de los genes *HEC1/2/3/IND* ha experimentado diferentes eventos de duplicación de genoma completo durante la diversificación de las Angiospermas (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017). Como punto de partida para este estudio, decidimos reconstruir la

historia evolutiva de los genes *HEC3a* y *HEC3b* de *Nicotiana* después de los eventos de poliploidización ocurridos en este género (**Fig. 9; 10**), específicamente para las especies alotetraploides de *N. benthamiana* y *N. tabacum*, y así comenzar a evaluar el grado de equivalencia funcional de ambos genes.

Con este objetivo, realizamos un estudio de microsintenia para comprobar el entorno genético y el orden de los genes a lo largo del cromosoma en los dos subgenomas (Tang et al. 2015). Los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* se localizan en los cromosomas 5 y 12, respectivamente; mientras que para *N. tabacum* estos genes se encuentran en los cromosomas 11 y 13. Partimos de las secuencias de los genes *HEC3a* y *HEC3b* de *N. benthamiana* y *N. tabacum* y aislamos alrededor de 2,5Mb de cada uno de los cromosomas antes identificados con sus respectivas unidades transcripcionales anotadas. Aquí, identificamos los siguientes problemas producto del ensamblaje de estos genomas en las bases de datos utilizada: Para el segmento de NitaHEC3a Chr11, detectamos que el 44,3% del segmento contenía espacios (*gaps /N letters*), mientras que para NitaHEC3b Chr13 detectamos un 42,6% de estos espacios; por otro lado, para *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* (Chr5 y Chr12), este valor no superaba el 0,5% en cada cromosoma, reflejando claramente la calidad dispar de ensamblaje de la secuencia del genoma disponible para ambas especies. Por este motivo, las regiones de 2,5 Mb correspondientes al genoma de *N. tabacum*, contenían muchas menos posiciones informativas, tal y como se refleja en la **Fig. 21**. Aun así, descargamos las secuencias de todas las proteínas anotadas y realizamos un análisis de TBLASTN cruzado entre los cuatro segmentos cromosómicos para comprobar si los genes codificantes estaban presentes o no en cada uno de ellos. A partir de este análisis, la microsintenia se calculó y puntuó utilizando SynFind (Tang et al. 2015) y el resultado gráfico fue generado utilizando la plataforma en línea de Simple Synteny (<https://www.dveltri.com/simplesynteny/>; Veltri et al., 2016).

En el análisis de microsintenia para los genes *NibeHEC3a-b* y *NitaHEC3a-b* de las especies alotetraploides de *N. benthamiana* (*Nibe*) y *N. tabacum* (*Nita*), relacionamos el entorno y la orientación del gen *NibeHEC3b* con respecto a los genes *NibeHEC3a*, *NitaHEC3a* y *NitaHEC3b*. Principalmente, se pudo evidenciar que la orientación del gen *NibeHEC3b* está dirigida en sentido contrario al de los genes *NibeHEC3a*, *NitaHEC3a* y *NitaHEC3b* (**Fig.31**).

Por su parte, hacia la región 5' de los segmentos cromosómicos se detectó un gen muy conservado, codificante para una enzima poligalacturonasa, en posición 13 (en la Fig. 31), muy cerca del locus *HEC3* (*locus* 14), que sin embargo estaba ausente del entorno genómico de *NibeHEC3b*, lo que sugiere que regiones en 5' y los elementos reguladores de *NibeHEC3b* se podrían haber perdido por delección. Los resultados mostrados en la **Fig. 31** son una simplificación de un análisis más amplio donde además incluimos genomas de especies diploides de *Nicotiana*, otras Solanaceae y eudicotiledóneas, incluidas *Vitis vinifera*, *Solanum lycopersicum*, *Petunia hybrida* y *Arabidopsis* (datos no mostrados). Este análisis extendido reveló que la microsintenia y la dirección del gen *HEC3* están muy conservadas en las especies de Angiospermas utilizadas. Además, que la inversión del locus *HEC3* (*NibeHEC3b*) con una posible delección en la región 5', parece ser una reorganización única en el entorno genómico de *NibeHEC3b- Chr 12* (**Fig.31**) que no se encuentra en ninguna otra de las especies analizadas.

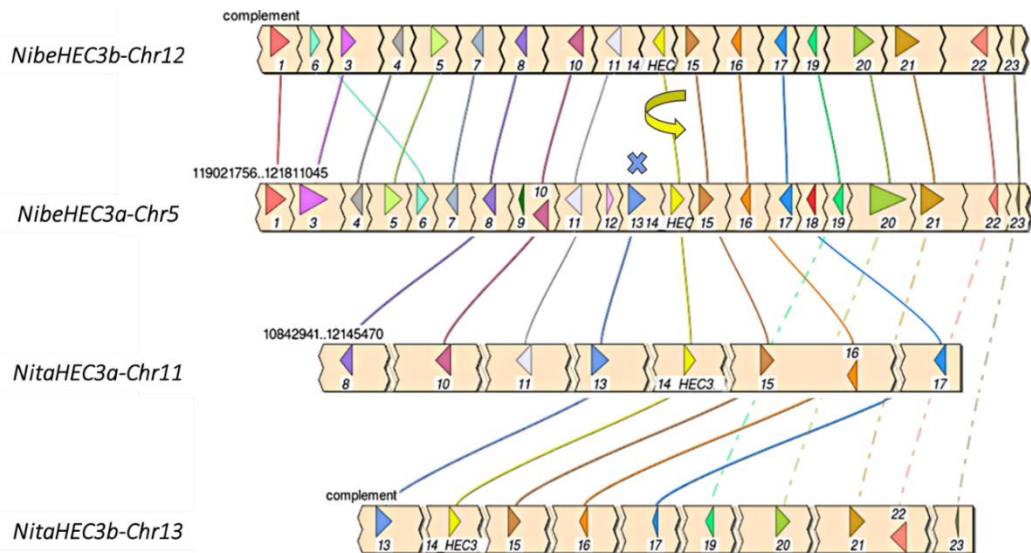


Fig. 31. Análisis de microsinetia para los genes *HEC3a* y *HEC3b* en las especies alotetraploides de *N. benthamiana* (*Nibe*) y *N. tabacum* (*Nita*). Puede observarse que la orientación del gen *NibeHEC3b* está dirigida en sentido contrario a los genes *NibeHEC3a*, *NitaHEC3a* y *NitaHEC3b*. Además, el gen conservado dirigido hacia la región 5' de *NibeHEC3a* (locus número 13, marcado con X en azul) está ausente en la región del gen *NibeHEC3b*. Los genes conservados están conectados por líneas del mismo color, el gen *HEC3* se representa en amarillo. Por simplicidad, se omitieron los genes no conservados.

Estos análisis proporcionan nuevos conocimientos sobre la historia evolutiva del clado *HEC3* del género *Nicotiana*. Las proteínas de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* comparten una similitud aminoacídica del 91% pero este último análisis nos ha revelado que los entornos genéticos de ambos genes parecen haber divergido significativamente en *Nicotiana benthamiana*, producto de una inversión/ deleción local seguida de una reorganización genómica en el locus *NibeHEC3b*, por lo que hipotetizamos que los genes *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* podrían diferir en su regulación transcripcional, como lo observamos en el mutante *NibeHEC3a*-CRISPR. Así nos propusimos evaluar independientemente los niveles de expresión de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* en flores en antesis de *N. benthamiana*, con el fin de establecer si dichos rearrreglos cromosómicos han afectado la regulación transcripcional de estos genes.

Para esto analizamos por separado la expresión de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* a partir de cDNA de botones florales y flores en antesis silvestres de *N. benthamiana*, siguiendo los protocolos que se describen con anterioridad. Diseñamos oligos específicos para cada uno de los genes dirigidos hacia la región 5' que precede al dominio bHLH de la secuencia codificante de los genes *NibeHEC3*, donde estas secuencias acumulan mayor número de cambios, intentando optimizar la especificidad de la amplificación y la ausencia de formación de dímeros. Amplificamos aproximadamente 150 pb de cada gen, normalizando la expresión con el gen *Elongation Factor (L25)* como control endógeno. Con este análisis de qRT-PCR detectamos que los niveles de expresión de *NibeHEC3b* eran imperceptibles con respecto a los de *NibeHEC3a* en el desarrollo floral de *N. benthamiana* (**Fig. 32A**).

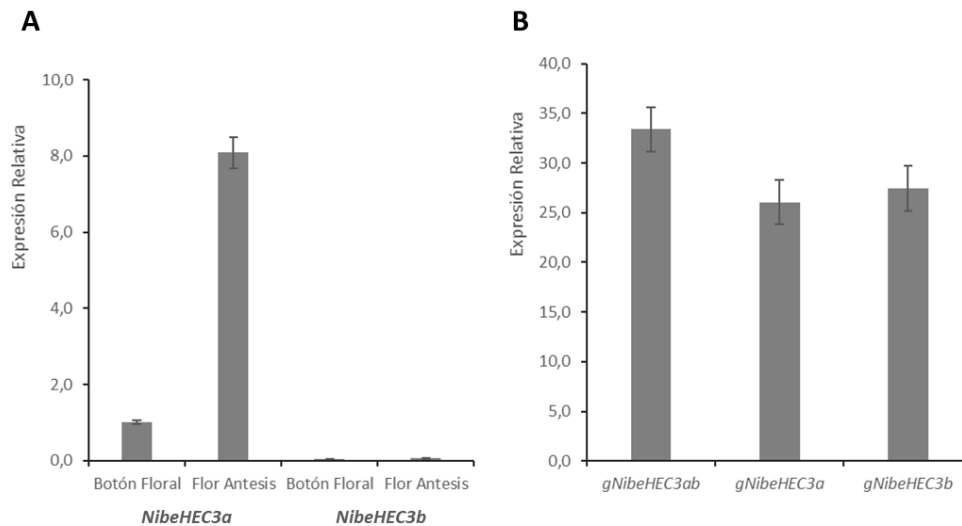


Fig. 32. Comparación de los niveles de expresión de *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* en flores en anthesis de *N. benthamiana*. **A-B.** Se muestra la expresión relativa de cada uno de los transcritos mediante qRT-PCR a partir de cDNA (en **A.**) de botones florales y flores en anthesis; y genómico (en **B.**) de *Nicotiana benthamiana*. Nótese como solo la expresión de *NibeHEC3a* es detectada durante el desarrollo floral *N. benthamiana*, lo que contrasta con los resultados obtenidos en los controles de amplificación (en **B.**), donde se han utilizado oligos para la detección simultánea de ambos genes (*gNibeHEC3a-b*) o las parejas específicas para *NibeHEC3a* (*gNibeHEC3a*) y *NibeHEC3b* (*gNibeHEC3b*) utilizados para el experimento mostrado en **A.**

Para descartar posibles problemas asociados a la especificidad de amplificación, decidimos corroborar estos resultados, enviando a secuenciar los productos de qRT-PCR antes obtenidos. Con este procedimiento confirmamos que no fue posible amplificar *NibeHEC3b* a partir de cDNA de flores de *N. benthamiana*. Estos resultados se pueden explicar de dos maneras: (1) que los oligos diseñados específicamente para amplificar el gen *NibeHEC3b* tuvieron problemas para reconocer la secuencia o (2) que realmente el gen *NibeHEC3b* no se expresa durante el desarrollo floral de *N. benthamiana*. Para compensar la falta de controles positivos para el gen *NibeHEC3b* en la qRT-PCR (ya que en ninguno de los tejidos analizados se detectó su expresión), y con el fin de garantizar que la falta de detección del gen *NibeHEC3b* en las flores de *N. benthamiana* eran producto de la no expresión de dicho gen, y no de un problema de reconocimiento de los oligos en la amplificación, utilizamos como molde para hacer controles dos fragmentos genómicos obtenidos por PCR, llamados *gNibeHEC3a* y *gNibeHEC3b*, para realizar una segunda prueba de qRT-PCR, utilizando los mismos oligos específicos diseñados para el análisis anterior. En este caso pudimos observar cómo los genes *NibeHEC3* eran detectados individualmente mediante este análisis, comprobando la funcionalidad de las parejas de oligos utilizadas, incluidos los diseñados específicamente para detectar *NibeHEC3b* (**Fig. 32B**). Estos resultados sugieren que podría ser únicamente el gen *NibeHEC3a* el que estaría realizando un papel predominante durante el desarrollo reproductivo de *N. benthamiana*, mientras que *NibeHEC3b* parece haber perdido por completo su expresión en esta fase, posiblemente debido a los rearrreglos cromosómicos sufridos tras la duplicación del clado *NibeHEC3* en *N. benthamiana*.

En *Arabidopsis* se han caracterizado en profundidad las funciones los genes *HEC1/2/3/IND*. Por un lado, los genes *HEC1/2/3* están asociados a la diferenciación y el desarrollo de la región más distal del gineceo, aunque *HEC3* parece jugar un papel más preponderante, al ser *hec3* el único

mutante del clado que por sí solo muestra defectos leves en la formación del estigma y la fertilidad del gineceo (Gremski et al., 2007). *IND* está directamente asociado con la dehiscencia del fruto de *Arabidopsis* (Kay et al., 2013; Liljegren et al., 2004) y esta función también ha sido demostrada en otras especies de Brassicaceae (Girin et al., 2010) pero no en otras familias de Angiospermas; además, *IND* parece estar también implicado en el desarrollo del estigma, ya que los mutantes *ind spt* muestran defectos en la diferenciación de las papilas estigmáticas y recientemente se ha descrito que participan en este proceso mediante la formación de complejos transcripcionales con los factores *NGA*, *SPT* y *HEC* (Ballester et al., 2021). Nuestros datos muestran que solo los genes *HEC3*, que no han sufrido el proceso de diversificación de las Brassicaceae, tienen funciones asociadas a la formación del gineceo y el fruto en *Nicotiana*, lo cual sugiere que, o bien estas funciones han sido adquiridas por los genes *HEC1/2* en *Arabidopsis* y quizá otras Brassicaceae y la función ancestral de *HEC* en desarrollo reproductivo se restringe a *HEC3* (específico de Angiospermas, al contrario que *HEC1/2*), o bien que en *Nicotiana* y quizá otras Solanaceae los genes *HEC1/2* han perdido estas funciones. Por otro lado, el origen del linaje *IND* en Brassicaceae podría estar asociado con su neofuncionalización para dirigir el desarrollo de las zonas de dehiscencia del fruto (Kay et al., 2013), o bien ser el resultado de la subfuncionalización de la función ancestral de *HEC3* (en desarrollo de estigma, tracto transmisor y dehiscencia de anteras y frutos), como nuestros resultados parecen indicar.

