

Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Biotecnología



Nuevas Funciones y Dianas Moleculares del Factor de Transcripción FRUITFULL en *Arabidopsis thaliana*.

TESIS DOCTORAL

Presentada por

VICENTE BALANZÁ PÉREZ



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**Nuevas Funciones y Dianas Moleculares del
Factor de Transcripción FRUITFULL en
Arabidopsis thaliana.**

Memoria presentada por

VICENTE BALANZÁ PÉREZ

para optar al grado de

DOCTOR

por la Universidad Politécnica de Valencia

Directora:

CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR
DE PLANTAS "Primo Yúfera"

Dña. CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE, Doctora en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICA que,

Don VICENTE BALANZÁ PÉREZ, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que con el título "Nuevas Funciones y Dianas Moleculares del Factor de Transcripción FRUITFULL en *Arabidopsis thaliana*", presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 15 de Septiembre de 2011.

Fdo. Dr. Cristina Ferrándiz Maestre

UNIVERSIDAD POLITECNICA
DE VALENCIA
AVDA. DE LOS NARANJOS S/N
46022-VALENCIA, ESPAÑA
TEL.: +34 (9)6 387 78 56
FAX: +34 (9)6 387 78 59
<http://www.ibmcp.upv.es>

AGRADECIMIENTOS:

Ante todo muchas gracias. Gracias a todos los que habéis compartido conmigo esta odisea que por fin acaba... aunque tan solo sea para empezar una nueva.

Para empezar, quiero darles las gracias a los jefes, Paco y Cristina, a los que considero como mis padres científicos, y especialmente a la jefa. Gracias Cristina, por haber confiado en mí (no sé si muchos lo hubieran hecho), y darme la oportunidad de reencontrarme con la ciencia. Gracias por tu paciencia (sobre todo al principio); por escuchar todas mis "hipótesis" (aunque a veces no tuvieran pies ni cabeza); y sobre todo, por haberme enseñado prácticamente todo lo que sé de esta pequeña plantita que me ha llevado loco tanto tiempo. Siempre te estaré agradecido.

Y como no, a mi Clareta y mi Gándul (Antoñete, Pitx, Parrita, Hommer jovencito,.....), a los que conozco desde mis inicios en la Facultad, y que me convencieron para que me pasara por el IBMCP, aunque eso les costara los gin-tonics a precio de coste!. Gràcies y gracias, por ser mis amigos, por compartir vuestras vidas con la mía y por estar siempre ahí. También debería pedirlos perdón por intentar convencerlos de que FUL es el centro del universo.... pero es que es verdad!!!

A Maríní, con la que tantas horas de laboratorio he compartido. Aunque hace ya mucho tiempo que te fuiste a ver mundo, aún te sigo echando de menos. Mil gracias por todo. Por todos los cigarrines y cotilleos,... por tu paciencia, y por dejarme robarte los bolis, los stocks, A mi Pedrete, por ser tan buena gente, aunque nunca hayas querido compartir mi comida... jejeje, siempre con una sonrisa y unas palabras de ánimo para todo el mundo. Al Jorge (rei), el tío més gran de l' institut (menut fitxatge vam fer quan arribares a l'IBMCP) i la Mar (ara la reina) a la que crec que mai he vist enfadada. A Laura, per les xarades del cigarret. A Diego, Capa, Emilio, Hugo... miembros del consejo de sabios más selecto de la historia... señores echo de menos sus rimas y sus e-mails grupales que tanto me han hecho reír. Gracias por hacer que esto fuera más ameno.

A Lars y a Stefan y Nayeli, por acogerme en sus laboratorios y hacerme sentir como en casa.

A los vecinos, que al final acaban siendo como de la familia, Ana, Majo, Alfredo, Carla, (gracias por soportar mis progress), Mónica, Edelin, Roberto, Joanna, M^a Cruz...pero especialmente a Ana y Majo, por toda vuestra ayuda, y por avisarme cuando mis plantas ya no cabían en el invernadero o aparecían de repente en rincones olvidados...

A los compañeros de lab, que aunque mejor o peor hemos compartido poyata. Marisa, Carol, Rocio, Mónica, Chloé (la única persona que me entendió durante mucho tiempo) y Patri y Irene (empeñadas en llevarme la contraria y cambiarme todos los papeles de sitios, jejeje, ¡¿qué os he hecho?!).

A la gente de la salita, las amigotas (M^a Angeles, MD, las Cristinas, Begoña), Miguel Ángel, Jose, Paco, Eugenio, Teresa, Mapi,....., todos aquellos con los que me he reído (la verdad que muy a gusto) durante la hora de la comida... si no fuera por estos ratos....

Por supuesto a mi familia y sobre todo a mis padres, por dejarme elegir siempre y apoyarme a pesar de los tropiezos, que fueron muchos. Por enseñarme, dirigirme y quererme (cada día que pasa os admiro más y más).

Y a mi Laurita, que me soporta y cuida, todos los días (especialmente los últimos meses...). Gracias por intentar comprenderme, aunque sé que cuesta, y por quererme de todos modos, por tu apoyo, tu compañía, tu amistad, ... sin ti todo esto hubiera sido mucho más difícil.

RESÚMENES

Nuevas Funciones y Dianas Moleculares del Factor de Transcripción FRUITFULL en *Arabidopsis thaliana*.

RESUMEN:

El factor de transcripción tipo MADS-box FRUITFULL (*FUL*) desempeña una función clave durante el desarrollo del fruto de la crucífera *Arabidopsis thaliana*. En este proceso *FUL* participa restringiendo la expresión de ciertos genes de identidad de margen de valva, impidiendo que se expresen en la totalidad de la valva. Esto asegura el perfecto desarrollo del fruto y el establecimiento de la zona de dehiscencia. Esta función descrita para *FUL* está de acuerdo con el patrón de expresión de este gen, ya que se expresa fuertemente en las valvas del fruto, quedando excluido de la zona del margen de valva. Sin embargo, *FUL* no se expresa únicamente durante el desarrollo del fruto, sino que presenta un patrón de expresión dinámico durante todo el desarrollo de la planta. Durante el desarrollo vegetativo, *FUL* se expresa en la vasculatura de hojas jóvenes. Con la transición floral, se detecta un brusco incremento de su expresión en el meristemo apical del tallo, así como en las hojas caulinares de la inflorescencia y en la vasculatura del tallo. Esta expresión se mantiene durante todo el desarrollo de la inflorescencia. La expresión de *FUL* desaparece en los primordios florales para volver a aparecer en el centro del meristemo floral durante el estadio 3 de desarrollo. La expresión de *FUL* se mantiene en esta zona durante todo el desarrollo floral y posteriormente durante el desarrollo del carpelo, donde su expresión se restringe a las valvas y a la vasculatura del estilo. De acuerdo con este patrón de expresión, además de su papel durante el desarrollo del fruto, se han propuesto otras funciones para *FUL*, como un papel regulador durante la transición floral o proporcionar identidad de meristemo floral. Curiosamente, su pérdida de función no presente fuertes fenotipos relacionados con estas nuevas funciones propuestas, sugiriendo una posible redundancia génica con otros genes, y que a su vez, podrían enmascarar otras funciones de este factor de transcripción en los tejidos donde se expresa.

En esta tesis hemos profundizado en el conocimiento sobre las funciones descritas para *FUL* y realizado el estudio de otras nuevas no descritas previamente:

En el capítulo 1 de esta tesis se analiza el papel desempeñado por *FUL* durante la transición floral. Nuestros resultados sugieren que *FUL* es una importante pieza de los mecanismos que inician la transición floral, donde actúa modificando la actividad del represor de la transición SHORT VEGETATIVE PHASE, y promoviendo la expresión de los genes SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 y LEAFY.

En el capítulo 2, se aborda el estudio de una nueva función del gen *FUL*, el mantenimiento de la actividad meristemática. Nuestro trabajo nos ha permitido encontrar la primera evidencia molecular sobre el control genético del hábito de vida monocárpico anual característico de un gran número de plantas angiospermas, como por ejemplo *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo, mostramos que *FUL* participa en el control temporal de la actividad del meristemo apical del tallo a través de la regulación directa del gen APETALA2. Esta regulación controla la expresión del gen WUSCHEL, clave en el mantenimiento de las células meristemáticas que sustentan el crecimiento de la planta, estableciendo el momento en que la planta detiene su crecimiento.

Por último, en el capítulo 3, analizamos el papel de *FUL* durante el desarrollo del fruto a través de un abordaje transcriptómico. Este trabajo nos ha permitido identificar un listado de posibles dianas de *FUL* durante este proceso así como tener una idea global de los procesos regulados por *FUL*. Este estudio nos ha permitido establecer una relación entre *FUL* y la distribución de las auxinas durante el desarrollo y crecimiento del fruto. *FUL* controlaría la distribución de esta hormona a través de la regulación de los genes implicados en su transporte, como el gen PINHEAD 7.

New Functions y Molecular Targets of the FRUITFULL Transcription Factor in *Arabidopsis thaliana*.

SUMMARY:

The MADS-box FRUITFULL (*FUL*) transcription factor plays a key role along fruit development of the crucifer *Arabidopsis thaliana*. *FUL* is involved in this process by restricting the expression of valve margin identity genes, avoiding their expression in the rest of the valve. This mechanism ensures proper fruit development and the establishment of the dehiscence zone. The function described for *FUL* correlates well with the expression pattern of this gene: it is strongly expressed in the valves of the fruit, but excluded from the valve margin zone. However, *FUL* is not only expressed during fruit development, but it has a dynamic expression pattern throughout plant development. During vegetative growth, *FUL* is expressed in the vasculature of young leaves. With the floral transition, *FUL* has a sharp increase in expression in the shoot apical meristem, as well as in cauline leaves and the inflorescence stem vasculature. This expression is maintained throughout the development of the inflorescence. *FUL* expression is not detected in floral primordia, but it is reinstated in the center of floral meristem during stage 3 of development. *FUL* expression is maintained in this domain throughout floral development, and later, during the development of the carpel, where its expression is restricted to the valves and vasculature of the style. In addition to fruit development, other functions have been described for *FUL* that correlates with *FUL* expression pattern, such as a regulatory role during floral transition or the establishment of floral meristem identity. Interestingly, loss of function of *FUL* only shows mild phenotypes associated with these additional functions proposed, probably caused by genetic redundancy with other genes. This redundancy could also mask other unknown functions of this transcription factor in the tissues where it is expressed.

In this Thesis we provide further insights on the knowledge of the described functions for *FUL* and studied new ones not previously described:

In Chapter 1, we have examined the role of *FUL* in the floral transition. Our results suggest that *FUL* is an important part of the mechanisms that initiate the floral transition, where it acts by modifying the activity of the floral transition repressor SHORT VEGETATIVE PHASE and promoting the expression of *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1* and *LEAFY*.