Complementación Heteróloga del gen *NibeHEC3a* en el fondo mutante *ind*.

Una de las formas de comprobar si dos genes homólogos producen proteínas funcionalmente equivalentes es mediante la comparación fenotípica del efecto de la sobreexpresión de ambos homólogos en una misma especie o bien caracterizado la capacidad del gen para sustituir la función de su homólogo en una línea mutante.

Los resultados descritos anteriormente sobre la caracterización funcional de *NibeHEC3a* sugieren que la hipótesis más probable es que tras la duplicación que originó los linajes *HEC3* e *IND* en Brassicaceae, los genes correspondientes hayan sufrido un proceso de subfuncionalización principalmente derivado de la divergencia de sus patrones de expresión. Sin embargo, puesto que los genes *IND* son específicos de Brassicaceae no puede descartarse que, tras su aparición en este clado, los genes *IND* hayan evolucionado también de modo que los factores que codifican tengan capacidades funcionales nuevas. Por ello, en este trabajo, comenzamos testando el efecto de la sobreexpresión de *NibeHEC3a* en el fondo mutante *ind* de *Arabidopsis*. Si los factores *AtIND* y *NibeHEC3a* tienen propiedades funcionales equivalentes, deberían de producir efectos fenotípicos similares, apoyando la hipótesis de la subfuncionalización basada en las diferencias de su regulación.

Generamos los vectores de sobreexpresión de *NibeHEC3a*; *AtIND* y *AtHEC3*, poniendo bajo el control de dos copias en tándem del promotor CaMV35 las secuencias codificantes correspondientes a los tres genes y transformamos el mutante nulo *ind-2*, con fenotipo de fruto indehisciente (Liljegren et al., 2004).

Para un análisis preliminar, seleccionamos 10 líneas T1 independientes para cada uno de los vectores de sobreexpresión con fondo *ind-2*. Todas plantas transgénicas: *p35s_NibeHEC3a*; *p35s_AtIND*; *p35s_AtHEC3* caracterizadas exhibieron un fenotipo claro de sobreexpresión. En general, las plantas mostraban cambios fenotípicos similares, aunque con distintos grados de severidad, en el desarrollo de la inflorescencia, independientemente de la construcción utilizada (**Fig. 33**). Los cambios morfológicos descritos a continuación recuerdan a los reportados por Ballester et al., 2021

Las flores de *p35s_AtHEC3* presentaban fenotipos desde etapas tempranas del desarrollo floral. El gineceo parecía tener los ginóforos alargados y el ovario reducido con una parte apical muy desarrollada, donde se evidenciaba la proliferación ectópica de tejido estigmático. Este tipo de tejido también podría distinguirse en la margen los sépalos. Las anteras parecían desarrollar con normalidad, pero crecían desordenadas, fuera de su verticilo de crecimiento (**Fig. 33F**). Durante el desarrollo del fruto, el tejido estigmático ectópico se mantenía en el ápice del fruto y la margen de los sépalos. Los frutos, en general, solían ser más pequeños que los controles y, además, eran frecuentemente estériles por lo que no terminaba de desarrollarse (**Fig. 33E-G**).

Las plantas *p35s_AtIND* tenían un fenotipo muy similar al de la sobreexpresión de *AtHEC3*. Generalmente las plantas parecían desarrollar todos sus órganos florales, pero podía diferenciarse el crecimiento de tejido ectópico estigmático sobre la margen de los sépalos, además de que solo se desarrollaban entre dos o tres pétalos en cada flor (**Fig. 33H-J**). También, podía diferenciarse un gineceo alargado con la región apical más engrosada y rodeada de tejido estigmático ectópico. En algunas flores las anteras parecen desarrollarse normalmente, pero en los fenotipos más severos apenas se diferenciaban los órganos reproductivos. En este caso se observaba un conjunto de hojas indiferenciadas con crecimiento de tejido ectópico estilar sobre las márgenes (**Fig. 33I**). Al igual que las plantas *p35s_AtHEC3*, aquí los frutos tampoco lograban desarrollarse por completo (**Fig. 33H-J**).

Por su parte las plantas que sobreexpresaban *NibeHECa* presentaban un fenotipo menos severo (**Fig.33K-L**). Las flores parecían desarrollar todos sus órganos en sus respectivos verticilos. Sin embargo, los botones florales se abrían prematuramente, antes de la antesis en los controles (**Fig.33L**). Durante el desarrollo floral, al igual que las transgénicas anteriores, se apreciaba la presencia de tejido ectópico estilar sobre las márgenes de los sépalos, mientras que el gineceo parecía desarrollarse con normalidad, aunque un poco más alargado que el silvestre (**Fig. 33M**). Estas plantas eran fértiles y durante el desarrollo del fruto se apreciaban ciertas deformaciones que recordaban a los reportados para la línea transgénica 35S::IND débil descrita en la literatura, que presenta un crecimiento desplazado hacia la horizontal, con las márgenes diferenciadas pero en forma de zigzag y mayor elongación del estilo (Liljegren et al., 2004). (**Fig. 33N**). En estos frutos parecían diferenciarse las márgenes de las valvas, pero al final de su desarrollo seguían siendo indehiscentes como el mutante simple *ind-2*(**Fig. 33K-L**).

En resumen, las líneas de sobreexpresión de los genes *NibeHEC3a*, *AtIND* y *AtHEC3* en el fondo mutante *ind-2* presentaban alteraciones fenotípicas similares, como el alargamiento del gineceo y la diferenciación ectópica de tejido estilar sobre la margen de los sépalos, siendo menos severo este fenotipo en las plantas *p35s_NibeHEC3* (**Fig. 33**), como es frecuente cuando se utilizan sistemas heterólogos. Además, estos fenotipos eran similares a los reportados previamente para

las diferentes líneas sobreexpresoras de los genes *HEC1/2/3/IND* en fondo silvestre (Liljegen et al., 2004; Gremski et al., 2007; Ballester et al., 2021). Sin embargo, en ninguno de los casos pudimos observar si las proteínas testadas podían complementar la indehiscencia de los frutos *ind*, quizá por las alteraciones fenotípicas en el gineceo y el fruto, que impedían su desarrollo normal.

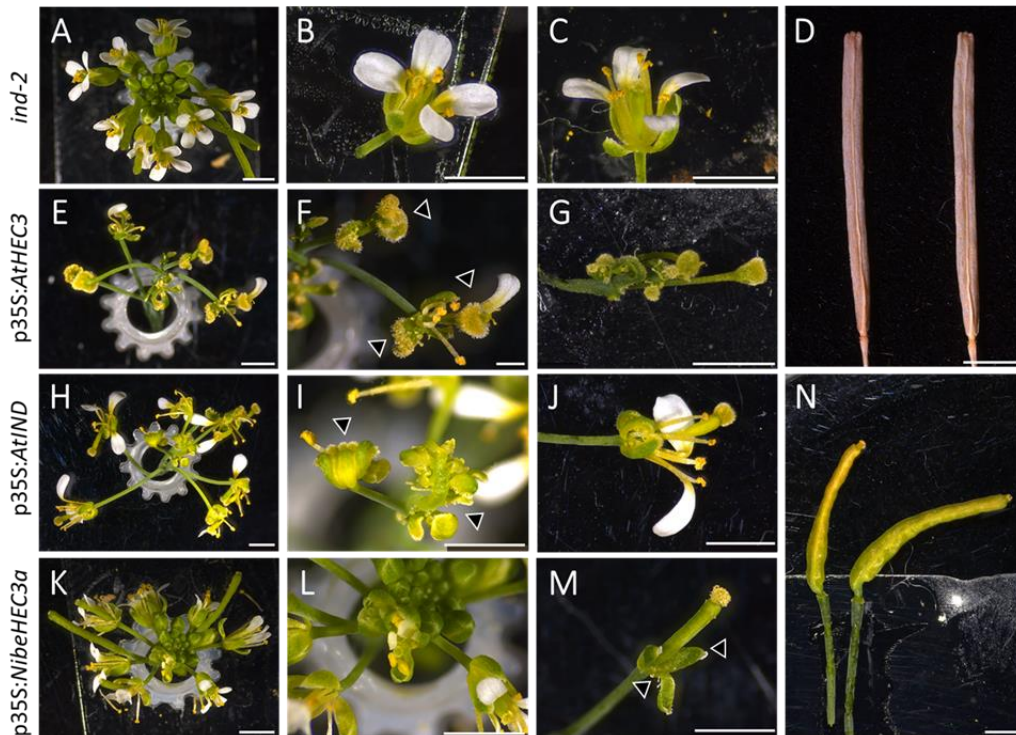


Fig. 33. Fenotipo de las plantas que sobreexpresan *NibeHEC3a/AtIND/AtHEC3* en el fondo mutante *ind-2*. A-D. fenotipo del mutante fuerte de pérdida de función *ind-2*, tienen un desarrollo floral similar al silvestre, pero tiene frutos indehiscentes. Utilizado como control de transformación. E-G. fenotipo de las plantas *p35S:AtHEC3*; H-J. fenotipo de las plantas *p35S:AtIND*. K-N. fenotipo de las plantas *p35S:NibeHEC3a*. Las flechas señalan el crecimiento del tejido ectópico estilar. Nótese que este crecimiento irregular se mantiene en las tres líneas de sobreexpresión. Esc: 2mm.

Por este motivo, realizamos un segundo experimento con el fin de comprobar si el ortólogo de *HEC3* en *N. benthamiana*, *NibeHEC3a*, es capaz de rescatar el fenotipo de fruto indehiscente en el mutante simple de *ind* en *Arabidopsis* (*ind-1*; *ind-2*, Liljegen et al., 2004).

Usando la tecnología de GB diseñamos cuatro vectores $\Omega 1$ que poseen $\sim 3,3$ kb de la región promotora del gen *AtIND* unida, independientemente, a la CDS de los genes *AtIND*, *AtHEC3*, *NibeHEC3a* o el gen reportero *GUS*. Adicionalmente, incluimos la región 3'UTR del gen *AtIND*. Este módulo transcripcional fue combinado con el módulo de selección *DsRed* que funciona como marcador visual de selección positiva para detectar el transgén en las plántulas T0 y como marcador de selección negativa en T1. Así generamos cuatro vectores de transformación denominados: $\Omega 1:DsRed_pIND_CDS_3'UTR_{AtIND}$. Con dichas construcciones transformamos independientemente plantas mutantes *ind-1* e *ind-2* (Ler; Liljegen et al., 2004), generando 8

grupos experimentales que fueron caracterizadas preliminarmente durante la fase T1, obteniendo los siguientes datos porcentuales de complementación:

Fondo <i>ind-1</i> (Liljegren et al., 2004)			
Construcción	Plantas con fenotipo de fruto dehiscente*	Plantas totales observadas	Porcentaje
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>AtIND</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	19	39	48,7%
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>AtHEC3</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	1	20	5,0%
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>NibeHEC3a</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	7 (+ 3 parciales)	40	25,0%
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>GUS</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	0	18	0,0%

Fondo <i>ind-2</i> (Liljegren et al., 2004)			
Construcción	Plantas con fenotipo de fruto dehiscente*	Plantas totales observadas	Porcentaje
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>AtIND</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	21	47	44,7%
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>AtHEC3</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	0	20	0,0%
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>NibeHEC3a</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	7 (+2 parciales)	40	22,5%
$\Omega 1$: DsRed_pIND_ <i>GUS</i> _3'UTR _{<i>AtIND</i>}	0	20	0%

Como era de esperarse el mayor porcentaje de complementación ocurre con la construcción $\Omega 1$: DsRed_pIND_*AtIND*_3'UTR_{*AtIND*} que rescata en un 48,7% y 44,7% el fenotipo de frutos indehiscentes de los mutantes *ind-1* e *ind-2* respectivamente. Sin embargo, es de resaltar que las plantas complementadas con la secuencia codificante de *NibeHEC3a*, ($\Omega 1$:DsRed_pIND_*NibeHEC3a*_3'UTR_{*AtIND*}) tienen un porcentaje de complementación del 25% y 22,5% en cada uno de los fondos utilizados (*ind-1* e *ind-2*), es decir, que *NibeHEC3a* es capaz de rescatar el fenotipo de frutos indehiscentes en los mutantes *ind* de *Arabidopsis*. Por el contrario, las plantas complementadas con las secuencias codificantes de *AtHEC3* y *GUS* no rescatan el fenotipo de frutos indehiscente en los mutantes *ind* utilizados (Fig.34).

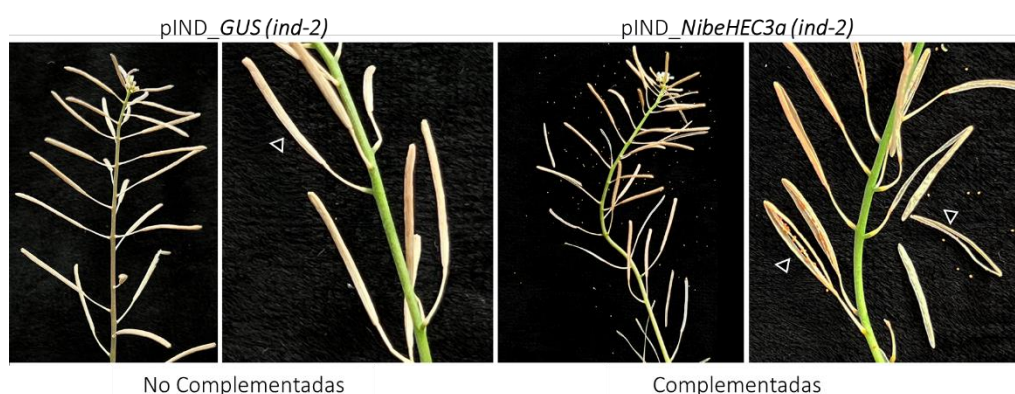


Fig.34. Ejemplo de fenotipos de complementación. Se muestran los dos casos observados durante este desarrollo experimental. Hacia la izquierda, el control negativo ($\Omega 1$:DsRed_pIND_*GUS*_3'UTR) de no complementación con silicuas totalmente indehiscentes (flecha). Hacia la derecha, silicuas dehiscente, complementadas ($\Omega 1$:DsRed_pIND_*NibeHEC3a*_3'UTR) con la secuencia codificante de *NibeHEC3a* en el fondo mutante *ind-2* de *Arabidopsis*. Nótese la separación completa entre las valvas y el replum (señalado por las flechas, además, de la dispersión de las semillas. Tenga en cuenta que este experimento se encuentra en desarrollo durante la elaboración final de este manuscrito.

Estos datos preliminares, apoyan nuestra hipótesis de subfuncionalización, la cual sugiere que las funciones ancestrales *HEC3-like* (en desarrollo de la región más distal del gineceo y la formación de la zona de dehiscencia del fruto), se dividieron entre los parálogos de *HEC3* e *IND* respectivamente, en la familia Brassicaceae. Adicionalmente, estos datos contribuyen a establecer que en *Arabidopsis*, no solo ha tenido lugar la divergencia entre los patrones de expresión de cada parálogo, sino que también parecen haber divergido las funciones de sus productos proteicos, ya que la secuencia codificante de *AtHEC3* no rescata el fenotipo de frutos indehisciente de *ind*.



Discusión

Una de las claves del éxito evolutivo de las Angiospermas es la formación del gineceo (Scutt et al., 2006), que, entre otras funciones, facilita que la polinización se produzca solo con polen compatible y que además sea más eficiente y rápida. Para ello, ha sido esencial el desarrollo de tejidos especializados en la región apical del pistilo asociados a la polinización, cuya diferenciación tiene además que estar coordinada con la de otros tejidos del gineceo. La información disponible, producto del trabajo de varios grupos en las últimas dos décadas, sugiere una red reguladora común que guía el desarrollo del gineceo en las plantas con flor (Ferrándiz & Fourquin, 2014; Fourquin & Ferrándiz, 2014). Dicha red está compuesta por diversos genes pertenecientes en su mayoría a distintas familias de factores de transcripción, las cuales han sufrido numerosos eventos de duplicación a lo largo de la diversificación de las Angiospermas. Esto implica que las mismas familias de genes tienen complementos genéticos distintos a lo largo de la evolución de las plantas con flor. Dentro de estas familias destacan los factores de transcripción de tipo bHLH, que incluyen al linaje *HEC1/2/3/IND*, los cuales parecen ser de gran importancia en esta red reguladora de la morfogénesis del gineceo y llevan a cabo funciones destacadas en la formación de los tejidos de transmisión (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017; Ballester et al., 2021). Sin embargo, la mayoría de los estudios funcionales descritos se han realizado en *Arabidopsis* y existe muy poca información funcional los genes *HEC1/2/3/IND* por fuera de la familia Brassicaceae.

En este estudio, analizamos la conservación funcional de los genes del linaje *HEC1/2/3/IND* de *N. benthamiana* (Solanaceae). Entre ellos, el estudio se ha enfocado en *NibeHEC3a*, que es el único que parece tener una función importante en el desarrollo del gineceo y el fruto de *Nicotiana benthamiana*. Determinamos los patrones de expresión de los genes *NibeHEC3* durante el desarrollo floral mediante hibridación *in situ*; posteriormente analizamos los fenotipos florales y de los frutos causados por su pérdida de función utilizando VIGS y CRISPR-Cas9. Al comparar nuestros resultados con los observados en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, podemos sugerir una función conservada de *NibeHEC3* en el desarrollo del estilo y el estigma; mientras que, en frutos, *NibeHEC3* de *N. benthamiana* realiza la misma función que *IND* de *Arabidopsis*, en la diferenciación de la zona de dehiscencia del fruto. Además, identificamos una nueva función en *Nicotiana* no descrita para estos genes *HEC/IND* en *Arabidopsis*, relacionada con la dehiscencia de las anteras.

Evolución del linaje *HECATE/INDEHISCENT*

A pesar de los escasos análisis filogenéticos para los genes *HEC1/2/3/IND*, todos los análisis disponibles coinciden en que hubo una duplicación temprana previa a la diversificación de las Angiospermas que dio lugar a los clados *HEC1/2*, separado del clado *HEC3-like* (haciendo referencia a los genes *HEC3* previos a la duplicación que dio lugar al clado *HEC3/IND* en Brassicaceae; Pabón-Mora et al., 2014). Luego, una duplicación específica de los genes *HEC3-like* previo a la diversificación de las Brassicaceae dio lugar a los genes *HEC3/IND* (Fig. Suple 1; Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017). Así, las Angiospermas poseen al menos una copia de los genes *HEC1*, *HEC2*, *HEC3* y solo la familia Brassicaceae tienen, además, un parálogo del gen *IND* (Pabón-Mora et al., 2014). Específicamente, las Solanaceae tienen copias adicionales de *HEC1* y *HEC2* como resultado de duplicaciones específicas dentro de la familia, mientras que *HEC3*

permanece de copia única, a excepción de las especies poliploides como *N. benthamiana* y *N. tabacum* que poseen dos copias de *HEC3* (Fig. 9).

Por otro lado, al comparar las regiones sinténicas entre las secuencias de *HEC3a* y *HEC3b* de las especies *N. benthamiana* y *N. tabacum*, detectamos que la región alrededor del gen *NibeHEC3b* estaba invertida respecto a las regiones de homología flanqueantes de *NibeHEC3a*, *NitaHEC3a* y *NitaHEC3b* (Fig.31). El cambio probablemente esté afectando a la región reguladora del promotor, dado que la inversión se detecta en la región inmediatamente anterior al 5' de *NibeHEC3b* sin afectar al gen adyacente (Fig. 31). Esto explicaría que solo detectáramos la expresión del gen *NibeHEC3a* (Fig. 32) y los mutantes simples *Nibehec3a*-CRISPR tengan un fenotipo evidente que sugiere que *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b* no son redundantes a pesar de la similitud de sus secuencias codificantes.

A nivel local, la resultante de un evento de duplicación, en este caso producida por hibridación y generación de un alotetraplide, puede afectar a la organización del genoma y traducirse en alteraciones de la expresión y en la pérdida o acumulación de fragmentos génicos que podrían resultar en cambios que promuevan la neofuncionalización (Hollister, 2014; Renny- Byfield &Wendel, 2014). En este caso, la inversión en el cromosoma 13 que comprende a *NibeHEC3b* parece haber tenido como consecuencia una alteración significativa de la regulación transcripcional de dicho gen y quizá que hubiera adquirido nuevas funciones. Sin embargo, este no parece ser el caso, puesto que, por un lado, no detectamos expresión de *NibeHEC3b* en ninguno de los tejidos analizados y, por otro, el silenciamiento por VIGS dirigido a ambos genes, *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*, solo produjo fenotipos similares a los del mutante *Nibehec3a*-CRISPR. Por tanto, la hipótesis que nos parece más probable es que *NibeHEC3b* esté sufriendo un proceso de pseudogenización. Esta hipótesis se ve de algún modo apoyada por la falta de éxito en la generación de mutantes *NibeHEC3b* por CRISPR-Cas9. Aunque puede ser un problema, por ejemplo, de eficiencia de las guías de RNA utilizadas, también es posible que el entorno genómico de *NibeHEC3b* se haya silenciado por reorganización de la cromatina y sea menos accesible a los componentes necesarios para la edición génica por este método.

Por otro lado, la presencia de dos copias de *HEC3*, *NibeHEC3a* y *NibeHEC3b*, y la posible divergencia de sus patrones de expresión, podría haber facilitado que *NibeHEC3a* adquiriera nuevas funciones en la diferenciación de la zona de dehiscencia de las anteras. Sin embargo, esta última opción no es probable, teniendo en cuenta que el mutante *oshec3* de *Oryza sativa* tiene anteras indehiscentes (Dreni, Ferrándiz, resultados no publicados).

Los resultados de nuestros análisis filogenéticos apuntan a que los genes *HEC3* tiene un papel central en la evolución de caracteres reproductivos clave en Angiospermas. Sin embargo, son necesarios análisis de secuencias adicionales del linaje de genes *HEC3* combinadas con estudios funcionales para establecer la trayectoria evolutiva del linaje y las funciones ancestrales y derivadas asociadas al mismo y para el establecimiento de una hipótesis funcional más consistente.

***NibeHEC3* tiene funciones conservadas en la diferenciación de los tejidos más apicales del gineceo.**

En *Arabidopsis*, los genes *HEC1/2/3* se han asociado con la correcta diferenciación de los tejidos más apicales del gineceo, claves en la polinización (Gremski et al., 2007; Schuster et al., 2015). Sus patrones de expresión parecen ser muy similares en estadios tempranos del desarrollo floral de *Arabidopsis*, ya que se localizan en el septo, en el tracto de transmisión y en el estigma en desarrollo (Fig. 34A-C; Gremski et al., 2007). Solo parecen tener expresión diferencial en el ovario, donde *HEC1* y *HEC2* se expresan en los óvulos, mientras que *HEC3* se detecta en el funículo (Fig. 34; Gremski et al., 2007). Sin embargo, solo la expresión de *HEC3* se mantiene en el tracto de transmisión y en el funículo hasta la antesis, pero no se detecta en el estigma (Fig. 34G-J; Gremski et al., 2007).

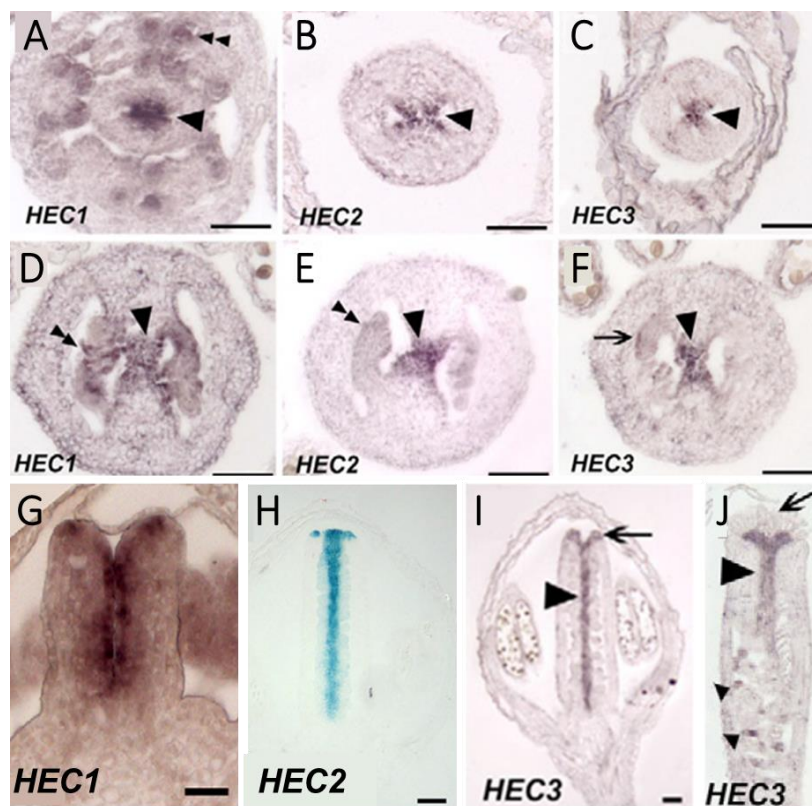


Fig. 35. Expresión de los genes *HEC* en el gineceo de *Arabidopsis*. A-G; I. Expresión por hibridación *in situ*. A-C. Sección transversal del gineceo (estadio 8), la expresión de *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* se detecta en el tabique (puntas de flecha). *HEC1* en primordios de anteras (dobles puntas de flecha) D-F. Sección transversal del gineceo (estadio 12). Los tres genes se detectan en el tracto de transmisión (puntas de flecha). *HEC1* y *HEC2* se expresan en óvulos (doble puntas de flecha), mientras que *HEC3* solo se detecta en el funículo (Flecha). G-I. Sección longitudinal del gineceo, donde puede distinguirse la expresión de los tres genes en septo, el tracto de transmisión y el estigma en diferentes estados del desarrollo. G. Expresión de *HEC1* en estadio 8; esta expresión se mantiene hasta el estadio 12. H. Expresión GUS de *HEC2* en estadio 11. I- J. Expresión de *HEC3* en estadio 11 (en I.), *HEC3* continúa siendo fuertemente expresado hasta el estadio 12 (en J.) en el tracto de transmisión (puntas de flecha), y el funículo (doble puntas de flecha) pero no el estigma (flecha). La expresión de *HEC1* y *HEC2* no se detecta al final de este estadio. Esc: 50µm. Figura adaptada y modificada de Schuster et al., 2015 y Gremski et al., 2017.

Estos patrones de expresión están directamente asociados con los fenotipos de su pérdida de función. En *Arabidopsis*, los mutantes simples de *hec1* y *hec2* no tienen fenotipos evidentes en la formación del estilo y el tracto de transmisión, a diferencia del mutante simple *hec3* que tiene

problemas moderados de fertilización (Gremski et al., 2007). Este fenotipo se hace más severo en el mutante triple *hec1 hec2 hec3*, como lo revela la falta total de papilas estigmáticas y de tracto de transmisión (Gremski et al., 2007). Además, la sobreexpresión de cualquiera de los tres genes *HEC* causa fenotipos similares, como es la formación de inflorescencia con morfología muy alterada, flores anormales y órganos sexuales reducidos, además de la formación de tejido estigmático ectópico. Estos fenotipos indican que las proteínas *HEC* tienen propiedades similares, lo que también concuerda con la redundancia funcional que presentan (Gremskiet al., 2007).