In chapter 2, we have studied a new *FUL* function, the maintenance of meristematic activity. Our work has enabled us to find the first molecular evidence on the genetic control of annual monocarpic habit, characteristic of a large number of angiosperm plants such as *Arabidopsis thaliana*. In this chapter, we show that *FUL* participates in the temporal control of the activity of the shoot apical meristem through the direct regulation of the gene *APETALA2*. This network controls the expression of *WUSCHEL*, a key gene in the maintenance of meristematic cells that support the growth of the plant, establishing when the plant stops growing.

Finally, in Chapter 3, we analyzed the role of *FUL* in fruit development through a transcriptomic approach. This work has identified a list of possible targets of *FUL* during this process, providing a general perspective on the processes regulated by *FUL*. This study has allowed us to establish a relationship between *FUL* and auxins distribution, a key factor during development and fruit growth. *FUL* controls the distribution of this hormone through the regulation of genes involved in its transport, such as gene *PINHEAD 7*.

Noves Funcions i Dianes Moleculares del Factor de Transcripció FRUITFULL en *Arabidopsis thaliana*.

RESUM:

El factor de transcripció tipus MADS-box FRUITFULL (FUL) exerceix una funció clau durant el desenvolupament del fruit de la crucífera *Arabidopsis thaliana*. En aquest procés FUL participa restringint l'expressió de certs gens d'identitat de marge de valva, impedit que s'expressen en la totalitat de la valva. Això assegura el perfecte desenvolupament del fruit i l'establiment de la zona de dehiscència. Aquesta funció descrita per a FUL està d'acord amb el patró d'expressió d'aquest gen, ja que s'expressa fortament en les valvas del fruit, quedant exclòs de la regió del marge de valva. No obstant això, FUL no s'expressa únicament durant el desenvolupament del fruit, sinó que presenta un patró d'expressió dinàmic durant tot el desenvolupament de la planta. Durant el desenvolupament vegetatiu, FUL s'expressa en la vasculatura de fulles joves. Amb la transició floral, es detecta un bruscat increment de la seua expressió en el meristema apical de la tija, així com en les fulles caulinares de la inflorescència i en la vasculatura de la tija. Aquesta expressió es manté durant tot el desenvolupament de la inflorescència. L'expressió de FUL desapareix en els primordis florals per tornar a aparèixer en el centre del meristem floral durant l'estadi 3 de desenvolupament. L'expressió de FUL es manté en aquesta zona durant tot el desenvolupament floral i posteriorment durant el desenvolupament del carpel, on la seva expressió es restringeix a les valves i a la vasculatura de l'estil. D'acord amb aquest patró d'expressió, a més del seu paper durant el desenvolupament del fruit, s'han proposat altres funcions per a FUL, com un paper regulador durant la transició floral o proporcionar identitat de meristem floral. Curiosament, la seua perduda de funció no presenta forts fenotips relacionats amb aquestes noves funcions proposades, suggerint una possible redundància gènica amb altres gens, i que al mateix temps, podrien emascarar altres funcions d'aquest factor de transcripció en els teixits on s'expressa.

En aquesta tesi hem aprofundit en el coneixement sobre les funcions descrites per a FUL i realitzat l'estudi d'altres noves no descrites prèviament:

En el capítol 1 d'aquesta tesi s'analitza el paper exercit per FUL durant la transició floral. Els nostres resultats suggereixen que FUL és una important peça dels mecanismes que inicien la transició floral, on actua modificant l'activitat del repressor de la transició SHORT VEGETATIVE PHASE, i promovent l'expressió dels gens SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 i LEAFY.

En el capítol 2, s'aborda l'estudi d'una nova funció del gen FUL, el manteniment de l'activitat meristemàtica. El nostre treball ens ha permès trobar la primera evidència molecular sobre el control genètic de l'hàbit de vida monocàrpica anual característic d'un gran nombre de plantes angiospermes, com per exemple *Arabidopsis thaliana*. En aquest treball, mostrem que FUL participa en el control temporal de l'activitat del meristem apical de la tija a través de la regulació directa del gen APETALA2. Aquesta regulació controla l'expressió del gen WUSCHEL, clau en el manteniment de les cèl·lules meristemàtiques que sustenten el creixement de la planta, establint el moment en què la planta atura el seu creixement.

Finalment, en el capítol 3, analitzem el paper de FUL durant el desenvolupament del fruit a través d'un abordatge transcriptòmic. Aquest treball ens ha permès identificar un llistat de possibles dianes de FUL durant aquest procés així com tenir una idea global dels processos regulats per FUL. Aquest estudi ens ha permès establir una relació entre FUL i la distribució de les auxines durant el desenvolupament i creixement del fruit. FUL controlaria la distribució d'aquesta hormona a través de la regulació dels gens implicats en el seu transport, com el gen PINHEAD 7.

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3
Los factores de transcripción de la familia MADS	3
Los factores de transcripción tipo MADS reconocen secuencias específicas en los promotores de sus genes diana	5
La estructura de las proteínas MADS	5
Estructura primaria y secundaria	5
Estructura terciaria	6
Estructura cuaternaria	6
El modelo del cuarteto	7
El factor de transcripción <i>FRUITFULL</i> .	8
El patrón de expresión de <i>FUL</i>	8
Los mutantes <i>ful</i>	8
El papel de <i>FUL</i> en el desarrollo del fruto	9
El papel de <i>FUL</i> en la identidad de meristemo floral	10
El papel de <i>FUL</i> en el tiempo de floración	10
Otras funciones	10
OBJETIVOS GENERALES	11
CAPÍTULO 1: EL PAPEL DE <i>FUL</i> DURANTE LA TRANSICIÓN FLORAL.	15
Introducción	17
La transición floral en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	17
La ruta del fotoperiodo	18
La ruta de la vernalización	20
La ruta autónoma	22
La ruta de las giberelinas	23
La ruta endógena	23
Efecto de la temperatura	24
Integración de las señales de la floración	25
Inicio del desarrollo floral	26
Antecedentes	28
Objetivos	29
Resultados	30

Caracterización del tiempo de floración en el mutante <i>ful-2</i> .	30
Efecto de la sobreexpresión de <i>FUL</i> en el tiempo de floración	33
Interacciones génicas	34
El papel de <i>FUL</i> en el proceso de vernalización.	47
Discusión	54
<i>FUL</i> es un promotor de la transición floral, comportándose como un integrador de diferentes señales inductoras de la transición floral.	54
<i>FUL</i> es un gen clave en la transición floral de plantas con hábito invernal.	54
<i>FUL</i> media en la transición del estado adulto vegetativo a reproductivo.	56
<i>FUL</i> controla la duración de la fase inflorescente a través de la regulación de <i>LFY</i> .	57
<i>FUL</i> podría regular la activación de <i>LFY</i> junto con <i>SOC1</i> .	58
Además, <i>FUL</i> podría mediar la activación de <i>SOC1</i> .	60
<i>SVP</i> media los efectos de <i>FUL</i> durante la transición floral	60
<i>SVP</i> como un regulador dual de la transcripción.	63
El papel de <i>FUL</i> en ecotipos de hábito invernal.	65
Relevancia biológica de la función de <i>FUL</i> durante la transición floral.	66
Modelo integrador del papel de <i>FUL</i> durante la transición floral.	67
Posibles aplicaciones de interés económico.	67
Conclusiones	69

CAPÍTULO 2: EL PAPEL DE *FUL* EN EL CONTROL DE LA LONGEVIDAD EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

71

Introducción	73
El desarrollo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
Longevidad-hábito de vida	74
El meristemo	75
Control genético de la formación y mantenimiento de los meristemas.	75
El papel de las hormonas en la función de los meristemas.	79
Regulación meristemática en especies con hábito de vida anual: especies monocárpicas.	80
Antecedentes	83
Objetivos	84
Resultados	85
Las mutaciones en <i>FUL</i> provocan un incremento en la longevidad de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	85
El mutante <i>ful</i> suprime la estructura terminal típica de los mutantes estériles en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	88

<i>FUL</i> participa en el GPA mediando la represión de <i>WUS</i> .	91
<i>FUL</i> actúa redundantemente con otros factores en el control de la determinación del meristemo floral.	91
Interacciones genéticas de <i>FUL</i> en el control de la actividad meristemática.	95
Búsqueda de nuevos mutantes implicados en el control de la actividad meristemática.	101
<i>AP2</i> y el GPA	110
<i>FUL</i> se une al promotor de <i>AP2</i>	114
<i>ful ap2-12</i>	114
Discusión	116
<i>FUL</i> tiene un papel en el control de la determinación del meristemo floral.	117
<i>FUL</i> controla la longevidad del SAM	120
Conclusiones	126

CAPÍTULO 3: FUNCIONES DE FUL DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO **127**

Introducción	129
El fruto de <i>Arabidopsis thaliana</i>	129
Bases genéticas del desarrollo del fruto.	132
Control hormonal del desarrollo del fruto.	134
Desarrollo del gineceo	134
Desarrollo del fruto	136
<i>FUL</i> en el desarrollo del fruto	137
El papel de la pared celular en la elongación celular.	139
Antecedentes	141
Objetivos	142
Resultados	143
La línea <i>FUL:VP16</i> .	143
Diseño experimental para el análisis transcriptómico:	145
Genes con expresión diferencial durante las etapas iniciales del desarrollo del fruto de los mutantes <i>ful</i> y la línea <i>FUL:VP16</i> :	145
Análisis de la variabilidad de los genes diferencialmente expresados mediante PCA.	147
<i>FUL</i> como un represor de la transcripción durante el desarrollo del fruto	147
Estimación del posible modo de acción de <i>FUL</i> sobre los genes diferencialmente expresados.	148

Análisis de categorías de Ontología Génica (GO) enriquecidas en los genes diferencialmente expresados.	149
Genes incluidos en las categorías GO enriquecidas.	151
Discusión	171
FUL es un factor de transcripción dual	171
<i>FUL</i> regula de forma diferente a los genes de identidad de margen de valva	171
Procesos afectados durante el desarrollo del fruto en el mutante <i>ful</i> y la línea FUL:VP16.	172
FUL podría participar en el establecimiento de los órganos florales reproductivos.	180
Conclusiones	183
DISCUSIÓN GENERAL	185
Mecanismo de acción de FUL	187
Tiempo de floración	189
Transición floral y actividad meristemática	191
GENERAL CONCLUSIONS	193
Conclusions of Chapter 1:	195
Conclusions of Chapter 2:	195
Conclusions of Chapter 3:	196
MATERIALES Y MÉTODOS	197
Material biológico.	199
Material vegetal.	199
Microorganismos.	200
Métodos de biología molecular.	202
Vectores.	202
Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.	202
Manipulación de ácidos nucleicos.	204
Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> .	210
Transformación genética mediante infiltración al vacío.	210
Selección de plantas transgénicas.	211
Estudios de expresión	212
Hibridación <i>IN SITU</i> .	212
Detección GUS	214
Expresión transitoria en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	215
Biología celular/Análisis fenotípico. Técnicas de histología vegetal.	216