Por otro lado, el gen *IND* es necesario para la diferenciación de la zona de dehiscencia en el fruto de *Arabidopsis* (Liljegren et al., 2004) y también contribuye a la formación del estigma (Girin et al., 2010; 2011; Ballester et al., 2001). *IND* se expresa principalmente en la margen de las valvas, en el ovario y en la zona más distal del pistilo en formación, para después restringirse a una región entre el estigma y el estilo (Liljegren et al., 2004; Girin et al., 2011). La sobreexpresión de *IND* tiene los mismos fenotipos que la sobreexpresión de *HEC3* (Fig. 33; Ballester et al., 2021), lo que sugiere que las diferencias en los patrones de expresión son un componente clave en la diferenciación funcional entre los genes *HEC* e *IND* de *Arabidopsis*.

A diferencia de *Arabidopsis*, en *N. benthamiana* solo *NibeHEC3a* se expresa en los órganos reproductivos. Nuestros análisis de expresión revelan que los *NibeHEC1* y *NibeHEC2* se expresan principalmente en tejidos vegetativos (Fig. 11) y *NibeHEC3b* no se expresa en ninguno de los tejidos analizados (Fig. 32). Por su parte, *NibeHEC3a* se expresa tanto en los tejidos vegetativos como los reproductivos de *N. benthamiana* (Fig. 11; 32). Específicamente, *NibeHEC3a* se expresa durante el desarrollo y la diferenciación de los tejidos más distales del gineceo, el tracto de transmisión y el estigma, hasta la antesis de las flores. También se observa expresión en la zona de dehiscencia de las anteras y en la de los frutos (Fig. 16-17). Esta diferencia entre los patrones de expresión concuerda bien con nuestros análisis funcionales posteriores y apoya que *NibeHEC3a* es el gen del linaje *HEC1/2/3/IND* con un papel preponderante en el desarrollo reproductivo de *Nicotiana benthamiana*.

En otras Solanaceae como *Nicotiana obtusifolia*, la expresión de los genes *HEC1* y *HEC2* es levemente detectada en estadios tempranos del desarrollo floral; mientras que *HEC3* se expresa ampliamente durante el desarrollo floral y en estadios tempranos del desarrollo del fruto (Ortiz-Ramirez et al., 2018). En otras especies como *Capsicum annuum* y *Solanum lycopersicum*, la expresión de los genes *HEC1* se detecta en botones florales, mientras que *HEC2* parece detectarse levemente en los órganos florales estériles y casi no son detectados en carpelos o durante el desarrollo de fruto. Por su parte los genes *HEC3* se expresan durante todo el desarrollo floral y la maduración del fruto (Ortiz- Ramirez et al., 2018).

Además, los duplicados recientes de los genes *HEC1* y *HEC2* (*HEC1a-d* *HEC2a-c*) exclusivos de Solanaceae restringen su expresión principalmente a hojas o el meristemo vegetativo y es probable que ya no participen en el desarrollo del gineceo o el fruto como *HEC3* (Fig. 9; 11; Ortiz-Ramirez et al., 2018). Así, estos datos sugieren que los genes *HEC3* parecen tener una función más importante en el desarrollo reproductivo, y específicamente exhiben un patrón de expresión consistente durante el desarrollo del gineceo y el fruto en la familia Solanaceae.

Por fuera de Brassicaceae y Solanaceae son escasos los análisis de expresión que nos permitan hipotetizar acerca de la evolución de estos genes. Por un lado, en *Vitis vinifera* el ortólogo de *HEC2* parece detectarse en los órganos fértiles de las flores (Pfannebecker et al., 2017) y el ortólogo de *HEC3* se detecta especialmente en el gineceo y en la pulpa del fruto, donde se ha asociado con su maduración (Pfannebecker et al., 2017; Fasoli et al., 2012). En *Prunus persica*, solo se ha reportado la expresión del ortólogo de *HEC3*: *PpFLESHY*, que es detectado en hojas jóvenes, estambres y gineceo durante el desarrollo floral, mientras que los mayores niveles de expresión aparecen en el mesocarpo durante los estadios más tardíos de desarrollo del fruto (Botton et al., 2016). Por otro lado, en algunas especies de Rubiaceae, como *Galium hypocarpium* y *Palicourea angustifolia* los análisis de expresión están restringidos al gineceo en pre-antesis y frutos en estadios tempranos del desarrollo (Salazar-Duque et al., 2021). En estas especies los ortólogos de *HEC1/HEC2/HEC3* parecen expresarse homogéneamente durante el desarrollo tardío del gineceo y en etapas tempranas del desarrollo del fruto (Salazar-Duque et al., 2021). Aunque no se han reportado estudios funcionales sobre los genes *HEC* en *Oryza sativa*, a partir de nuestros análisis filogenéticos y disponiendo datos transcriptómicos públicos de diversas fuentes, identificamos los patrones de expresión de los homólogos de *HEC1/2/3*. Estos indican que los genes *OsHEC1/2a* y *OsHEC1/2b* se expresan en estadios tempranos del desarrollo de la inflorescencia, antes de la aparición de los órganos florales, para después expresarse fuertemente en lemmas y paleas desarrolladas; en anteras y pistilos su expresión es reducida pero detectable. Por su parte, *OSHEC3* se expresa débilmente en inflorescencia y después su expresión aumenta en anteras, pistilos y embrión. En la magnólida *Aristolochia fimbriata* los ortólogos de *HEC1* (*AfimHEC1*) y *HEC3* (*AfimHEC3*) tienen expresión diferencial. *AfimHEC1* se detecta en el ovario y en los estambres, mientras que *AfimHEC3* se detecta específicamente en el estigma, los estambres, el estilo, los óvulos maduros, y débilmente en el ovario (Pérez-Mesa et al., 2020).

Así, aunque los patrones de expresión por fuera de las familias Brassicaceae y Solanaceae son escasos y no homogéneos en cuanto a órganos muestreados y estadio del desarrollo, puede extraerse un patrón generalizado de expresión. Según los datos, los ortólogos de *HEC1/HEC2* parecen estar principalmente asociados al desarrollo vegetativo, estando también frecuentemente expresados durante el desarrollo floral temprano, mientras que los ortólogos de *HEC3* parecen ser predominantes durante el desarrollo de los órganos fértiles, como el gineceo y las anteras, además de etapas previas a la maduración del fruto. Sin embargo, con estos análisis no es posible extrapolar con seguridad el papel de los genes *HEC1/2* en el desarrollo reproductivo de las Angiospermas, aunque si apoyan la hipótesis del papel preponderante de los genes *HEC3* durante la diferenciación de los tejidos más distales del gineceo y la maduración del fruto, ya que en los distintos estudios revisados asocian directamente a los genes *HEC3* con el desarrollo de estas estructuras.

El éxito de la reproducción de las plantas depende de las interacciones polen-gineceo que se producen en el estigma y el estilo (Quiapim et al., 2009). El análisis funcional en *Arabidopsis* indica que los genes *HEC* son redundantes en el desarrollo del estigma, pero no parecen contribuir de un modo muy significativo al desarrollo del estilo (Gremski et al., 2007). En contraste, el mutante *Nibehec3a*-CRISPR posee un estilo más corto (**Fig. 25H-I**), lo que sugiere que los genes *HEC3* son más importantes para el desarrollo del estilo en *N. benthamiana* que en

Arabidopsis. Esto podría tener dos explicaciones: el tamaño del estilo del mutante *Nibehec3a*-CRISPR podría deberse a un efecto indirecto de los defectos en el estigma y del tracto de transmisión como lo muestran experimentos de ablación tóxica de estos tejidos descritos en diferentes estudios (Thorsness et al., 1991; 1993 Goldman et al., 1994); o este fenotipo podría asociarse directamente con el flujo de auxinas y citoquininas hacia el extremo más distal del gineceo (Eklund et al., 2010; Sidaway-Lee et al., 2010; Josse et al., 2011; Reymond et al., 2012; Baylis et al., 2013; Schuster et al., 2014; Gaillochet et al., 2017; Reyes-Olalde et al., 2017).

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que *SPT* puede heterodimerizar con *HEC3* e *IND* para regular el transporte de auxinas a través de los genes *PINOID (PID)* y *WAG2* (Girin et al., 2011; Gremski et al., 2007; Gaillochet et al., 2017; Reyes-Olalde et al., 2017). Además, se ha demostrado que los genes *HEC* afectan la respuesta de las auxinas y citoquininas durante el desarrollo del tejido reproductivo (Schuster et al., 2015). Sin embargo, la ausencia del gen *IND* por fuera de las Brassicaceae y la presencia de genes *SPT* en todas las Angiospermas (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017) promueve la idea de que *SPT* junto con los genes *HEC3* previos a la duplicación podrían mediar la respuesta y el transporte de hormonas hacia la región más distal del gineceo en el resto de las Angiospermas que no son Brassicaceae, lo que podría explicar el acortamiento del estilo en los mutantes *Nibehec3a*-CRISPR en *N. benthamiana*.

La ausencia de papilas estigmáticas y de tracto de transmisión resulta en gineceos completamente estériles, lo que implica que la correcta formación y diferenciación de los tejidos más apicales del gineceo son esenciales para la reproducción de las plantas con flor (Goldman et al., 1994, Gremski et al., 2007). Al igual que el mutante *hec1 hec2 hec3* en *Arabidopsis*, el mutante de pérdida de función *Nibehec3a*-CRISPR presenta ausencia total de papilas estigmáticas y del tracto de transmisión (Fig. 26; Gremski et al., 2007). Aquí es importante resaltar que en *Arabidopsis*, *HEC3* es importante pero no esencial para la correcta formación de los tejidos apicales del gineceo, dada la redundancia funcional que presentan los factores *HEC* en esta especie. Sin embargo, en *N. benthamiana* *NibeHEC3a* sí es necesario y esencial para la correcta formación del gineceo, como lo apoyan nuestros datos de expresión y los defectos del mutante simple *Nibehec3a*-CRISPR (Fig. 16; 26). Esto indica que la conservación funcional de los ortólogos de *HEC3* en la diferenciación de los tejidos más apicales del gineceo en eudicotiledóneas es muy probable. Junto a los datos de expresión obtenidos en otras Angiospermas, sugiere, además, que la función ancestral de los genes *HEC3* en el desarrollo del gineceo de las Angiospermas podría ser ésta, y permite discutir acerca del papel de *HEC1/HEC2*, y si su función ancestral previa a la diversificación de las Angiospermas es la misma o, por el contrario es otra y su contribución al desarrollo del gineceo ha sido facilitada en algunas familias por la evolución conjunta del linaje y la diversificación de sus patrones de expresión.

***NibeHEC3* está implicado en la formación de la zona de dehiscencia de frutos y anteras.**

Los genes *NibeHEC3a* se expresan en las zonas de dehiscencia del fruto y de las anteras (Fig. 16- 17), lo que se corresponde con los fenotipos de pérdida de función, donde las plantas

Nibehec3a-CRISPR poseen frutos y anteras indehiscentes (**Fig. 28-30**). Esto sugiere que *NibeHEC3a* participa en la correcta diferenciación de los tejidos de la zona de dehiscencia.

La familia Brassicaceae posee mayoritariamente frutos secos dehiscentes. Los estudios realizados en estas especies han demostrado el papel esencial del gen *IND* en la correcta diferenciación de la zona de dehiscencia (Liljegren et al., 2004; Girin et al., 2010; Avino et al., 2012; Muhlhausen et al., 2013; Lenser & Theissen, 2013; Lenser et al., 2016). Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, *IND* es un parálogo específico de la familia Brassicaceae, por lo que las demás Angiospermas tienen al menos una copia pre-duplicación más similar al gen *HEC3* (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017).

Por tanto, los resultados obtenidos a partir de la caracterización funcional de *NibeHEC3a* apoyan que en otras especies que no son Brassicaceae y también poseen frutos secos dehiscentes como *N. benthamiana*, podría ser el gen *HEC3* el que desempeña la función de *IND* en la formación de la zona de dehiscencia del fruto, al menos en eudicotiledóneas.

Esto nos permite hipotetizar acerca de la evolución del linaje *HEC1/2/3/IND*. Es posible suponer que el clado *HE3/IND* se ha subfuncionalizado, durante la diversificación de las Brassicaceae. Entonces, las funciones ancestrales del clado *HEC3-Like*, se asocian con el desarrollo de gineceo y el fruto en las especies previas a la diversificación de las Brassicaceae, como *N. benthamiana*. Así, durante la diversificación de Brassicaceae estas funciones fueron repartidas en *HEC1/2/3* e *IND*, respectivamente.

Un elemento que se ha descrito como generalmente conservado en el desarrollo de frutos es el módulo regulador *FUL-SHP*, el cual tiene funciones conservadas en la formación de la zona de dehiscencia en frutos secos dehiscentes y es importante en el proceso de maduración de los frutos carnosos. (Ferrandiz et al., 2000; Liljegren et al., 2000; Smykal et al., 2007; Itkin et al., 2009; Tadiello et al., 2009; Giménez et al., 2010; Pan et al., 2010; Bemer et al., 2012; Fourquin & Ferrandiz, 2012; Shima et al., 2013). En *Arabidopsis* y otras Brassicaceae, *IND* está regulado directamente por el módulo regulador *FUL-SHP*, siendo reprimido por *FUL* y activado por los genes *SHP* (Ferrandiz et al., 2000; Liljegren et al., 2004)

Entonces, la correcta formación del fruto en las Angiospermas sugiere la conservación de una red genética común *FUL-SHP-IND/HEC3*. Así, la red formada por los genes *FUL-SHP-IND*, que guía la diferenciación de la zona de dehiscencia en Brassicaceae (Ferrandiz et al., 2000; Liljegren et al., 2000; 2004), se podría conservar en el resto de las Angiospermas con una ligera modificación donde el gen *HEC3* toma el lugar *IND* y forma el módulo *FUL-SHP-HEC3*, lo que se ve apoyado por nuestros resultados y los trabajos previos realizados en eudicotiledóneas (Smykal et al., 2007; Fourquin & Ferrandiz, 2012; Fourquin et al., 2013). Por esta razón, si *HEC3* está haciendo las funciones de *IND*, cobra especial interés estudiar si también está regulado de la misma manera en otras especies de Angiospermas, aunque estos estudios, hasta la fecha, no han sido abordados.