Observación y fotografía a bajo aumento.	216
Microscopia óptica.	217
Microscopia electrónica de barrido.	217
Microscopía confocal.	217
Histología.	218
Análisis de expresión génica mediante micromatrices	218
Extracción de RNA total	218
Amplificación del RNA	218
Marcaje fluorescente del RNA amplificado	220
Hibridación de Cy-dye-aminoalil-RNA amplificado con micromatrices de DNA de oligonucleótidos largos	220
Análisis de datos de las micromatrices	222
Análisis individual de las micromatrices	222
ANEXO I	225
ANEXO II	227
ABREVIATURAS:	228
BIBLIOGRAFÍA	231

INTRODUCCIÓN GENERAL

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (*Arabidopsis*) es una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia de las Brassicas o Crucíferas (Brassicaceae o Cruciferae). Es una planta herbácea anual de pequeño tamaño y con una arquitectura simple. Los ejemplares adultos de esta especie presentan una roseta de hojas dispuestas con filotaxis espiral, de la que surge el tallo de la inflorescencia. Sobre este tallo, en dirección acropétala, encontramos primero nuevos tallos de inflorescencias, sustentados por hojas, que repetirán el patrón de desarrollo de la inflorescencia principal. A continuación se disponen las flores, que se generan de forma continuada hasta la muerte de la planta. De acuerdo con su amplia distribución geográfica y ecológica, *Arabidopsis* muestra una gran variabilidad natural que se traduce en un número elevado de ecotipos (Bowman, 1994; Meyerowitz y Somerville, 1994).

Esta especie vegetal crece bien en condiciones controladas, presenta un ciclo vital corto (6-8 semanas), es autógama y genera gran cantidad de semillas (Bowman, 1994; Meyerowitz y Somerville, 1994). Además, su genoma es pequeño, compacto y está totalmente secuenciado (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Otra característica de gran interés para los científicos es que su transformación genética es relativamente fácil. Estas características convierten a *Arabidopsis* en un sistema modelo ideal en genética y biología molecular. Como consecuencia, se han desarrollado un gran número de herramientas genéticas, genómicas y moleculares para el trabajo con *Arabidopsis*. Estas herramientas están integradas en varias bases de datos, siendo la más importante “[The Arabidopsis Information Resource](#)” (TAIR).

Los factores de transcripción de la familia MADS

Los factores de transcripción son proteínas que están implicadas en la regulación de la expresión génica, controlando qué genes se expresan o no durante una etapa de desarrollo, o en un tejido determinado. Una característica clave de estas proteínas es su capacidad de unirse al DNA. A través de esta unión, los factores de transcripción median la regulación de sus genes diana, pudiendo comportarse como activadores o represores de la transcripción.

Una de las familias más numerosas de factores de transcripción en plantas es la de los factores de transcripción tipo MADS. El nombre que recibe esta familia es el acrónimo que refiere a los primeros genes identificados: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Passmore et al., 1989), *AGAMOUS* de *Arabidopsis thaliana* (Yanofsky et al., 1990), *DEFICIENS* de *Antirrhinum majus* (Sommer et al., 1990) y *SERUM RESPONSE FACTOR* de *Homo sapiens* (Norman et al., 1988). A pesar de que esta familia está presente en todos los eucariotas superiores, es en el reino vegetal donde más representada se encuentra. Por ejemplo, mientras que en humanos esta familia está representada únicamente por 5 genes, y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por 4, en *Arabidopsis thaliana* se han identificado al menos 106 miembros (Messenguy y Dubois, 2003; Parenicova et al., 2003). En el reino vegetal, y en concreto en *Arabidopsis*, esta familia de factores de transcripción se ha relacionado con múltiples procesos del desarrollo de la planta, desde el desarrollo radicular hasta el control del tiempo de floración y el desarrollo floral (Becker y Theissen, 2003; Ma, 2009).

Según las características de los genes y proteínas MADS de diferentes especies vegetales, como la disposición de los exones e intrones, la tasa de evolución, la secuencia de aminoácidos o la presencia/ausencia de dominios funcionales, así como las relaciones filogenéticas

INTRODUCCIÓN GENERAL

existentes entre estos genes (Gramzow y Theissen, 2010), se han establecido 5 grupos para clasificar esta familia de factores de transcripción: los grupos MIKC, M α , M β , M γ y M δ (Parenicova et al., 2003). De estos 5 grupos el mejor caracterizado funcionalmente es del grupo MIKC. Esto se debe en gran medida a que los primeros mutantes identificados de esta familia de factores de transcripción en plantas (Hill y Lord, 1989; Jack et al., 1992; Mandel et al., 1992; Sommer et al., 1990; Yanofsky et al., 1990) pertenecían a este grupo. Estos primeros mutantes presentaban fenotipos severos durante el desarrollo floral, con conversiones homeóticas de los órganos florales, y a partir de su estudio se postuló el modelo ABC (Fig. I-1) (Coen y Meyerowitz, 1991). En *Arabidopsis*, los genes implicados inicialmente en este modelo fueron *APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*), *PISTILLATA* (*PI*), *APETALA* (*AP3*) y *AGAMOUS* (*AG*), que a excepción de *AP2*, pertenecen a la familia MADS. Los mutantes de estos genes afectan de forma específica a la identidad de los órganos florales, de modo que *ap1* y *ap2* presentan defectos en la formación de sépalos y pétalos, *pi* y *ap3* en la formación de los pétalos y estambres, y *ag* en la formación de estambres y gineceo. En base a estos fenotipos y a sus patrones de expresión se consideraron tres grupos funcionales de genes, A, B y C, cuyas combinaciones explican la adquisición de las diferentes identidades de los órganos florales. *AP1* y *AP2* tendrían función A, *PI* y *AP3* tendrían función B y *AG* tendría función C (Fig. I-1). La función A especificaría la identidad de los sépalos, la acción conjunta de la función A y B especificaría los pétalos, la función B y C los estambres, y la función C el gineceo (Fig. I-1).

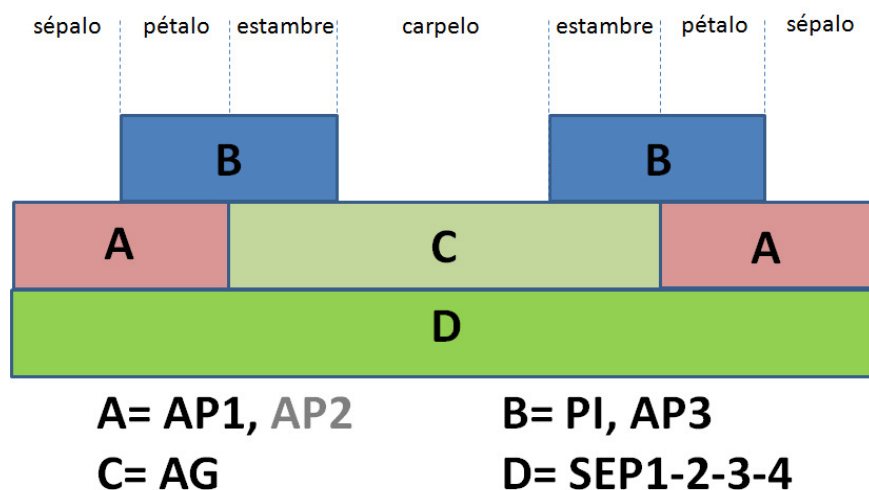


Figura I-1: Modelo ABCD que explica el establecimiento de las diferentes identidades de los órganos florales. Este modelo establece la existencia de tres funciones: la A, establecida en *Arabidopsis* por los genes *AP1* y *AP2*; la B establecida por *PI* y *AP3*; y la C, establecida por *AG*. La función A determina la formación de los sépalos; la A más la B la de los pétalos; la B más la C, los estambres; y la C el gineceo. Posteriormente a este modelo se le añadió una nueva función, la D que sería necesaria para la determinación de todos los órganos florales, y que la confería los genes *SEP1*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4*. Todos los genes implicados en este modelo, a excepción de *AP2*, pertenece a la familia de factores de transcripción tipo MADS del grupo MIKC.

Ningún fenotipo asociado a mutaciones en los genes pertenecientes al resto de grupos de la familia MADS se identificó inicialmente, y sólo mediante genética reversa se ha iniciado el estudio funcional de éstos (Bemer et al., 2008; Colombo et al., 2008; Gramzow y Theissen, 2010; Kang et al., 2008). Se ha sugerido que la dificultad para detectar mutantes en genes de estos grupos mediante genética directa puede asociarse a una alta incidencia de redundancia génica, debida a la alta tasa de duplicaciones génicas recientes ocurridas en esta familia de

factores de transcripción (Parenicova et al., 2003). Esto implicaría que muchas proteínas todavía conservarían muchas funciones comunes con sus parálogos (Parenicova et al., 2003), lo que dificultaría la identificación de los mutantes fenotípicamente. El fenómeno de la redundancia génica también se encuentra dentro del grupo MIKC, ya que las mutaciones en algunos de estos genes sólo son fenotípicamente evidentes en presencia de otra mutación. Así, por ejemplo, las mutaciones en el gen *CAULIFLOWER (CAL)* (Kempin et al., 1995) sólo producen unos fenotipos detectables en ausencia de AP1, o como los genes *SHATTERPROOF1 (SHP1)* y *SHP2* (Liljegren et al., 2000), que sólo muestran fenotipos cuando ambos genes están mutados. También existen casos de redundancia entre un número de genes mayor, como los genes *SEPALLATA 1 (SEP1)*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4*, donde al menos se requiere un triple mutante para observar defectos en el desarrollo (Pelaz et al., 2000). Los 4 genes *SEPALLATA* se incluyeron en el modelo ABC al conferir una nueva función, la D, necesaria para el establecimiento de todos los órganos florales (Fig. I-1) (Pelaz et al., 2000; Pelaz et al., 2001; Theissen y Saedler, 2001).

Los factores de transcripción tipo MADS reconocen secuencias específicas en los promotores de sus genes diana

Los factores de transcripción regulan la expresión al reconocer y unir unas secuencias determinadas presentes en las regiones promotoras de sus genes diana. Estas secuencias son características de cada factor de transcripción y se denominan sitios de unión. Mediante ensayos con proteínas MADS de humanos y levaduras (Hayes et al., 1988; Passmore et al., 1989; Phan-Dinh-Tuy et al., 1988; Pollock y Treisman, 1990; Treisman, 1986; Wynne y Treisman, 1992) se estableció que el sitio de unión reconocido por los factores de transcripción tipo MADS correspondía a una secuencia consenso de 10 pares de bases, donde las dos primeras bases eran citosinas y las dos últimas guaninas. Entre los extremos de esta secuencia debían estar presentes 6 bases, que podían ser indistintamente adeninas o timinas [CC(A/T)₆GG]. Esta secuencia consenso recibió el nombre de caja CARG (CARG-box) (Hayes et al., 1988; Pellegrini et al., 1995; Phan-Dinh-Tuy et al., 1988; Riechmann et al., 1996b).