Otra de las funciones que pudimos identificar durante la caracterización de *NibeHEC3a* es el fenotipo de anteras indehiscentes en nuestro mutante por pérdida de función (**Fig. 29-30**). Hasta el momento no se había asociado a los genes del linaje *HEC1/2/3/IND* con la dehiscencia de las anteras. Nuestros resultados sugieren, basados en los patrones de expresión y la

caracterización fenotípica del mutante, que los defectos en la dehiscencia están directamente asociados con la diferenciación de las células del estomio a lo largo de la zona de dehiscencia de las anteras (Fig. 18).

Curiosamente, en otras especies como *Aristolochia fimbriata*, *Prunus persica* y algunas Solanaceae como *Solanum lycopersicum*, y *Capsicum annuum*, la expresión de los ortólogos de *ALC*, *SPT* y *HEC3* se detecta durante el desarrollo de las anteras (Botton et al., 2016; Ortiz-Ramirez et al., 2019; Pérez-Mesa et al., 2020). Además, *IND* y *SPT* se expresan en la zona de dehiscencia de las anteras durante el desarrollo de *Arabidopsis* (Heisler et al., 2001; Liljegren et al., 2004). Sin embargo, no se han observado anteras indehiscentes en los distintos mutantes simples reportados para estos genes, ni en las combinaciones mutantes correspondientes. Además, datos aún no publicados y generados en nuestro laboratorio muestran que el cuádruple mutante *hec1, hec2 hec3 ind* no tiene diferencias morfológicas en la zona de dehiscencia de las anteras con respecto al silvestre (González-Silva; Dreni et al., resultados no publicados). No obstante, el doble mutante *hec3 arf8* desarrolla anteras indehiscentes en *Arabidopsis* (Kay et al., 2013), por lo que creemos que la función de *HEC3* en el proceso de dehiscencia de las anteras podría estar conservada desde el ancestro *HEC3/IND* de las Angiospermas, aunque suplementadas por otras funciones génicas en algunas especies. Por otro lado, resultados preliminares de la caracterización funcional del ortólogo de *HEC3* en *Oryza sativa*, *osHEC3*, revelan que el mutante *oshec3* tiene anteras indehiscentes, y además el desarrollo del estigma también se encuentra levemente afectado (Dreni, Ferrandiz, resultados no publicados).

Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de la subfuncionalización de *HEC3* e *IND* en Brassicaceae y sugieren que la función del gen *HEC3* en la dehiscencia de las anteras se ha perdido o modificado durante la diversificación de la familia Brassicaceae. En contraste, esta función se mantiene en las especies diversificadas antes de este evento de duplicación ocurrido en Brassicaceae, como *N. benthamiana* y *O. sativa*.

Por tanto, sugerimos estudios funcionales en mutantes con anteras indehiscentes de otras especies de Angiospermas que nos permita explicar la contribución de los genes del clado *HEC3/IND* en la formación de la zona de dehiscencia a lo largo de las plantas con flor.

***HECATE/INDEHISCENT* un modelo para la evolución funcional de las Angiospermas.**

Los análisis filogenéticos sugieren que representantes del clado *HEC1/2* ya se encontraban presentes en el ancestro común más reciente de las gimnospermas y las Angiospermas (Pfannebecker et al., 2017). Según datos filogenéticos, los genes *HEC3-Like* proceden de un evento de duplicación ocurrido durante la diversificación de las Angiospermas (Pabón-Mora et al., 2014; Pfannebecker et al., 2017). Esto explica que todas las plantas con flor tengan al menos un representante de los genes *HEC3*.

Aunque los estudios que permitan explicar la historia evolutiva de los genes *HEC* son escasos, nos permiten proponer una visión generalizada acerca de la evolución de estos genes durante la diversificación de las Angiospermas.

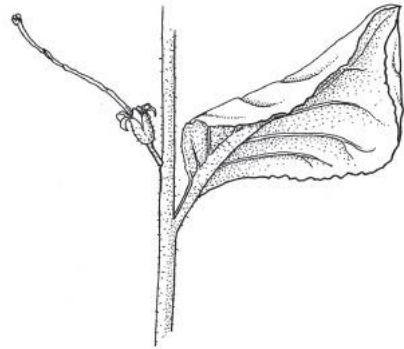
Nuestros datos sugieren que los genes *HEC1/2* están predominantemente expresados durante el desarrollo vegetativo de *Nicotiana benthamiana* (Fig. 11), lo que parece mantenerse en otras especies de la familia Solanaceae como *Nicotiana obtusifolia*, *Capsicum annuum* y *Solanum lycopersicum* (Fig. 11; Ortiz-Ramirez et al., 2018). Sin embargo, fue posible detectar expresión residual de estos genes durante el desarrollo reproductivo (Fig. 11). En otras Angiospermas de las que se tiene reporte, la expresión de los genes *HEC1/2* parece ser más preponderante en el desarrollo reproductivo que en las Solanaceae, como en *V. vinifera*, *G. hypocarpium* y *P. angustifolia*, *O. sativa*, y *A. fimbriata* (Pfannebecker et al., 2017; Pérez-Mesa et al., 2020; Salazar-Duque et al., 2021). Igualmente, en Brassicaceae, los patrones de expresión de los genes *HEC* parecen solaparse durante el desarrollo del gineceo, siendo muy concretos los estadios y tejidos en los que tienen expresión diferencial (Gremski et al., 2017). Estas diferencias entre los patrones de expresión lo podemos explicar de dos maneras:

- La primera, que la particularidad de expresión entre tejidos vegetativos asociados a los genes *HEC1/2* y a reproductivos a *HEC3* es exclusiva de Solanaceae, lo que se puede explicar por los eventos de duplicación propios de esta familia (Fig. 9; Pabón-Mora et al., 2014). Así, en el resto de las Angiospermas la relevancia de los *HEC1/2* en el desarrollo reproductivo sería probable, aunque esté por determinar. Sin embargo, en las escasas especies donde se ha estudiado, es de destacar que solo los genes *HEC3* aparecen siempre asociados a estadios avanzados del desarrollo del gineceo y del fruto (Fasoli et al., 2012; Botton et al., 2016; Pérez-Mesa et al., 2020; Salazar-Duque et al., 2021).
- La segunda, que la función ancestral de *HEC1/2*, previa a la diversificación de las Angiospermas, estuviera asociada a otros procesos de desarrollo, quizás relacionados con la señalización hormonal y el funcionamiento de los meristemas, función que ha sido reportada en *Arabidopsis* (Schuster et al., 2014). La aparición del clado *HEC3* en Angiospermas podría haber facilitado la adquisición de nuevas funciones específicas de este grupo de plantas, asociadas a la formación de los tejidos receptores y de transmisión del polen y, posteriormente, a la formación del fruto. La contribución de los genes *HEC1/2* a estas funciones en algunas especies de Angiospermas sería ocasional y favorecida por eventos concretos asociados a su diversificación.

En cuanto a la evolución específica del linaje en Brassicaceae, los datos compilados acerca de la evolución del linaje de los genes *HEC1/2/3/IND* junto con nuestros resultados, sugieren la subfuncionalización como el escenario evolutivo más probable que puede explicar los cambios funcionales del clado *HEC3/IND*, descartando la hipótesis de la neofuncionalización de *IND* en la adquisición de su papel en la dehiscencia del fruto (Kay et al., 2013). Los genes pre-duplicación *HEC3-like*, tendrían funciones ancestrales asociadas al correcto desarrollo de los tejidos apicales del gineceo y la diferenciación de la zona de dehiscencia en el fruto. Después del evento de duplicación ocurrido en Brassicaceae, los genes *HEC1/2/3* conservaron la función asociada a la diferenciación de los tejidos apicales del gineceo y es su parólogo *IND* el que realiza las funciones en la formación de la zona de dehiscencia.

Además, como se mencionó anteriormente, nuestro mutante simple *Nibehec3a*-CRISPR en *N. benthamiana* (Fig. 29-30) y el mutante de *Oshec3* en *Oryza sativa* (Dreni et al., sin publicar),

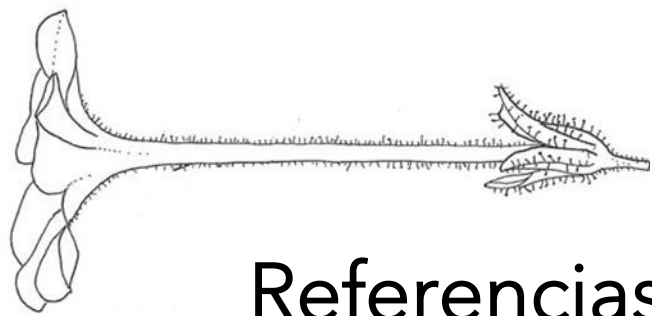
tienen anteras indehiscentes. Esto sugiere que la diferenciación de los tejidos del estomio hace parte de las funciones ancestrales de los genes *HEC3-like*, previos a la diversificación de Brassicaceae. Este escenario es difícil de reconciliar con la falta de fenotipos en anteras asociados a la pérdida completa de las funciones HEC1/2/3/IND en *Arabidopsis*, a pesar de la expresión de al menos los genes *HEC1* y *HEC3* durante el desarrollo de los primordios de anteras (Gremski et al., 2017). Es posible que el evento de duplicación del genoma ocurrido previo a la diversificación de la familia haya facilitado la adquisición de estas funciones por parte de otros factores, relacionados o no. También es posible que anatómicamente no sean completamente equivalentes las zonas de dehiscencia de las anteras de Brassicaceae y de otras familias, de modo que defectos en la degradación del estomio similares en todas las especies causados por la falta de función HEC1/2/3/IND no cause indehiscencia en algunos tipos de anteras, lo que podría explicar la falta de fenotipos con anteras indehiscentes asociados directamente con los genes *HEC*. En cualquier caso, este trabajo ha revelado una nueva función de los genes del linaje en Angiospermas que resalta su importancia evolutiva en procesos directamente relacionados con la reproducción de las flores.



Conclusiones

Este trabajo nos ha permitido caracterizar el ortólogo de *HEC3* en *Nicotiana benthamiana*, *NibeHEC3a*, y proponer hipótesis sobre la evolución funcional de estos genes en base a los resultados de esta tesis y los obtenidos en estudios previos ya publicados.

- (1) El clado *HEC1/2/3/IND* en las Angiospermas está dividido en dos subclados: *HEC1/2* y *HEC3/IND*. El número de representantes de cada subclado en diferentes especies refleja distintos eventos de duplicación globales o específicos de grupos más concretos. En este estudio hemos identificado los miembros del linaje en *Nicotiana benthamiana* y elaborado una hipótesis sobre la secuencia de duplicaciones que ha modelado el complemento de genes del linaje en esta familia de plantas a lo largo de su diversificación.
- (2) Los patrones de expresión de los genes *NibeHEC1/2* y *NibeHEC3* en *Nicotiana benthamiana* difieren notablemente, siendo *NibeHEC1/2*, detectados principalmente durante el desarrollo vegetativo, mientras que *NibeHEC3* se expresa en ambas fases del desarrollo, vegetativo y reproductivo. Durante el desarrollo floral, los genes *NibeHEC3* se expresan en todos los primordios florales y específicamente, los detectamos durante el desarrollo del gineceo en el ovario, el tracto de transmisión en el estilo y en el estigma. Además, *NibeHEC3* se expresa sobre las zonas de dehiscencia de anteras y frutos.
- (3) La generación de un mutante simple de pérdida de función para el gen *NibeHEC3a* nos permite concluir que *NibeHEC3a* es necesario para la correcta formación del tracto de transmisión y la diferenciación de papilas estigmáticas; además está asociado a la diferenciación de la zona de dehiscencia en anteras y frutos de *N. benthamiana*.
- (4) *NibeHEC3a* lleva a cabo en *Nicotiana benthamiana* las funciones en desarrollo reproductivo que en *Arabidopsis* están divididas entre todos los miembros del linaje *HEC1/2/3/IND*. Proponemos como hipótesis más probable que *HEC3* en las Angiospermas tiene como funciones ancestrales la especificación de los tejidos transmisores del polen y las zonas de dehiscencia de anteras, frutos y posiblemente semillas. La aparición de los genes *IND* como producto de un evento de duplicación previo a la diversificación de las Brassicaceae resultó en la subfuncionalización de *HEC3/IND* asociada, principalmente, a la diversificación de sus patrones de expresión. El hecho de que en *Arabidopsis* *HEC1* y *HEC2* también participen en la formación de los tejidos de transmisión puede ser explicado por su expresión en estos, pero no tenemos datos suficientes para resolver si han adquirido esta capacidad en Brassicaceae o es ancestral y la han perdido en otras familias, como las Solanaceae.