Las proteínas MADS tipo MIKC de plantas también se unen a este tipo de cajas identificadas en levaduras y humanos, existiendo algunas proteínas pertenecientes al grupo capaces de reconocer y unir variaciones de esta secuencia consenso como [CC(A/T)₈GG] (de Folter y Angenent, 2006; Foat et al., 2006; Tang y Perry, 2003; Zobell et al., 2010). Trabajos recientes basados en resultados de ChIP-seq y ChIP-ChIP, con diferentes MADS tipo MIKC de plantas, indican que este tipo de factores de transcripción reconocen secuencias del tipo [CC(A/T)₆GG] mayoritariamente, aunque pueden existir pequeñas variaciones respecto a la secuencia consenso original, según cada proteína (Deng et al., 2011; Kaufmann et al., 2009; Kaufmann et al., 2010; Zheng et al., 2009).

La estructura de las proteínas MADS

Estructura primaria y secundaria

Las proteínas del grupo MIKC presentan una estructura modular característica. Desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la proteína se pueden identificar 4 dominios típicos: el dominio MADS-box (M) de unión al DNA que forma dos hojas β flanqueadas por dos α -hélices (Pellegrini et al., 1995; Riechmann et al., 1996b; Santelli y Richmond, 2000), el dominio I (del inglés "intervening domain") (I) con funciones tanto en la unión al DNA como en

la formación de dímeros (Riechmann et al., 1996a), un dominio tipo keratina (K) con capacidad de formar 3 α -hélices anfipáticas (K1, K2 y K3) importantes para formar dímeros con otras proteínas (Davies et al., 1996; Fan et al., 1997) y un último dominio denominado C-terminal (C) al que se atribuyen funciones tanto reguladoras como en la formación de complejos multiméricos de proteínas MADS (Egea-Cortines et al., 1999; Honma y Goto, 2001) (Fig. I-2 A).

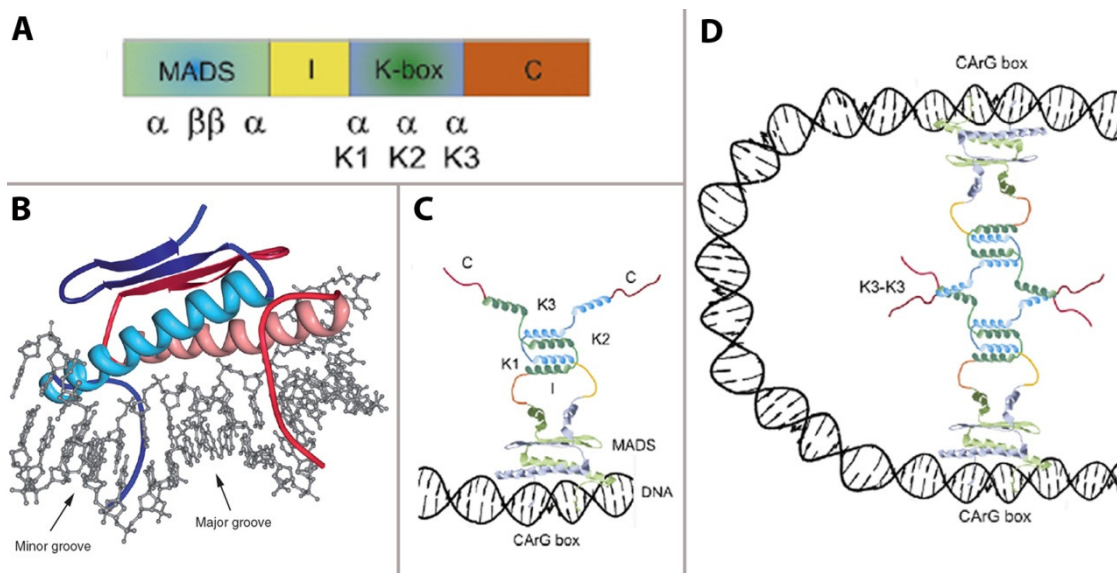


Figura I-2: Estructura de las proteínas MADS. (A) Representación esquemática de un factor de transcripción MADS tipo MIKC donde se muestran los diferentes dominios que presenta, así como las principales estructuras secundaria de la proteína. (B) Estructura cristalina de un dímero de los dominios MADS de la proteína SRF humana unido a DNA. El DNA se representa en gris, mientras que los monómeros de la proteína se representan en azul y rojo, correspondiendo los tonos claros a α -hélices y los oscuros a hojas β . (C) Simulación de un dímero de MADS tipo MIKC asociado a DNA, donde se indican los diferentes dominios de la proteína y que muestra que las α -hélices K1 y K2 estarían implicadas en la formación y estabilidad del dímero mostrado. (D) Simulación de un cuarteto de MADS tipo MIKC. La unión de este complejo a dos CARGs generaría la formación de un bucle de DNA. La unión de ambos dímeros entre sí dependería de las α -hélices K3. Adaptado de Immink et al., 2010 y Gramzow y Theissen, 2010.

Estructura terciaria

La estructura terciaria de las proteínas MADS tipo MIKC (Fig. I-2 C) se ha deducido por homología a la estructura que presentan los MADS de humanos (Gramzow y Theissen, 2010; Huang et al., 2000; Immink et al., 2010), ya que no se dispone de ninguna proteína MADS de plantas cristalizada (Fig. I-2 B). Los factores de transcripción tipo MADS interaccionan con sus sitios de unión en forma de homo- y heterodímeros (Davies et al., 1996; de Folter et al., 2005; Riechmann et al., 1996b; Schwarz-Sommer et al., 1992) (Fig. I-2 B, C). Aceptando que los MADS de plantas se comporten igual que los de animales, el dominio MADS-box se une al DNA mediante el extremo N-terminal del dominio, que se asocia al surco menor de la doble hélice de DNA, y la primera α -hélice que se une al surco mayor. Las hojas β se requerirían para la formación del dímero necesario para la unión del DNA (Pellegrini et al., 1995).

Estructura cuaternaria

Se ha propuesto que estos dímeros con capacidad de unirse al DNA a su vez pueden también interaccionar con otros dímeros de MADS, lo que daría lugar a la formación un complejo cuaternario (Egea-Cortines et al., 1999; Theissen y Saedler, 2001) (Fig. I-2 D) aunque no existe ninguna evidencia *in vivo* que demuestre la formación de estos cuartetos. La capacidad de formar multímeros residiría en el dominio K de la proteína. Los subdominios K1 y K2

participarían en la formación y estabilidad de los dímeros (Kaufmann et al., 2005; Yang et al., 2003) (Fig. I-2 C), mientras que el subdominio K3 sería necesario para la formación de los complejos multiméricos (Melzer y Theissen, 2009; Melzer et al., 2009) (Fig. I-2 D).

El modelo del cuarteto

La combinación del modelo genético ABC y la capacidad de dimerización y formación de complejos de orden superior mostrada por las proteínas MADS dio lugar a la elaboración del modelo del cuarteto (Egea-Cortines et al., 1999; Theissen y Saedler, 2001). Este modelo, ampliamente aceptado, explica que diferentes interacciones entre dos dímeros de proteínas MADS dirigirían el desarrollo de los diferentes órganos que forman la flor (Theissen y Saedler, 2001). Según este modelo, un cuarteto formado por AP1 y SEP dirigiría la formación de los sépalos, otro formado por AP1, SEP, PI y AP3 daría lugar a los pétalos, otro formado por AP3, PI y SEP daría lugar a los estambres y el cuarteto formado por AG y SEP daría lugar al gineceo (Fig. I-3). Este modelo también propone que los cuartetos de proteínas MADS formarían dos motivos CArG situados relativamente próximos en la secuencia diana. En este hipotético modelo, el DNA se curvaría alrededor del cuarteto generando un bucle (Fig. I-2 D, Fig. I-3). Este bucle modificaría la estructura de la doble hélice de DNA, lo que podría facilitar/impedir la transcripción del gen asociado (Melzer y Theissen, 2009; West et al., 1998; West y Sharrocks, 1999), aunque sólo existen evidencias *in vitro* que apoyen la formación de este bucle mediado por la presencia de proteínas MADS (Melzer y Theissen, 2009; Melzer et al., 2009).

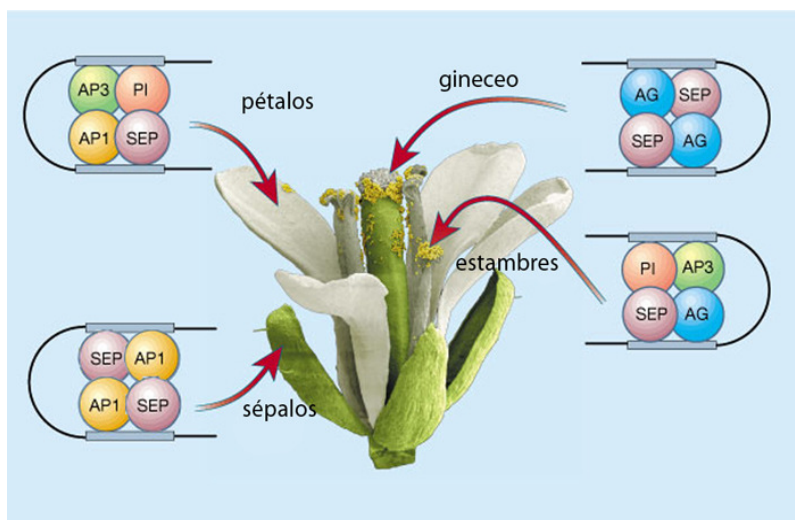


Figura 0-3: El modelo del cuarteto complementa el modelo genético ABC. Este modelo integra la información genética del modelo ABC con la información obtenida de la interacción de las diferentes proteínas implicadas.

La formación de dímeros y de complejos de orden superior de proteínas MADS conferiría un mecanismo que permitiría incrementar la especificidad funcional de estas proteínas en función del complejo formado, variando la afinidad por sus diferentes dianas (de Folter y Angenent, 2006). Además, el hecho de que una misma proteína MADS pueda interactuar con otras diferentes (de Folter et al., 2005) implica que podría existir competencia para la formación de estos complejos, de modo que su formación estaría regulada por la afinidad entre las proteínas o por relaciones estequiométricas existentes entre ellas, proporcionando un nivel de regulación extra a los procesos de desarrollo que controlan (Immink et al., 2010).

Las proteínas MADS, además de interactuar con otros miembros de su familia, son capaces de interactuar con otras proteínas (Messenguy y Dubois, 2003). En plantas se han observado

interacciones de MADS con modificadores de la cromatina (Hill et al., 2008; Liu et al., 2009), factores de transcripción (Causier et al., 2003; Masiero et al., 2002), correpresores (Sridhar et al., 2006), o factores de modificación post-transcripcional (Fujita et al., 2003; Gamboa et al., 2001; Yalovsky et al., 2000), sugiriendo que podrían estar formando parte de grandes complejos reguladores.

El factor de transcripción *FRUITFULL*.

FRUITFULL, o *AGL8*, es un factor de transcripción que pertenece al grupo MIKC de la familia de factores de transcripción tipo MADS-box de *Arabidopsis thaliana* (Gu et al., 1998; Mandel y Yanofsky, 1995). Dentro de este grupo, *FUL* forma parte de un pequeño clado junto con *AP1* y *CAL*, dos genes implicados en el establecimiento de la identidad de meristemo floral y en el desarrollo de los sépalos y pétalos de la flor (Kempin et al., 1995; Mandel et al., 1992), y *AGL79* (Parenicova et al., 2003). Aunque *AP1*, *CAL* y *FUL* presentan algunas funciones en común y actúan de forma redundante en el establecimiento de la identidad de meristemo floral (Ferrándiz et al., 2000a), el patrón de expresión de *FUL* es muy diferente al de *AP1* y *CAL* (Gu et al., 1998; Kempin et al., 1995; Mandel y Yanofsky, 1995).

El patrón de expresión de *FUL*

FUL presenta un patrón de expresión dinámico durante todo el desarrollo de *Arabidopsis* limitado a la parte aérea de la planta. La caracterización de este patrón de expresión se ha establecido a partir de líneas deladoras de la expresión del gen (Gu et al., 1998) y de la proteína (Urbanus et al., 2009) y mediante localizaciones *in situ* del mRNA que codifica la proteína (Hempel et al., 1997; Mandel y Yanofsky, 1995). Tanto el RNA de *FUL* como su proteína presentan una localización idéntica.

Durante el desarrollo vegetativo la expresión de *FUL* se detecta a bajos niveles en los primordios foliares y en la vasculatura de las hojas, con máximos de expresión en los hidatodos. Justo antes de la transición floral, la expresión de *FUL* experimenta un brusco aumento en el meristemo apical del tallo, donde se mantiene elevada durante todo el desarrollo de la inflorescencia. Durante esta etapa del desarrollo, la expresión de *FUL* también se detecta en la vasculatura del tallo y fuertemente en las hojas caulinares. La expresión de *FUL* no se detecta en los estadios iniciales del desarrollo floral (estadios 0 a 3) (estadios definidos según (Smyth et al., 1990)), reapareciendo su expresión en el estadio 3 restringido al centro del meristemo floral, donde se mantiene hasta la aparición del primordio del carpelo o estadio 6. Durante el desarrollo del gineceo (estadios 6-14), la expresión de *FUL* se restringe a las valvas del nuevo pistilo y a la vasculatura del estilo, donde se mantiene hasta la maduración del fruto (estadios 15-18).

Los mutantes *ful*

Inicialmente, *FUL* fue identificado por homología de secuencia a otros genes MADS y recibió el nombre de *AGL8* (Mandel y Yanofsky, 1995). Posteriormente, se identificó en una colección de mutantes generada por "enhancer trap" (Sundaresan et al., 1995) un mutante de pérdida de función en *AGL8* que recibió el nombre de *fruitfull-1* debido al fenotipo mostrado por los frutos del mutante, donde las valvas se rompían dejando a la vista las semillas y confiriendo así un aspecto de fruto rebosante de semillas (Gu et al., 1998). Actualmente se dispone de una serie alélica, cuyos mutantes muestran diferente severidad (Ferrándiz et al., 2000a). En este

trabajo de tesis se utilizaron los alelos *ful-1* (ecotipo Lansberg) y *ful-2* (ecotipo Columbia). Ambas líneas están consideradas mutantes nulos y presentan fenotipos severos.

Las mutaciones en el gen *FUL* generan varios fenotipos, afectando principalmente al tiempo de floración, el desarrollo de las hojas caulinares y el desarrollo del gineceo y del fruto, en concordancia con el patrón de expresión descrito para el gen (Gu et al., 1998). Las plantas mutantes *ful* presentan un desarrollo vegetativo aparentemente normal, pero a partir del momento de la transición floral, los fenotipos del mutante empiezan a hacerse patentes. El primer fenotipo observado es un ligero retraso del tiempo de floración cuando las plantas crecen en condiciones de día largo, que se traduce en la producción de alguna hoja más en el mutante respecto a las plantas silvestres (Ferrándiz et al., 2000b; Gu et al., 1998; Melzer et al., 2008). Este efecto es mucho más pronunciado en condiciones de día corto (Melzer et al., 2008) (ver capítulo 1). El siguiente fenotipo que se observa en el mutante afecta al desarrollo de las hojas caulinares, que son más cortas y redondeadas que las hojas caulinares silvestres (Gu et al., 1998) (Fig. I-4 C). Durante el desarrollo floral no se aprecia ninguna alteración del desarrollo hasta que se inicia el desarrollo del gineceo, donde se observa el fenotipo más drástico de la mutación. Los frutos desarrollados por el mutante *ful* son mucho más cortos que los frutos silvestres (Fig. I-4 A), presentando también un replum característico en zigzag, debido a la falta de elongación de las valvas que además, se lignifican ectópicamente (Ferrándiz et al., 2000b; Gu et al., 1998);(Ferrándiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2004). Los frutos *ful* también presentan alteraciones en el desarrollo del estilo, aunque este fenotipo depende del ecotipo en el que se encuentre la mutación (Ferrandiz et al., 2000a).

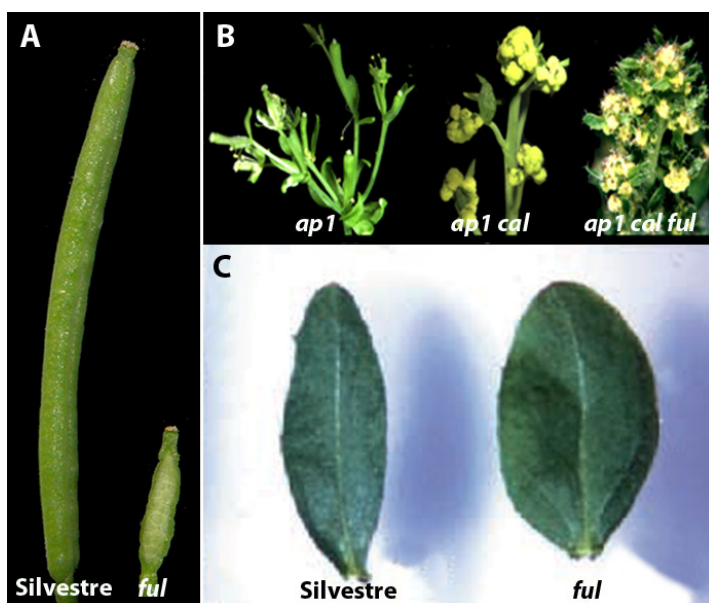


Figura I-4: Fenotipos dependientes de la mutación *ful*. (A) el mutante *ful* presenta frutos mucho más cortos las plantas silvestres. (B) *FUL* presenta redundancia funcional con otros dos genes muy próximos filogenéticamente, *AP1* y *CAL*, en el establecimiento de la identidad del meristemo floral. La combinación progresiva de mutantes en estos genes provoca un incremento en la falta de identidad de los meristemas florales. (C) el mutante *ful* presenta hojas caulinares mucho más anchas que las plantas silvestres.

El papel de *FUL* en el desarrollo del fruto

De acuerdo con su patrón de expresión, y los fenotipos observados en mutantes de pérdida de función de *FUL*, se han propuesto diferentes funciones para el gen *FUL*:

De todas las funciones propuestas para *FUL*, la más estudiada y de la que más información se dispone es sobre su papel durante el desarrollo del fruto en *Arabidopsis* (Balanza et al., 2006; Dinneny et al., 2005; Girin et al., 2009). *FUL* tiene un papel clave en el establecimiento del eje de simetría medio-lateral del gineceo, y en concreto, en el establecimiento de las zonas de

margen de valva. El margen de valva es el lugar donde se generarán los tejidos especializados que mediarán la correcta dehiscencia del fruto y que permite la dispersión de las semillas maduras (ver capítulo 3). Esta función la ejerce al reprimir la expresión en la valva de los genes que promueven la diferenciación del margen de la valva, *SHP1* y *SHP2*, también de tipo MADS, y los genes que estos activan *INDEHISCENT (IND)* y *ALCATRAZ (ALC)* (Ferrándiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2004; Rajani y Sundaresan, 2001).

El papel de *FUL* en la identidad de meristemo floral

Otra función atribuida a *FUL* es un posible papel en el establecimiento de la identidad de meristemo floral, donde actuaría redundantemente con *AP1* y *CAL*. Anteriormente hemos comentado que *FUL* presenta una alta similitud de secuencia con *AP1* y *CAL*. *AP1* y *CAL* confieren identidad de meristemo floral, en parte, manteniendo la expresión de *LEAFY (LFY)* en el meristemo floral. En el triple mutante *ap1 cal ful*, que no es capaz de florecer, se pierde la identidad de meristemo floral, y la expresión de *LFY* es mucho más baja que en el doble *ap1 cal* (Ferrandiz et al., 2000a) (Fig. I-4 B) por lo que, *FUL* podría estar funcionando de forma similar a *AP1* y *CAL* en la regulación de *LFY*. Como también hemos comentado, *AP1* y *CAL* presentan un patrón de expresión diferente al de *FUL*. *AP1* reprime la expresión de *FUL* en los primeros estadios de desarrollo floral, pero en el mutante *ap1*, *FUL* ocupa su lugar (Mandel y Yanofsky, 1995), por lo que de algún modo podría estar sustituyendo a *AP1* en algunas funciones.

El papel de *FUL* en el tiempo de floración

Cuando se caracterizó el mutante *ful* también se propuso un posible papel para *FUL* en el proceso de la transición floral, donde actuaría como un promotor de ésta (Gu et al., 1998; Ferrandiz et al., 2000a; Ferrandiz et al., 2000b). Trabajos recientes apuntan a que *FUL* participa en diferentes rutas que controlan este proceso, como la ruta del fotoperiodo (Melzer et al., 2008; Teper-Bamnolker y Samach, 2005; Wigge et al., 2005) o la ruta endógena de la edad (Wang et al., 2009) (ver capítulo 1).