Referencias

- Alvarez, J. P., Goldshmidt, A., Efroni, I., Bowman, J. L., & Eshed, Y. (2009). The NGATHA distal organ development genes are essential for style specification in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(5), 1373–1393. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.065482>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarez, J., & Smyth, D. R. (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development (Cambridge, England)*, 126(11), 2377–2386. <https://doi.org/10.1242/dev.126.11.2377>
- Atchley, W. R., Terhalle, W., & Dress, A. (1999). Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. *Journal of Molecular Evolution*, 48(5), 501–516. <https://doi.org/10.1007/pl00006494>
- Avino, M., Kramer, E. M., Donohue, K., Hammel, A. J., & Hall, J. C. (2012). Understanding the basis of a novel fruit type in Brassicaceae: conservation and deviation in expression patterns of six genes. *EvoDevo*, 3(1), 20. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-3-20>
- Balanzà, V., Ballester, P., Colombo, M., Fourquin, C., Martínez-Fernández, I., & Ferrándiz, C. (2014). Genetic and phenotypic analyses of carpel development in Arabidopsis. In *Flower Development: Methods and Protocols* (pp. 231–249).
- Ballester, P., Martínez-Godoy, M. A., Ezquerro, M., Navarrete-Gómez, M., Trigueros, M., Rodríguez-Concepción, M., & Ferrándiz, C. (2021). A transcriptional complex of NGATHA and bHLH transcription factors directs stigma development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 33(12), 3645–3657. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab236>
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M. M., & Waterhouse, P. M. (2018). The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: A plant for all reasons. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 405–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050141>
- Bally, J., Nakasugi, K., Jia, F., Jung, H., Ho, S. Y. W., Wong, M., Paul, C. M., Naim, F., Wood, C. C., Crowhurst, R. N., Hellens, R. P., Dale, J. L., & Waterhouse, P. M. (2015). The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour. *Nature Plants*, 1(11). <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.165>
- Bäurle, I., & Dean, C. (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, 125(4), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.005>
- Baylis, T., Cierlik, I., Sundberg, E., & Mattsson, J. (2013). SHORT INTERNODES/STYLISH genes, regulators of auxin biosynthesis, are involved in leaf vein development in Arabidopsis thaliana. *The New Phytologist*, 197(3), 737–750. <https://doi.org/10.1111/nph.12084>
- Bemer, M., Karlova, R., Ballester, A. R., Tikunov, Y. M., Bovy, A. G., Wolters-Arts, M., Rossetto, P. de B., Angenent, G. C., & de Maagd, R. A. (2012). The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *The Plant Cell*, 24(11), 4437–4451. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103283>
- Bombarely, A., Rosli, H. G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L. A., & Martin, G. B. (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 25(12), 1523–1530. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0148-TA>
- Botton, A., Rasori, A., Ziliotto, F., Moing, A., Maucourt, M., Bernillon, S., Deborde, C., Petterle, A., Varotto, S., & Bonghi, C. (2016). The peach HECATE3-like gene FLESHY plays a double role during fruit development. *Plant Molecular Biology*, 91(1–2), 97–114. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0445-z>
- Bowman, J. L., & Smyth, D. R. (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development (Cambridge, England)*, 126(11), 2387–2396. <https://doi.org/10.1242/dev.126.11.2387>

- Bowman, J. L., Smyth, D. R., & Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1(1), 37–52. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.1.37>
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., & Meyerowitz, E. M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* (Cambridge, England), 112(1), 1–20. <https://doi.org/10.1242/dev.112.1.1>
- Carrizo García, C., Matesevach, M., & Barboza, G. (2008). Features related to anther opening in *Solanum* species (Solanaceae): ANTHOR OPENING INSOLANUM. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Linnean Society of London, 158(2), 344–354. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00885.x>
- Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., & Davies, B. (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.10.005>
- Cauz-Santos, L. A., Dodsworth, S., Samuel, R., Christenhusz, M. J. M., Patel, D., Shittu, T., Jakob, A., Paun, O., & Chase, M. W. (2022). Variation of the *Rdr1* gene insertion in wild populations of *Nicotiana benthamiana* (Solanaceae) and insights into recent species divergence. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.02.01.478068>
- Cecchetti, V., Altamura, M. M., Brunetti, P., Petrocelli, V., Falasca, G., Ljung, K., Costantino, P., & Cardarelli, M. (2013). Auxin controls *Arabidopsis* anther dehiscence by regulating endothecium lignification and jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 74(3), 411–422. <https://doi.org/10.1111/tpj.12130>
- Chanderbali, A. S., Yoo, M.-J., Zahn, L. M., Brockington, S. F., Wall, P. K., Gitzendanner, M. A., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Altman, N. S., Ma, H., dePamphilis, C. W., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2010). Conservation and canalization of gene expression during angiosperm diversification accompany the origin and evolution of the flower. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(52), 22570–22575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013395108>
- Chase, M. W., & Christenhusz, M. J. M. (2018). 890. *Nicotiana benthamiana*: Solanaceae. *Curtis's Botanical Magazine*, 35(3), 286–294. <https://doi.org/10.1111/curt.12249>
- Chase, M. W., Cauz-Santos, L. A., Dodsworth, S., & Christenhusz, M. J. M. (2022). Taxonomy of the Australian. *Australian Systematic Botany*, 35(5), 345–363. <https://doi.org/10.1071/sb22009>
- Chung, M.-Y., Nath, U. K., Vrebalov, J., Gapper, N., Lee, J. M., Lee, D.-J., Kim, C. K., & Giovannoni, J. (2020). Ectopic expression of miRNA172 in tomato (*Solanum lycopersicum*) reveals novel function in fruit development through regulation of an AP2 transcription factor. *BMC Plant Biology*, 20(1), 283. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02489-y>
- Coen, E. S., & Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353(6339), 31–37. <https://doi.org/10.1038/353031a0>
- 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. *Developmental Biology*, 337(2), 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.043>
- Daum, G., Medzihradsky, A., Suzaki, T., & Lohmann, J. U. (2014). A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), 14619–14624. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406446111>
- Dong, Y., Burch-Smith, T. M., Liu, Y., Mamillapalli, P., & Dinesh-Kumar, S. P. (2007). A ligation-independent cloning tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for NbMADS4-1 and -2 in floral development. *Plant Physiology*, 145(4), 1161–1170. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107391>
- Dreni, L., Pilatone, A., Yun, D., Erreni, S., Pajoro, A., Caporali, E., Zhang, D., & Kater, M. M. (2011). Functional analysis of all AGAMOUS subfamily members in rice reveals their roles in reproductive organ identity determination and meristem determinacy. *The Plant Cell*, 23(8), 2850–2863. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087007>

Eklund, D. M., Ståldal, V., Valsecchi, I., Cierlik, I., Eriksson, C., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Sundström, J. F., Thelander, M., Ezcurra, I., & Sundberg, E. (2010). The Arabidopsis thaliana STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *The Plant Cell*, 22(2), 349–363. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064816>

Esau, K. (1967). *Plant Anatomy*. John Wiley & Sons.

Fasoli, M., Dal Santo, S., Zenoni, S., Tornielli, G. B., Farina, L., Zamboni, A., Porceddu, A., Venturini, L., Bicego, M., Murino, V., Ferrarini, A., Delledonne, M., & Pezzotti, M. (2012). The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. *The Plant Cell*, 24(9), 3489–3505. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100230>

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. *The Plant Cell*, 15(11), 2603–2611. <https://doi.org/10.1105/tpc.015123>

Feng, X., & Dickinson, H. G. (2007). Packaging the male germline in plants. *Trends in Genetics: TIG*, 23(10), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.08.005>

Ferrándiz, C., Liljegren, S. J., & Yanofsky, M. F. (2000). Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5478), 436–438. <https://doi.org/10.1126/science.289.5478.436>

Ferrándiz, Cristina, & Fourquin, C. (2014). Role of the FUL-SHP network in the evolution of fruit morphology and function. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4505–4513. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert479>

Ferrándiz, Cristina. (2002). Regulation of fruit dehiscence in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2031–2038. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf082>

Fourquin, C., & Ferrándiz, C. (2012). Functional analyses of AGAMOUS family members in *Nicotiana benthamiana* clarify the evolution of early and late roles of C-function genes in eudicots: AG-like genes in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 71(6), 990–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2012.05046.x>

Fourquin, C., & Ferrándiz, C. (2014). The essential role of NGATHA genes in style and stigma specification is widely conserved across eudicots. *The New Phytologist*, 202(3), 1001–1013. <https://doi.org/10.1111/nph.12703>

Fourquin, C., del Cerro, C., Victoria, F. C., Vialette-Guiraud, A., de Oliveira, A. C., & Ferrándiz, C. (2013). A change in SHATTERPROOF protein lies at the origin of a fruit morphological novelty and a new strategy for seed dispersal in medicago genus. *Plant Physiology*, 162(2), 907–917. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217570>

Fujisawa, M., Shima, Y., Nakagawa, H., Kitagawa, M., Kimbara, J., Nakano, T., Kasumi, T., & Ito, Y. (2014). Transcriptional regulation of fruit ripening by tomato FRUITFULL homologs and associated MADS box proteins. *The Plant Cell*, 26(1), 89–101. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119453>

Gaillochet, C., Stiehl, T., Wenzl, C., Ripoll, J.-J., Bailey-Steinitz, L. J., Li, L., Pfeiffer, A., Miotk, A., Hakenjos, J. P., Forner, J., Yanofsky, M. F., Marciniak-Czochra, A., & Lohmann, J. U. (2017). Control of plant cell fate transitions by transcriptional and hormonal signals. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.30135>

Garceau, D. C., Batson, M. K., & Pan, I. L. (2017). Variations on a theme in fruit development: the PLE lineage of MADS-box genes in tomato (TAGL1) and other species. *Planta*, 246(2), 313–321. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2725-5>

Garrett, J. J. T., Meents, M. J., Blackshaw, M. T., Blackshaw, L. C., Hou, H., Styranko, D. M., Kohalmi, S. E., & Schultz, E. A. (2012). A novel, semi-dominant allele of MONOPTEROS provides insight into leaf initiation and vein pattern formation. *Planta*, 236(1), 297–312. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1607-0>

Gasser, C. S., & Robinson-Beers, K. (1993). Pistil development. *The Plant Cell*, 5(10), 1231–1239. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1231>

Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M. T., Atarés, A., Pérez-Martín, F., García-Sogo, B., Angosto, T., Moreno, V., & Lozano, R. (2010). Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One*, 5(12), e14427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014427>

Girin, T., Paicu, T., Stephenson, P., Fuentes, S., Körner, E., O'Brien, M., Sorefan, K., Wood, T. A., Balanzá, V., Ferrándiz, C., Smyth, D. R., & Østergaard, L. (2011). INDEHISCENT and SPATULA interact to specify carpel and valve margin tissue and thus promote seed dispersal in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(10), 3641–3653. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090944>

Girin, T., Stephenson, P., Goldsack, C. M. P., Kempin, S. A., Perez, A., Pires, N., Sparrow, P. A., Wood, T. A., Yanofsky, M. F., & Østergaard, L. (2010). Brassicaceae INDEHISCENT genes specify valve margin cell fate and repress replum formation: Tissue specification by INDEHISCENT in Brassicaceae. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 63(2), 329–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04244.x>

Goldman, M. H., Goldberg, R. B., & Mariani, C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *The EMBO Journal*, 13(13), 2976–2984. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06596.x>

Gomariz-Fernández, A., Sánchez-Gerschon, V., Fourquin, C., & Ferrándiz, C. (2017). The role of SHI/STY/SRS genes in organ growth and carpel development is conserved in the distant eudicot species *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 814. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00814>

Gremski, K., Ditta, G., & Yanofsky, M. F. (2007). The HECATE genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 134(20), 3593–3601. <https://doi.org/10.1242/dev.011510>

Groszmann, M., Bylstra, Y., Lampugnani, E. R., & Smyth, D. R. (2010). Regulation of tissue-specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 61(5), 1495–1508. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq015>

Groszmann, M., Paicu, T., Alvarez, J. P., Swain, S. M., & Smyth, D. R. (2011). SPATULA and ALCATRAZ, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for *Arabidopsis* gynoecium and fruit development: Redundancy of SPATULA and ALCATRAZ. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 68(5), 816–829. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04732.x>

Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M. F., & Martienssen, R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development (Cambridge, England)*, 125(8), 1509–1517. <https://doi.org/10.1242/dev.125.8.1509>

Hands, P., Vosnakis, N., Betts, D., Irish, V. F., & Drea, S. (2011). Alternate transcripts of a floral developmental regulator have both distinct and redundant functions in opium poppy. *Annals of Botany*, 107(9), 1557–1566. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr045>

Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P. C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), 735–747. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg088>

Heisler, M. G., Atkinson, A., Bylstra, Y. H., Walsh, R., & Smyth, D. R. (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development (Cambridge, England)*, 128(7), 1089–1098. <https://doi.org/10.1242/dev.128.7.1089>

Hollister, J. D. (2015). Polyploidy: adaptation to the genomic environment. *The New Phytologist*, 205(3), 1034–1039. <https://doi.org/10.1111/nph.12939>

Itkin, M., Seybold, H., Breitel, D., Rogachev, I., Meir, S., & Aharoni, A. (2009). TOMATO AGAMOUS-LIKE1 is a component of the fruit ripening regulatory network: TOMATO AGAMOUS-LIKE1 and fruit ripening. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 60(6), 1081–1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04064.x>

Ito, Y., Sekiyama, Y., Nakayama, H., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Shima, Y., Nakamura, N., Kotake-Nara, E., Kawasaki, S., Hirose, S., & Toki, S. (2020). Allelic mutations in the ripening -inhibitor locus generate extensive variation in tomato ripening. *Plant Physiology*, 183(1), 80–95. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00020>

Jiao, Y., Wickett, N. J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A. S., Landherr, L., Ralph, P. E., Tomsho, L. P., Hu, Y., Liang, H., Soltis, P. S., Soltis, D. E., Clifton, S. W., Schlarbaum, S. E., Schuster, S. C., Ma, H., Leebens-Mack, J., & dePamphilis, C. W. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*, 473(7345), 97–100. <https://doi.org/10.1038/nature09916>

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.-I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

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. *The New Phytologist*, 197(1), 73–87. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04373.x>

Khanna, R., Huq, E., Kikis, E. A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., & Quail, P. H. (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *The Plant Cell*, 16(11), 3033–3044. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025643>

Knapp, S. (2002). Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2001–2022. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf068>

Koltunow, A. M., Truettner, J., Cox, K. H., Wallroth, M., & Goldberg, R. B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *The Plant Cell*, 1201–1224. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.12.1201>