Otras funciones

También muy recientemente, y relacionado con el fenotipo que presenta el mutante *ful* en el desarrollo de las hojas caulinares (Gu et al., 1998) (Fig. I-4 C), se ha sugerido que *FUL* podría estar implicado en la adquisición de caracteres reproductivos en la inflorescencia durante la transición floral, actuando aguas abajo de algunos factores de transcripción de la familia tipo SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN (SPL), en concreto SPL10, SPL11 y SPL2 (Shikata et al., 2009).

Todas las funciones propuestas presentan una clara relación entre los fenotipos observados y el patrón de expresión descrito, aunque no se pueda descartar que existan nuevas funciones asociadas a la actividad de *FUL* que pudieran quedar enmascaradas por efectos de redundancia génica, como ocurre con la función propuesta en el establecimiento de la identidad del meristemo floral.

OBJETIVOS GENERALES

Objetivos generales.

Los objetivos generales de este trabajo de tesis doctoral son obtener más información sobre como *FUL* participa en los procesos anteriormente descritos así como identificar nuevas funciones de *FUL* durante el desarrollo de *Arabidopsis*, desvelando en la medida de lo posible los mecanismos moleculares implicados y su relación funcional con otros genes ya caracterizados e importantes para el control de estos procesos.

En el **capítulo 1**, se pretende averiguar cuál es la contribución de *FUL* durante la transición floral, y como ejerce su función reguladora en este proceso

En el **capítulo 2** se estudiará la posible actividad de *FUL* en la regulación del mantenimiento meristemático. Además se estudiará la relación existente entre *FUL* y otros genes reguladores del mantenimiento meristemático.

En el **capítulo 3** intentaremos profundizar en el estudio papel de *FUL* durante el desarrollo del fruto. Se realizará un experimento de micromatrices en los estadios iniciales del desarrollo del fruto con la intención de obtener una idea general de los procesos en las que participa *FUL* en estas etapas.

CAPÍTULO 1: El Papel de *FUL* Durante la Transición Floral.

Introducción

La transición floral en *Arabidopsis thaliana*.

Durante los últimos 20 años se han llevado a cabo grandes progresos en la comprensión, a nivel molecular, de los mecanismos que controlan la transición floral, y que confirman muchas de las observaciones fisiológicas ya establecidas a principios del siglo pasado, como la dependencia de un determinado fotoperiodo para estimular la floración, o la existencia del “florigeno”, una señal producida en las hojas y que viajaría al meristemo apical del tallo donde desencadenaría la floración (Chailakhyan, 1936; Garner y Allard, 1920; Klebs, 1918; Knott, 1934; Tournois, 1914). Gran parte de este trabajo se ha llevado a cabo en *Arabidopsis thaliana*, que se ha constituido como el organismo modelo principal para los estudios de tiempo de floración y de biología molecular de plantas en general.

La transición floral en *Arabidopsis* se considera un cambio de fase de desarrollo. Esta transición supone un cambio drástico en el hábito de crecimiento de la planta, ya que se pasa de una fase de desarrollo vegetativo a una fase de desarrollo reproductivo. El desarrollo vegetativo se caracteriza por la formación de la roseta típica de *Arabidopsis*, donde el meristemo apical del tallo produce hojas de forma sucesiva, sin elongación entre ellas. Durante el desarrollo reproductivo se genera la inflorescencia, y el meristemo apical del tallo, en lugar de hojas produce flores (Fig. 1-1 A). Los cambios entre ambas fases son evidentes: elongación de los diferentes entrenudos producidos, que resulta en el alzado o “bolting” de la inflorescencia; supresión paulatina del desarrollo y de caracteres vegetativos de las hojas (forma y distribución de tricomas); activación de los meristemos axilares de las hojas, que generarán las coflorescencias; y desarrollo de flores.

Para explicar este proceso se han propuesto dos modelos (Pouteau y Albertini, 2009; Suh et al., 2003). El primero describe una transición en un único paso (modelo bidireccional) donde el meristemo apical del tallo pasaría de un estado vegetativo (desarrollo vegetativo, V) a la producción de flores directamente (desarrollo inflorescente, I). En este modelo, se propone la existencia de un estímulo acropétalo para la formación de las flores y un estímulo basipétalo para el establecimiento de las hojas caulinares y coflorescencias (Fig. 1-1 B). Las hojas caulinares y las coflorescencias se desarrollarían a la vez que las flores a partir de los primordios foliares existentes, tras la inducción floral. Este modelo explica lo que se observa cuando la transición ocurre en condiciones de día largo (Hempel y Feldman, 1994). El segundo modelo propone una transición en dos pasos (modelo acropétalo), donde el meristemo apical del tallo pasaría de una fase inicial vegetativa (V) a una fase inflorescente (I) intermedia donde generaría las hojas caulinares y los primordios de las coflorescencias (I1). Posteriormente el meristemo apical del tallo sufriría un segundo cambio de fase donde el meristemo apical del tallo iniciaría la producción de las flores (I2) (Fig. 1-1 C). Este modelo explica lo que se observa cuando la transición ocurre en condiciones de día corto y en algunos fondos genéticos en condiciones de día largo (Blazquez, 2000; Haughn et al., 1995; Ratcliffe et al., 1998; Suh et al., 2003).

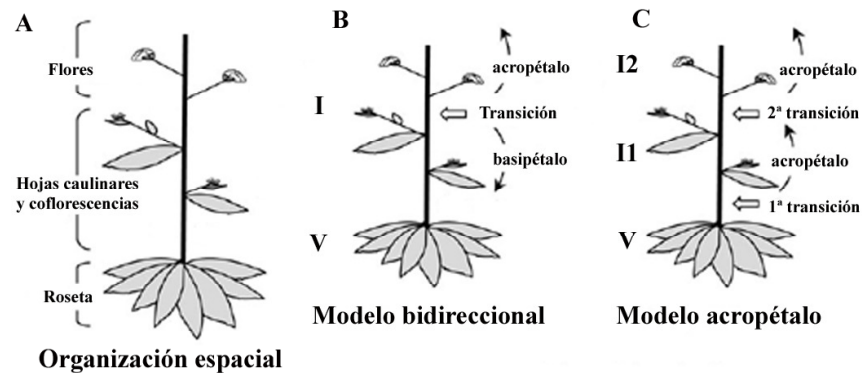


Figura 1-1: Modelos de desarrollo y arquitectura de Arabidopsis. Esquema de la arquitectura de Arabidopsis (A) y modelos de desarrollo propuestos (B y C) para explicar la transición floral. El modelo bidireccional (B) propone una única transición que delimita la fase V y la I, mientras que el modelo acropétalo (C) propone dos transiciones que diferencian tres etapas, V, I1 y I2.

La selección del momento idóneo para iniciar el desarrollo reproductivo es una de las decisiones más importantes que han de tomar las plantas. De esta decisión dependerá, en gran medida, su éxito reproductivo. Las plantas, al ser organismos sésiles, no pueden desplazarse en busca de lugares o condiciones favorables para su desarrollo, por lo que deben de ser capaces de percibir y reaccionar a las condiciones ambientales que les rodean. Toda esta información externa debe ser integrada junto a señales internas propias para establecer y coordinar el desarrollo reproductivo en el momento adecuado. Las señales externas o exógenas más determinantes en el control del tiempo de floración son el fotoperiodo (intervalo de horas de luz que perciben al día) y la temperatura, aunque también influyen otros factores como la calidad de la luz o la presencia de estreses. Las señales internas o endógenas más importantes son la edad de la planta y los niveles hormonales. Todas estas señales inductoras determinan finalmente la expresión de un grupo de genes denominados genes integradores de la transición floral, que a su vez dirigen y activan a los genes de identidad floral (Adrian et al., 2009; Amasino, 2010; Ausin et al., 2005; Michaels, 2009; Wellmer y Riechmann, 2010).

En Arabidopsis, en función de las condiciones que promueven la transición floral, se han establecido 4 rutas genéticas "clásicas" (Blazquez, 2000): La ruta del fotoperiodo, que controla la transición floral en función del tiempo que la planta recibe luz; la ruta de la vernalización, por la que la planta florece tras la exposición a un periodo de frío prolongado; la ruta autónoma, que integraría un grupo de genes que afectan a la transición de forma independiente de las condiciones externas; y por último, la ruta de las giberelinas, que resulta de suma importancia en condiciones de fotoperiodo no inductivo o día corto. Otra ruta que afecta al tiempo de floración sería la establecida por la temperatura (Blazquez et al., 2003). Recientemente, se ha descrito una nueva ruta que controla la transición floral en función de factores endógenos establecidos por la edad o estado de desarrollo de la planta, que denominaremos como ruta endógena (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009).

La ruta del fotoperiodo

Las plantas se pueden considerar, en función del fotoperiodo requerido para florecer, como plantas de día largo o plantas de día corto (Garner y Allard, 1920). Las plantas de día largo inician la transición cuando perciben que las horas de luz del día exceden las horas de oscuridad, por lo que florecen en primavera-verano. Por su parte las plantas de día corto

florece cuando perciben que las horas de luz diarias disminuyen, floreciendo en otoño. *Arabidopsis* es una planta de día largo facultativa. Esto quiere decir que *Arabidopsis* inicia la transición floral en condiciones de día largo, pero que en condiciones de día corto o no fotoinductivas, también es capaz de florecer, aunque necesita mucho más tiempo para iniciar el proceso (Redei, 1962).

En la ruta del fotoperiodo son claves la percepción de la luz y el reloj circadiano y la regulación que ambos ejercen sobre la proteína CONSTANS (CO) (Suarez-Lopez et al., 2001; Yanovsky y Kay, 2002). En *Arabidopsis*, CO se expresa en la vasculatura de hojas y tallo (Putterill et al., 1995) y su transcripción está regulada directamente por el reloj circadiano, presentando baja expresión al principio del día y un incremento de ésta tras las siguientes 8 horas (Suarez-Lopez et al., 2001; Yanovsky y Kay, 2002). La proteína CO se estabiliza con la luz, mientras que es degradada en oscuridad, gracias a la actividad de diferentes fotoreceptores (Valverde et al., 2004). La regulación ejercida por el reloj circadiano, favoreciendo niveles altos de expresión de CO al final del día, y el efecto de la luz, favoreciendo la estabilidad de su proteína, constituyen un sofisticado sistema de regulación que asegura que la proteína CO este presente únicamente cuando los días exceden un determinado número de horas (fotoperiodos con más de 8 horas de luz), permitiendo sólo entonces su actividad, y por tanto, el inicio de la transición floral (Fig. 1-2) (Imaizumi et al., 2005; Sawa et al., 2007; Valverde et al., 2004).

Una vez CO está presente, se activa la expresión de *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Fig. 1-2) (Suarez-Lopez et al., 2001; Wigge et al., 2005; Yanovsky y Kay, 2002). FT, al igual que CO, se expresa en la vasculatura de las hojas (An et al., 2004; Takada y Goto, 2003; Wigge et al., 2005). La proteína FT se transporta entonces al meristemo apical del tallo o SAM (del inglés shoot apical meristem) (Fig. 1-2) (Corbesier et al., 2007; Jaeger y Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007; Wigge et al., 2005). Una vez en el meristemo apical, FT interacciona con el factor de transcripción *FLOWERING LOCUS D (FD)* (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005), que se expresa de forma continuada en el meristemo apical (Fig. 1-2). El dímero FT - FD inicia la activación de toda una serie de genes que dirigen la transición floral y el desarrollo floral, como los factores de transcripción tipo MADS-box *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*, *FUL*, y *AP1* (Abe et al., 2005; Corbesier et al., 2007; Searle et al., 2006; Wigge et al., 2005)(Fig. 1-2).

Esta ruta está regulada también por otras proteínas consideradas represoras de la transición floral y que a su vez, también se consideran integradores de las señales de floración en otras rutas: Los factores de transcripción tipo MADS *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, que media las rutas de la vernalización y la ruta autónoma, y *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* que media los efectos de la temperatura en la floración (Hartmann et al., 2000b; Lee et al., 2007). Ambas proteínas cooperan para reprimir directamente la expresión de los integradores de esta ruta, FT, en las hojas, y FD y SOC1 en el SAM (Lee et al., 2007; Li et al., 2008; Searle et al., 2006).

Además, se han descrito otras proteínas que controlan esta ruta a través de la represión de sus integradores, como *TEMPRANILLO1 (TEM1)* y *TEM2* (Castillejo y Pelaz, 2008); un clado de factores de transcripción tipo AP2 que participan en la ruta autónoma: *TARGET OF EAT1 (TOE1)*, *TOE2*, *TOE3*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)*, *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* y *APETALA2 (AP2)* (Mathieu et al., 2009; Schmid et al., 2003; Yant et al., 2010)(ruta endógena); y proteínas implicadas en procesos de represión epigenética, como *LIKE HETEROCHROMATIN1/TERMINAL*

FLOWER2 (LHP1/TFL2) y EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS) (Fig. 1-2) (Adrian et al., 2010; Germann et al., 2006; Kotake et al., 2003; Pineiro et al., 2003; Takada y Goto, 2003).

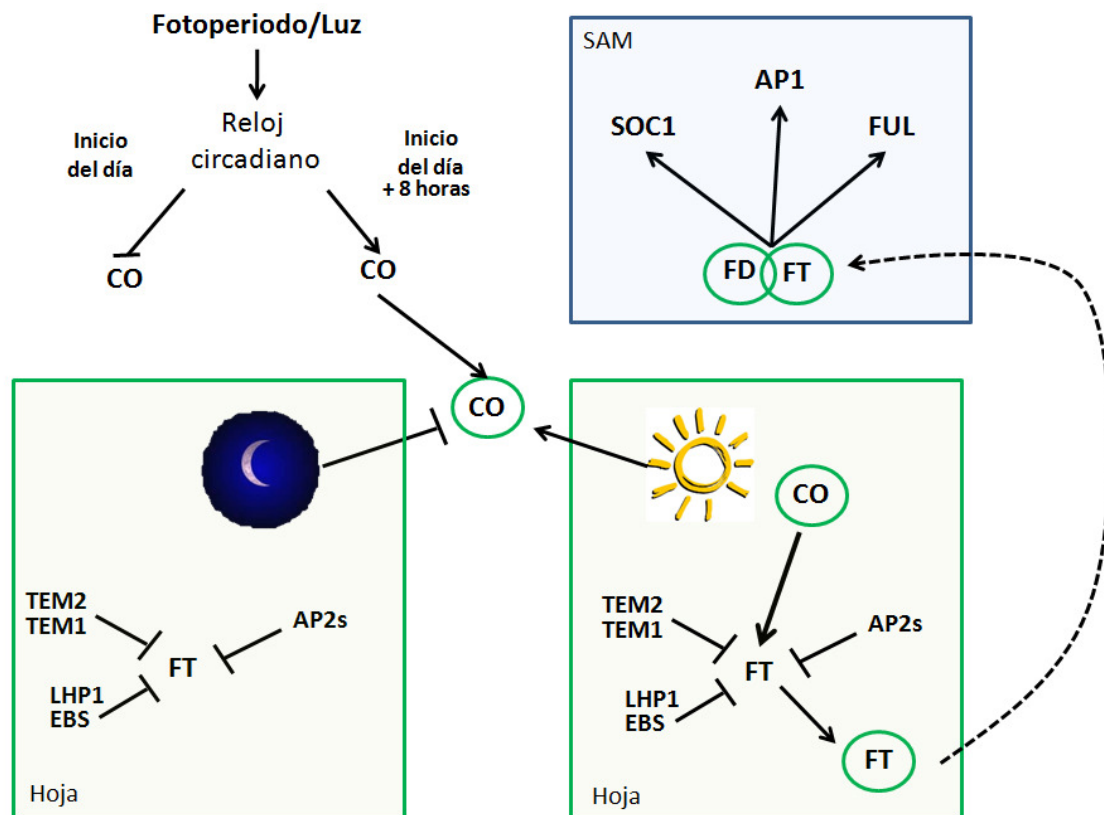


Figura1-2: Ruta del fotoperiodo. La ruta del fotoperiodo controla la transición floral en función de las horas de luz percibidas por la planta. En esta ruta es clave la regulación de gen *CO*. La expresión de su mensajero está regulada por el reloj circadiano, presentando niveles bajos de expresión al inicio del día y un máximo de expresión unas 8-10 horas después del amanecer. A su vez la proteína *CO* sólo es estable en presencia de luz, por lo que aunque se esté expresando el gen sólo encontraremos la proteína cuando los niveles altos de expresión se den en presencia de luz, que sólo ocurre en condiciones de día largo. En presencia de *CO* se desreprime la expresión de *FT* en las hojas, que viaja vía floema hasta el SAM. Una vez en el SAM, *FT* interacciona con el factor de transcripción *FD* y activa la expresión de *SOC1*, *FUL* y *AP1* que inician la transición floral y el desarrollo floral.

La ruta de la vernalización

Otro factor que promueve la floración en *Arabidopsis* es la exposición prolongada al frío o vernalización. Mediante este proceso la planta percibe el paso del invierno. En contraste con los ecotipos de ciclo rápido que se utilizan en el laboratorio, muchos ecotipos naturales presentan floración tardía si no experimentan un periodo de frío. Estos ecotipos se denominan ecotipos de hábito invernal al florecer tras el paso del invierno. La vernalización elimina el bloqueo de la transición floral que ejerce la interacción de dos genes, el represor floral *FLC* (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999), y *FRIGIDA* (*FRI*), que promueve fuertemente la expresión de *FLC* (Fig. 1-3) (Johanson et al., 2000; Michaels y Amasino, 1999). Cambios en las regiones codificantes o reguladoras de estos genes son los responsables de gran parte de la variación natural en el tiempo de floración existente entre los diferentes ecotipos de *Arabidopsis* (Johanson et al., 2000; Michaels et al., 2003b; Salome et al., 2011; Shindo et al., 2005; Werner et al., 2005a; Werner et al., 2005b). De hecho, los ecotipos de ciclo rápido utilizados en el laboratorio presentan mutaciones en al menos uno de estos dos genes, que

eliminan su expresión o confieren a las proteínas codificantes muy baja actividad, permitiendo que inicien la transición floral sin el requerimiento de vernalización (Michaels et al., 2003b). Las plantas en las que existe la combinación de alelos funcionales de FRI y FLC presentan niveles elevados de la proteína FLC desde los estadios iniciales de desarrollo, impidiendo así la transición floral incluso cuando el fotoperiodo es el adecuado. FLC impide la transición floral al reprimir directamente a FT y SOC1 en las hojas, y a FD y SOC1 en el SAM (Helliwell et al., 2006; Li et al., 2008; Searle et al., 2006)(ruta del fotoperiodo)(Fig. 1-3), impidiendo de este modo, tanto la generación de la señal de la ruta del fotoperiodo, como la capacidad de respuesta del SAM a este estímulo (Searle et al., 2006).

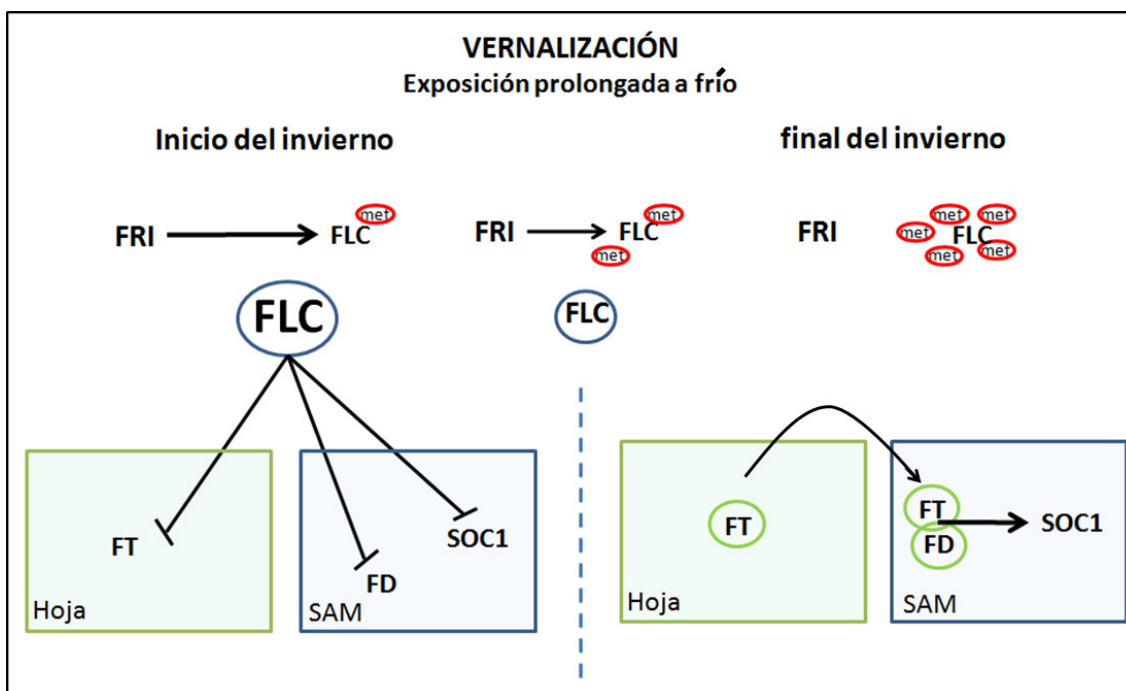


Figura 1-3: Ruta de la vernalización. La ruta de la vernalización permite la transición floral solamente tras el paso del invierno. En esta ruta son clave los genes FRI y FLC. FRI es un fuerte activador de la expresión de FLC y FLC es un represor de los genes FT, SOC1 y FD, que participan en la activación de la transición floral, percibiendo señales procedentes de otras rutas. La acción de FRI confiere altos niveles de FLC que impiden la transición floral. Durante el invierno, o una larga exposición a frío, se acumulan modificaciones epigenéticas sobre la región genómica de FLC que propician su silenciamiento. Una vez FLC deja de expresarse, la planta es capaz de responder a estímulos activadores de la transición floral, como la ruta del fotoperiodo, permitiéndose la activación de FT, SOC1 y FD.