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Long, J. A., Fridborg, I., & Sundberg, E. (2002). STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development. *Development (Cambridge, England)*, 129(20), 4707–4717. <https://doi.org/10.1242/dev.129.20.4707>

Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Magnus Eklund, D., & Sundberg, E. (2006). Functionally redundantSHIfamily genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 47(1), 99–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2006.02774.x>

Lee, J.-Y., Baum, S. F., Oh, S.-H., Jiang, C.-Z., Chen, J.-C., & Bowman, J. L. (2005). Recruitment of CRABS CLAW to promote nectary development within the eudicot clade. *Development (Cambridge, England)*, 132(22), 5021–5032. <https://doi.org/10.1242/dev.02067>

Leitch, I. J., Hanson, L., Lim, K. Y., Kovarik, A., Chase, M. W., Clarkson, J. J., & Leitch, A. R. (2008). The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*, 101(6), 805–814. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm326>

Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, 16(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.003>

Lenser, T., & Theißen, G. (2013). Molecular mechanisms involved in convergent crop domestication. *Trends in Plant Science*, 18(12), 704–714. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.007>

Lenser, T., Graeber, K., Cevik, Ö. S., Adigüzel, N., Dönmez, A. A., Grosche, C., Kettermann, M., Mayland-Quellhorst, S., Mérai, Z., Mohammadin, S., Nguyen, T.-P., Rümpler, F., Schulze, C., Sperber, K., Steinbrecher, T., Wiegand, N., Strnad, M., Scheid, O. M., Rensing, S. A., ... Leubner-Metzger, G. (2016). Developmental control and plasticity of fruit and seed dimorphism in *Aethionema arabicum*. *Plant Physiology*, 172(3), 1691–1707. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00838>

Leseberg, C. H., Eissler, C. L., Wang, X., Johns, M. A., Duvall, M. R., & Mao, L. (2008). Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2253–2265. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern094>

Li, X., Duan, X., Jiang, H., Sun, Y., Tang, Y., Yuan, Z., Guo, J., Liang, W., Chen, L., Yin, J., Ma, H., Wang, J., & Zhang, D. (2006). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(4), 1167–1184. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080580>

Liljegren, 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(6779), 766–770. <https://doi.org/10.1038/35008089>

Liljegren, 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(6), 843–853. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00217-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00217-x)

Liu, Y., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 31(6), 777–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01394.x>

Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., & Giovannoni, J. J. (2011). The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiology*, 157(3), 1568–1579. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181107>

Martínez-Fernández, I., Sanchís, S., Marini, N., Balanzá, V., Ballester, P., Navarrete-Gómez, M., Oliveira, A. C., Colombo, L., & Ferrándiz, C. (2014). The effect of NGATHA altered activity on auxin signaling pathways within the *Arabidopsis* gynoecium. *Frontiers in Plant Science*, 5, 210. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00210>

Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 429–440. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.2.429-440.2000>

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2012). The CIPRES science gateway: Enabling high-impact science for phylogenetics researchers with limited resources. *Proceedings of the 1st Conference of the Extreme Science and Engineering Discovery Environment on Bridging from the EXtreme to the Campus and beyond - XSEDE '12*.

Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *The Plant Cell*, 17(11), 2993–3006. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036004>

Morel, P., Heijmans, K., Ament, K., Choppy, M., Trehin, C., Chambrier, P., Rodrigues Bento, S., Bimbo, A., & Vandenbussche, M. (2018). The floral C-lineage genes trigger nectary development in petunia and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 30(9), 2020–2037. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00425>

Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R., & Reed, J. W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development (Cambridge, England)*, 132(18), 4107–4118. <https://doi.org/10.1242/dev.01955>

Nakayama, H., Yamaguchi, T., & Tsukaya, H. (2010). Expression patterns of AaDL, a CRABS CLAW ortholog in *Asparagus asparagoides* (Asparagaceae), demonstrate a stepwise evolution of CRC/DL

subfamily of YABBY genes. *American Journal of Botany*, 97(4), 591–600. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900378>

Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., & Swain, S. M. (2009). ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are Polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(1), 216–233. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063768>

Orashakova, S., Lange, M., Lange, S., Wege, S., & Becker, A. (2009). The CRABS CLAW ortholog from California poppy (*Eschscholzia californica*, Papaveraceae), EcCRC, is involved in floral meristem termination, gynoeceum differentiation and ovule initiation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 58(4), 682–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03807.x>

Ortiz-Ramírez, C. I., Giraldo, M. A., Ferrándiz, C., & Pabón-Mora, N. (2019). Expression and function of the bHLH genes ALCATRAZ and SPATULA in selected Solanaceae species. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 99(4), 686–702. <https://doi.org/10.1111/tpj.14352>

Ortiz-Ramírez, C. I., Plata-Arboleda, S., & Pabón-Mora, N. (2018). Evolution of genes associated with gynoeceum patterning and fruit development in Solanaceae. *Annals of Botany*, 121(6), 1211–1230. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy007>

Pabón Mora, N., & González, F. (2016). Novel structures in plants, developmental evolution of. In *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (pp. 146–166). Elsevier.

Pabón-Mora, N., & Litt, A. (2011). Comparative anatomical and developmental analysis of dry and fleshy fruits of Solanaceae. *American Journal of Botany*, 98(9), 1415–1436. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100097>

Pabón-Mora, N., Wong, G. K.-S., & Ambrose, B. A. (2014). Evolution of fruit development genes in flowering plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 300. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00300>

Pan, I. L., McQuinn, R., Giovannoni, J. J., & Irish, V. F. (2010). Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1795–1806. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq046>

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(6783), 200–203. <https://doi.org/10.1038/35012103>

Pelaz, S., Tapia-López, R., Alvarez-Buylla, E. R., & Yanofsky, M. F. (2001). Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Current Biology: CB*, 11(3), 182–184. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00024-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00024-0)

Peréz-Mesa, P., Ortíz-Ramírez, C. I., González, F., Ferrándiz, C., & Pabón-Mora, N. (2020). Expression of gynoeceum patterning transcription factors in *Aristolochia fimbriata* (Aristolochiaceae) and their contribution to gynostemium development. *EvoDevo*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00149-8>

Pfannebecker, K. C., Lange, M., Rupp, O., & Becker, A. (2017). Seed plant-specific gene lineages involved in carpel development. *Molecular Biology and Evolution*, 34(4), 925–942. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw297>

Pires, N., & Dolan, L. (2010a). Early evolution of bHLH proteins in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 5(7), 911–912. <https://doi.org/10.4161/psb.5.7.12100>

Pires, N., & Dolan, L. (2010b). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 27(4), 862–874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp288>

Qi, T., Huang, H., Song, S., & Xie, D. (2015). Regulation of jasmonate-mediated stamen development and seed production by a bHLH-MYB complex in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(6), 1620–1633. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00116>

Quiapim, A. C., Brito, M. S., Bernardes, L. A. S., Dasilva, I., Malavazi, I., DePaoli, H. C., Molfetta-Machado, J. B., Giuliatti, S., Goldman, G. H., & Goldman, M. H. S. (2009). Analysis of the *Nicotiana tabacum* stigma/style transcriptome reveals gene expression differences between wet and dry stigma species. *Plant Physiology*, 149(3), 1211–1230. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131573>

Rajani, S., & Sundaresan, V. (2001). The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology: CB*, 11(24), 1914–1922. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00593-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00593-0)

Renny-Byfield, S., & Wendel, J. F. (2014). Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany*, 101(10), 1711–1725. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400119>

Reyes-Olalde, J. I., Zúñiga-Mayo, V. M., Serwatowska, J., Chavez Montes, R. A., Lozano-Sotomayor, P., Herrera-Ubaldo, H., Gonzalez-Aguilera, K. L., Ballester, P., Ripoll, J. J., Ezquer, I., Paolo, D., Heyl, A., Colombo, L., Yanofsky, M. F., Ferrandiz, C., Marsch-Martínez, N., & de Folter, S. (2017). The bHLH transcription factor *SPATULA* enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoecium. *PLoS Genetics*, 13(4), e1006726. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006726>

Riechmann, J. L., & Wellmer, F. (2014). *Flower Development: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology) 2014th Edición.

Ripoll, J. J., Roeder, A. H. K., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (2011). A novel role for the floral homeotic gene *APETALA2* during *Arabidopsis* fruit development. *Development (Cambridge, England)*, 138(23), 5167–5176. <https://doi.org/10.1242/dev.073031>

Robinson, K. A., Koepke, J. I., Kharodawala, M., & Lopes, J. M. (2000). A network of yeast basic helix-loop-helix interactions. *Nucleic Acids Research*, 28(22), 4460–4466. <https://doi.org/10.1093/nar/28.22.4460>

Roeder, A. H. K., Ferrándiz, C., & Yanofsky, M. F. (2003). The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Current Biology: CB*, 13(18), 1630–1635. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.027>

Roth, I. (1977). *Handbuch der Pflanzenanatomie. Encyclopedia of plant anatomy. Traité d'anatomie végétale / Fruits of Angiosperms* (H. J. Braun, S. Carlquist, P. Ozenda, & I. Roth, Eds.). Borntraeger.

Salazar-Duque, H., Alzate, J. F., Urrea Trujillo, A., Ferrándiz, C., & Pabón-Mora, N. (2021). Comparative anatomy and genetic bases of fruit development in selected Rubiaceae (Gentianales). *American Journal of Botany*, 108(10), 1838–1860. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1785>

Sanders, P. M., Bui, A. Q., Weterings, K., McIntire, K. N., Hsu, Y.-C., Lee, P. Y., Truong, M. T., Beals, T. P., & Goldberg, R. B. (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction*, 11(6), 297–322. <https://doi.org/10.1007/s004970050158>

Sanderson, M. J., & Doyle, J. A. (2001). Sources of error and confidence intervals in estimating the age of angiosperms from *rbcl* and 18S rDNA data. *American Journal of Botany*, 88(8), 1499–1516. <https://doi.org/10.2307/3558458>

Schuster, C., Gaillochet, C., & Lohmann, J. U. (2015). *Arabidopsis* *HECATE* genes function in phytohormone control during gynoecium development. *Development (Cambridge, England)*, 142(19), 3343–3350. <https://doi.org/10.1242/dev.120444>

Schuster, C., Gaillochet, C., Medzihradzky, A., Busch, W., Daum, G., Krebs, M., Kehle, A., & Lohmann, J. U. (2014). A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Developmental Cell*, 28(4), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.013>

Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., & Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4983), 931–936. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.931>

- Scott, R. J., Spielman, M., & Dickinson, H. G. (2004). Stamen structure and function. *The Plant Cell*, 16 Suppl(suppl_1), S46-60. <https://doi.org/10.1105/tpc.017012>
- Scutt, C. P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Finet, C., & Dumas, C. (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *Journal of Experimental Botany*, 57(10), 2143–2152. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj188>
- Shima, Y., Kitagawa, M., Fujisawa, M., Nakano, T., Kato, H., Kimbara, J., Kasumi, T., & Ito, Y. (2013). Tomato FRUITFULL homologues act in fruit ripening via forming MADS-box transcription factor complexes with RIN. *Plant Molecular Biology*, 82(4–5), 427–438. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0071-y>
- Smykal, P., Gennen, J., De Bodt, S., Ranganath, V., & Melzer, S. (2007). Flowering of strict photoperiodic *Nicotiana* varieties in non-inductive conditions by transgenic approaches. *Plant Molecular Biology*, 65(3), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9211-6>
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2021). Plant genomes: Markers of evolutionary history and drivers of evolutionary change. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 3(1), 74–82. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10159>
- Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic Biology*, 57(5), 758–771. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>
- Sun, W., Huang, W., Li, Z., Song, C., Liu, D., Liu, Y., Hayward, A., Liu, Y., Huang, H., & Wang, Y. (2014). Functional and evolutionary analysis of the AP1/SEP/AGL6 superclade of MADS-box genes in the basal eudicot *Epimedium sagittatum*. *Annals of Botany*, 113(4), 653–668. <https://doi.org/10.1093/aob/mct301>
- Tadiello, A., Pavanello, A., Zanin, D., Caporali, E., Colombo, L., Rotino, G. L., Trainotti, L., & Casadoro, G. (2009). A PLENA-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 651–661. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern313>
- Tang, H., Bomhoff, M. D., Briones, E., Zhang, L., Schnable, J. C., & Lyons, E. (2015). SynFind: Compiling syntenic regions across any set of genomes on demand. *Genome Biology and Evolution*, 7(12), 3286–3298. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv219>
- Tani, E., Tsaballa, A., Stedel, C., Kalloniati, C., Papaefthimiou, D., Polidoros, A., Darzentas, N., Ganopoulos, I., Flemetakis, E., Katinakis, P., & Tsaftaris, A. (2011). The study of a SPATULA-like bHLH transcription factor expressed during peach (*Prunus persica*) fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(6), 654–663. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.020>
- Theissen, G., & Saedler, H. (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature*, 409(6819), 469–471. <https://doi.org/10.1038/35054172>
- Thorsness, M. K., Kandasamy, M. K., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1991). A Brassica S-locus gene promoter targets toxic gene expression and cell death to the pistil and pollen of transgenic *Nicotiana*. *Developmental Biology*, 143(1), 173–184. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90064-a](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90064-a)
- Thorsness, Mary K., Kandasamy, M. K., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1993). Genetic ablation of floral cells in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 5(3), 253. <https://doi.org/10.2307/3869593>
- Tisza, V., Kovács, L., Balogh, A., Heszky, L., & Kiss, E. (2010). Characterization of FaSPT, a SPATULA gene encoding a bHLH transcriptional factor from the non-climacteric strawberry fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(10–11), 822–826. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.001>
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell*, 15(8), 1749–1770. <https://doi.org/10.1105/tpc.013839>
- Trigueros, M., Navarrete-Gómez, M., Sato, S., Christensen, S. K., Pelaz, S., Weigel, D., Yanofsky, M. F., & Ferrándiz, C. (2009). The NGATHA genes direct style development in the *Arabidopsis* gynoecium. *The Plant Cell*, 21(5), 1394–1409. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.065508>

- Vazquez-Vilar, M., Bernabé-Orts, J. M., Fernandez-Del-Carmen, A., Ziarolo, P., Blanca, J., Granell, A., & Orzaez, D. (2016). A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods*, 12(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0101-2>
- Vazquez-Vilar, M., Garcia-Carpintero, V., Selma, S., Bernabé-Orts, J. M., Sanchez-Vicente, J., Salazar-Sarasua, B., Ressa, A., de Paola, C., Ajenjo, M., Quintela, J. C., Fernández-Del-Carmen, A., Granell, A., & Orzáez, D. (2021). The GB4.0 platform, an all-in-one tool for CRISPR/Cas-based multiplex genome engineering in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 689937. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.689937>
- Veltri, D., Wight, M. M., & Crouch, J. A. (2016). SimpleSynteny: a web-based tool for visualization of microsynteny across multiple species. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W41–W45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw330>
- Ventimilla, D., Velázquez, K., Ruiz-Ruiz, S., Terol, J., Pérez-Amador, M. A., Vives, M. C., Guerri, J., Talon, M., & Tadeo, F. R. (2021). IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION)-like peptides and HAE (HAESA)-like receptors regulate corolla abscission in *Nicotiana benthamiana* flowers. *BMC Plant Biology*, 21(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02994-8>
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., & Giovannoni, J. (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5566), 343–346. <https://doi.org/10.1126/science.1068181>
- Wang, K. (Ed.). (2006). *Agrobacterium Protocols: Volume I* (2nd ed.). Humana Press.
- Wilson, Z. A., Song, J., Taylor, B., & Yang, C. (2011). The final split: the regulation of anther dehiscence. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1633–1649. <https://doi.org/10.1093/jxb/err014>
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jönsson, H., & Reddy, G. V. (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes & Development*, 25(19), 2025–2030. <https://doi.org/10.1101/gad.17258511>
- Yamaguchi, T., Lee, D. Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., & Hirano, H.-Y. (2006). Functional diversification of the two C-class MADS box genes OSMADS3 and OSMADS58 in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 18(1), 15–28. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037200>
- Yamaguchi, T., Nagasawa, N., Kawasaki, S., Matsuoka, M., Nagato, Y., & Hirano, H.-Y. (2004). The YABBY gene DROOPING LEAF regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *The Plant Cell*, 16(2), 500–509. <https://doi.org/10.1105/tpc.018044>
- 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(6279), 35–39. <https://doi.org/10.1038/346035a0>
- Yellina, A. L., Orashakova, S., Lange, S., Erdmann, R., Leebens-Mack, J., & Becker, A. (2010). Floral homeotic C function genes repress specific B function genes in the carpel whorl of the basal eudicot California poppy (*Eschscholzia californica*). *EvoDevo*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-1-13>
- Zhu, L., Xin, R., Bu, Q., Shen, H., Dang, J., & Huq, E. (2016). A negative feedback loop between PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS and HECATE proteins fine-tunes photomorphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(4), 855–874. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00122>
- Zumajo-Cardona, C., Ambrose, B. A., & Pabón-Mora, N. (2017). Evolution of the SPATULA/ALCATRAZ gene lineage and expression analyses in the basal eudicot, *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *EvoDevo*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13227-017-0068-8>
- Zúñiga-Mayo, V. M., Gómez-Felipe, A., Herrera-Ubaldo, H., & de Folter, S. (2019). Gynoecium development: networks in Arabidopsis and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 70(5), 1447–1460. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz026>



Anexos

Nombre Gen	NombreArbol (Fig.1)	Código Análisis filogenético	
		SolGenomicsNetwork	Mapa de Expresión QUT/Nicotiana benthamiana Genome & Transcriptome
<i>NibeHEC1a</i>	<i>NibeHEC1</i>	Niben101Scf23305g01001.1	Nbv6.1trP2878
<i>NibeHEC1b</i>	<i>NibeHEC1-1</i>	Niben101Scf06518g02008.1	
<i>NibeHEC1c</i>	<i>NibeHEC1-2</i>	Niben101Scf00378g03005.1	Nbv6.1trP13010
<i>NibeHEC1d</i>	<i>NibeHEC1-3</i>	Niben101Scf02681g01005.1	
<i>NibeHEC2a</i>	<i>NibeHEC2</i>	Niben101Scf04995g05002.1	Nbv6.1trP34857
<i>NibeHEC2b</i>	<i>NibeHEC2-1</i>	Niben101Scf06261g01001.1	
<i>NibeHEC2c</i>	<i>NibeHEC2-2</i>	Niben101Scf04007g05007.1	Nbv6.1trP65590
<i>NibeHEC3a</i>	<i>NibeHEC3</i>	Niben101Scf00446g05004.1	Nbv6.1trP14923
<i>NibeHEC3b</i>	<i>NibeHEC3-1</i>	Niben101Scf03882g01003.1	

Tabla Suple. 1. Correspondencia de los códigos de identificación para cada uno de los genes *NibeHEC1/2/3*. Se reconoce la equivalencia de cada gen en los árboles filogenéticos (Fig. 1;2) y al mapa de expresión (Fig.20)

Tabla Suple. 2. Datos Identidad y Similitud entre las secuencias codificantes con mayor proximidad filogenética de *NibeHEC1/2/3*. Datos obtenidos a partir de un análisis de BLOSUM62 que es una matriz de sustitución utilizada para el alineamiento de secuencias proteicas.

Nombre Gen	Identidad (%)	Similitud (%)
<i>NibeHEC1a</i> <i>NibeHEC1b</i>	0,9202128 (92%)	0,9255319 (92%)
<i>NibeHEC1c</i> <i>NibeHEC1d</i>	0,7810945 (78%)	0,840796 (84%)
<i>NibeHEC2a</i> <i>NibeHEC2b</i>	0,8828125 (88%)	0,90625 (91%)
<i>NibeHEC2c</i>	NA	NA
<i>NibeHEC3a</i> <i>NibeHEC3b</i>	0,8698885 (87%)	0,9144981 (91%)

Tabla Suple.3. Lista de oligos Utilizada

Numero	Nombre	Secuencia (5'-3')
1	qRT-NibeHEC1a/b Fwd	CAGTCCTTAGAACTTGGATT
2	qRT-NibeHEC1a/b Rev	TGAGAAATTAGAGGGAGGAGA
3	qRT-NibeHEC1c/d Fwd	ACACGATCCATGAACAATATT
4	qRT-NibeHEC1c/d Rev	CTCAATATCAAGAGTCTCGTC
5	qRT-NibeHEC2a/b Fwd	ACTTCCCGACTTCTCCACTG
6	qRT-NibeHEC2a/b Rev	TCAAGAAAGTTGGTGTATTGTGA
7	qRT-NibeHEC2c/d Fwd	TGAAGATCAGATGGAAATGA
8	qRT-NibeHEC2c/d Rev	AGTATTGTTGCTAATGTTGACAC
9	qRT-NibeHEC3 Rev	AAGGTTGCGGTAGTAGCGAT
10	qRT-NibeHEC3 Fwd	TCACCTTCCACCATCACAGT
11	VIGS-NibeHEC3 Fwd	CGACGACAAGACCCTACCACCACCTTAAGCTCACA
12	VIGS-NibeHEC3 Rev	GAGGAGAAGAGCCCTTTCATCGTCTCGGGTTCTT
13	TRV1 Fwd	CTTGAAGAAGAAGACTTTCGAAGTCTC
14	TRV1 Rev	GTAAAATCATTGATAACAACACAGACAAAC
15	TRV2 Fwd	GGTCAAGGTACGTAGTAGAG
16	TRV2 Rev	CGAGAATGTCAATCTCGTAGG
17	VIGS-NbHEC3 Fwd1	GAATTCACCACCACCTTAAGCTCACA
18	VIGS-NbHEC3 Fwd2	TCTAGAACACCACCTTAAGCTCACA
19	VIGS-NbHEC3 Rev	GGATCCTTCATCGTCTCGGGTTCTT
20	NibeHEC1ab-Fwd	GCTCAGTCCTTAGAACTTGG
21	NibeHEC1a-Rev	TAATTTTCATCAATGGATGAG
22	NibeHEC1b- Rev	GATGCAATAATTGATGAAAT
23	NibeHEC1c-Fwd	GATAGGCCAATGGTTGCTGGA
24	NibeHEC1c-Rev	TTAACTTAGCATTGTCACATT
25	NibeHEC1d-Fwd	CCTACCAAATCATAACTG
26	NibeHEC1d-Rev	ATGGCGCGTTATGTTGCTCG
27	NibeHEC2ab-Fwd	TGCTCAAATCAGCAACAGCTT
28	NibeHEC2a-Rev	TGTTGCTGTTACAACCTCCAGT
29	NibeHEC2b-Rev	TCCACAGCTGTTGCTGTTAC
30	NibeHEC2cd-Fwd	GCTCAAATCTGCAGCTCCTCA
31	NibeHEC2c-Rev	AGTATTGTTGCTAATGTTGACAC
32	NibeHEC2d-Rev	CATTGTTGCTAATGTTGCTA
33	NibeHEC3 Rev1	GTAGTGTGGTCATACTG
34	NibeHEC3 Rev2	CTAGTGGTGCTGGTATCA
41	NicL25 Fwd	CCCCTACCACAGAGTCTGC
42	NicL25 Rev	AAGGGTGTTGTTGTCCTCAATCTT
43	NibeHEC3 Fwd CDS	ATGGATATCAACCACCACCT
44	NibeHEC3 Rev CDS	CTAATTACCAATTACCTCATACG
45	NibeHEC3 Fwd 5' as	CACCACCTTAAGCTCACAACCT
46	NibeHEC3 Rev 5' as	CTTAATACGACTCACTATAGGGGGCAGGATCAATATCCACTGGT
49	NibeHEC1ab Fwd	GTCCTTAGAACTTGGATTCTC
50	NibeHEC1ab Rev1	TGAGAAATTAGAGGGAGGAGA

51	NbeHEC1ab Rev2	CCACTACTATGAGCAGATGC
52	NbeHEC1ab as Rev	CTTAATACGACTCACTATAGGGGCCTCCATAGAGTTTGTGTTCC
53	NbeHEC1c Fwd1	CTCACTCTTATCCTTCATGTC
54	NbeHEC1c as Rev	CTTAATACGACTCACTATAGGGCATCAAATGAGGAGTTTGGCA
55	NbeHEC1c Fwd2	CTTTGGAACAAGCTGCTATTG
56	NbeHEC1c Rev	CATCAAATGAGGAGTTTGGCA
57	NbeHEC1d Fwd1	CTCACTCGTTGTCCTTCATGTC
58	NbeHEC1d as Rev	CTTAATACGACTCACTATAGGGTTACCTTATTCTAAAAGAACT
59	NbeHEC1d as Fwd2	ATTTGGAACAAGCTGCTGTTA
60	NbeHEC1d Rev	TTACCTTATTCTAAAAGAACT
61	NbeHEC2ab Fwd	GGACAACTTCCCGACTTCTC
62	NHEC2a Rev	GAAGGATTTTGATGAGAGTTGG
63	NbeHEC2b Rev	GGTTGAATGATTTTGATGAGAG
64	NbeHEC2ab as Rev	CTTAATACGACTCACTATAGGGCCTATTTGCACCTGCTCTTTC
65	NbeHEC2c Fwd	TGGTGCATACGCTTCCCATAC
66	NbeHEC2d Fwd	TGGTGCATATCCTTCACATAC
67	NbeHEC2d Fwd	GGTAGAAGCCACTAGGCCAAT
68	NbeHEC2c Fwd	GTTAGAAGTCTCTAGGCCAGT
69	NbeHEC2cd Rev	CACTTTGATGATAAGGGTAATAAG
70	NbeHEC2cd Rev	CTTAATACGACTCACTATAGGGCACTTTGATGATAAGGGTAATAAG
73	G-NbeHEC3ab For	GTGCATTGAGAAAGAGGGAAGGTGG
74	G-NbeHEC3ab Rev	AAACACTGTTACCAACAAAGGTTG
75	G-NbeHEC3a For	GTGCATGTAATTCGCTTGAGAAAGA
76	G-NbeHEC3a Rev	AAACTAGTGTGGTTCATACTGGAG
77	G-NbeHEC3b For	GTGCAGAGGAAAAGTAGGCCAAATG
78	G-NbeHEC3b Rev	AAACTGTGGTAGTAGCGATGCTAG
79	G-NbeHEC3s For	GTGCACCTTTTAGGCTTTTCAATGG
80	G-NbeHEC3s Rev	AAACCCTTTTAGGCTTTTCAATGG
81	G-NbeHEC3ab For 2	AAACCACCTTCCCTCTTCTCAA
82	G-NbeHEC3ab Rev 2	GTGCAACAACCTTTGTTGGTAACAGT
83	G-NbeHEC3a For 2	AAACTCTTCTCAAGCGAATTACA
84	G-NbeHEC3a Rev 2	GTGCACTCCAGTATGACCAACACTA
85	G-NbeHEC3b For 2	AAACCATTGGCCTAGTTTTCTC
86	G-NbeHEC3b Rev 2	GTGCACTAGCATCGCTACTACCACA
95	gNbehec3ab Fwd	ACGTACGTAAGTCAAGTCTAACCGT
96	gNbehec3a Rev	ACGAAGGTGACTAGTCAGAGCT
97	gNbehec3b Rev	ACGCCTTTTCTCTACCCTACAAAGGT
103	g NbeHEC3b fwd	CCTCAAAGCCTTCACACAGG
104	gNbeHEC3b Rev	AAAGAAGTGAGCCAGAGACC
105	g NbeHEC3a fwd	GGGGTAGCACGTACCTTACC
106	gNbeHEC3a Rev	CAGAAACGAAGGGGTAAGGC