Durante la vernalización se produce la represión transcripcional de *FLC* a través de modificaciones epigenéticas de la región genómica del gen, que terminan en el silenciamiento estable de *FLC* (Fig. 1-3). De este modo, se asegura que las plantas no florecerán durante el invierno, permitiéndose la transición floral sólo cuando éste ha pasado y las condiciones se vuelven favorables (Amasino, 2010; Amasino y Michaels, 2010; Kim et al., 2009).

Además, la vernalización también modifica la expresión de otros factores de transcripción de la familia MADS, como *FLOWERING LOCUS M (FLM)*, *MADS AFFECTING FLOWERING 1 (MAF1)* y *MAF2*, pertenecientes al clado de FLC y que también reprimen la transición (Alexandre y Hennig, 2008; Ratcliffe et al., 2003; Scortecci et al., 2001), y *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)* y *AGL19* (Michaels et al., 2003a; Schonrock et al., 2006), que son promotores de la transición floral.

La ruta autónoma

Cuando se iniciaron los estudios de tiempo de floración en *Arabidopsis*, se identificaron una serie de mutantes que presentaban retraso tanto en condiciones fotoinductivas como en condiciones no fotoinductivas, por lo que se consideró que afectaban a una ruta constitutiva que promovía la transición floral (Abe et al., 2005; Koornneef et al., 1991). Los genes afectados por estas mutaciones se han considerado como miembros de una ruta que afecta a la transición floral de forma independiente de las condiciones ambientales, denominada ruta autónoma de la floración (Simpson y Dean, 2002). Los mutantes identificados en esta ruta, curiosamente, presentaban una clara respuesta a la vernalización (Koornneef et al., 1991; Martínez-Zapater y Somerville, 1990; Simpson y Dean, 2002) debido a la presencia de altos niveles de *FLC* (Michaels y Amasino, 2001)(ruta de la vernalización) (Fig. 1-4).

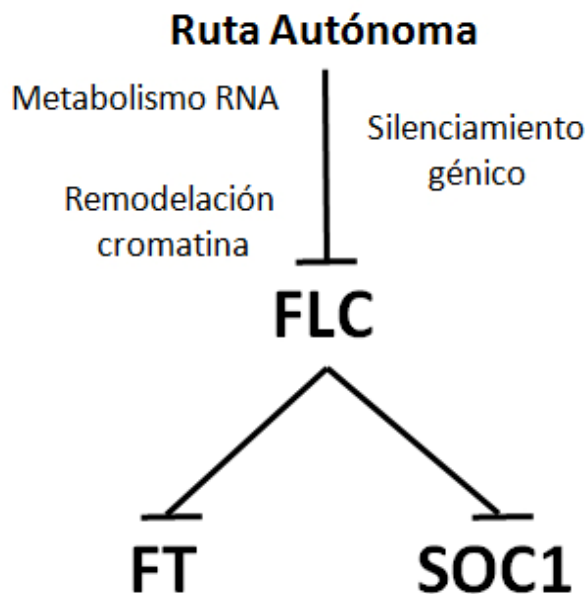


Figura 1-4: Ruta autónoma. Clásicamente la ruta autónoma se ha considerado como una ruta independiente de las condiciones ambientales y que al igual que la ruta de la vernalización, controla los niveles de *FLC*. En esta ruta se engloban genes que afectan a diferentes procesos generales de la planta, como genes del metabolismo del RNA, implicados en el silenciamiento génico o en la remodelación de la cromatina.

A pesar de existir un buen número de mutantes de esta ruta, la relación entre ellos es incierta. *FCA*, *FLOWERING LOCUS K HOMOLOGY DOMAIN (FLK)*, *FPA*, *FY* y *LUMINIDEPENDENS (LD)* son genes que estarían implicados en el metabolismo del RNA (Lim et al., 2004; Macknight et al., 1997; Manzano et al., 2009; Schomburg et al., 2001; Simpson et al., 2003). *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6)*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)* y *FVE* codifican proteínas que forman parte de complejos remodeladores de la cromatina (Ausin et al., 2004; He et al., 2003; Hennig et al., 2005; Kim et al., 2004; Noh et al., 2004). Además de la regulación de *FLC*, todos estos genes están implicados en otros procesos de desarrollo, ya que combinaciones génicas de ellos, y algunos mutantes simples nulos, generan letalidad o presentan fenotipos severos y pleiotrópicos (Henderson et al., 2005; Koornneef et al., 1998; Veley y Michaels, 2008). También se ha observado que algunos de estos genes tienen un amplio papel en el silenciamiento génico mediado por RNA y en la metilación y expresión de ciertos transposones (Baurle y Dean, 2008; Baurle et al., 2007; Veley y Michaels, 2008). Por todo esto, podríamos considerar que la ruta autónoma representa una colección de genes que están implicados en la represión de la expresión génica de diferentes procesos de desarrollo siendo uno de ellos el establecimiento de la represión de *FLC* (Fig. 1-4).

La ruta de las giberelinas

Las giberelinas (GAs) juegan un papel muy importante en la promoción de la transición floral, sobretodo en condiciones de día corto donde el efecto de la ruta del fotoperiodo no está presente (Moon et al., 2003; Mutasa-Gottgens et al., 2009; Wilson et al., 1992). De este modo, mutaciones que afectan a la señalización de esta hormona presentan fenotipos en el tiempo de floración (Jacobsen y Olszewski, 1993; Kania et al., 1997; Reeves y Coupland, 2001; Wilson et al., 1992). La ruta de las giberelinas promueve la floración al activar finalmente la expresión de *SOC1* y *FT*, y también la expresión de *AGL24* y *LFY* (Fig. 1-5) (Blázquez y Weigel, 2000; Hisamatsu y King, 2008; Liu et al., 2008; Moon et al., 2003). Aunque no se conoce muy bien como las GAs activan la expresión de *SOC1*, *AGL24* o *FT*, su acción sobre *LFY* está bien caracterizada. Las GAs promueven la expresión de un factor de transcripción tipo GAMYB, *GAMYB33*, y la del miR159. *GAMYB33* activa directamente la expresión de *LFY*, a la vez que promueve la expresión del miR159, mientras que el miR159 controla los niveles del mensajero de *GAMYB33* (Achard et al., 2004; Blázquez y Weigel, 2000; Gocal et al., 2001). De este modo, en condiciones de día corto, la regulación existente entre el *GAMYB33* y el miR159 mediada por la acción de las GAs modula la expresión de *LFY*, y la transición floral de *Arabidopsis* (Eriksson et al., 2006).

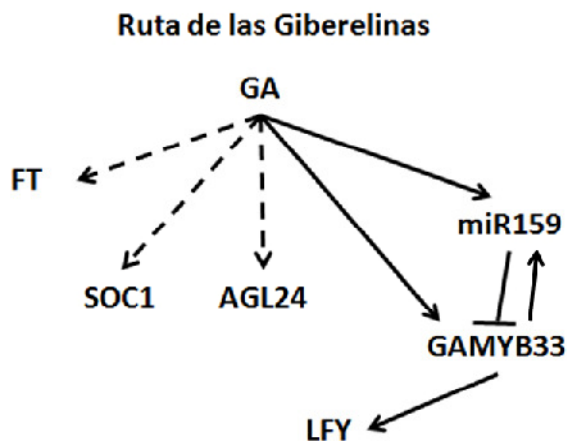


Figura 1-5: Ruta de las giberelinas La ruta de las giberelinas actúa principalmente en condiciones no fotoinductivas, activando la expresión de diferentes genes implicados en la promoción de la transición floral, como *FT*, *SOC1* y *AGL24*, aunque se desconoce exactamente el mecanismo seguido. Las GA además promueven la expresión del miR159 y *GAMYB33*, entre los que se establece un ciclo de retroalimentación negativo, que controlan la expresión del gen de identidad floral *LFY*.

La ruta endógena

Para que se dé la transición floral la planta debe haber adquirido la capacidad de poder responder a las señales que la estimulan. La capacidad de florecer se adquiere cuando la planta realiza la transición de la etapa juvenil a la fase adulta (Poethig, 2003). Durante la fase adulta la planta es capaz de responder a todas las señales ambientales y endógenas que regulan la transición floral. Recientemente se han descrito las bases moleculares que regulan estas transiciones y que constituyen una nueva ruta reguladora del tiempo de floración (Mathieu et al., 2007; Mylne et al., 2006; Wu et al., 2009). Este proceso está controlado por el balance entre dos microRNAs, el miR156 y el miR172, y los genes controlados por éstos, las familias génicas *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE* (SPLs) y *AP2*, respectivamente.

Durante la etapa inicial de la vida de *Arabidopsis*, los niveles del miR156 son altos, reprimiendo la actividad de los factores de transcripción SPL (Wu y Poethig, 2006). La expresión de miR-156 se reduce paulatinamente con la edad, permitiendo así la acción de las proteínas SPL que

median los cambios de fase y la transición floral (Gandikota et al., 2007; Schwarz et al., 2008; Usami et al., 2009; Wang et al., 2008; Wu y Poethig, 2006). Por otro lado, el miR172 tiene un patrón de expresión complementario al del miR156, expresándose a bajos niveles en la etapa inicial de la vida de *Arabidopsis* y aumentando paulatinamente con la edad de la planta (Sung et al., 2006; Wood et al., 2006), reprimiendo la actividad de los factores de transcripción tipo AP2 que, al contrario de las proteínas SPL, reprimen la transición floral (Mylne et al., 2006; Schmid et al., 2003; Schubert et al., 2005; Sung et al., 2006; Wood et al., 2006) (Fig. 1-6). La relación entre estos dos microRNAs controla la presencia de ambos grupos de reguladores de la floración. En etapas tempranas de desarrollo los altos niveles del grupo AP2, evitan la transición floral, a través de la represión directa de *FT* y *SOC1* (Mathieu et al., 2009; Mylne et al., 2006; Schmid et al., 2003; Schubert et al., 2005; Sung et al., 2006; Wood et al., 2006; Yant et al., 2010) (Fig. 1-6). Con el paso del tiempo aumentan los niveles del miR172, que reducen los niveles de la familia AP2, y disminuyen los del miR156, aumentando los niveles de las proteínas SPL que desencadenan la transición floral mediando la activación directa de *SOC1* y *FUL* entre otras proteínas (Fornara y Coupland, 2009; Mathieu et al., 2007; Wu et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009) (Fig. 1-6).

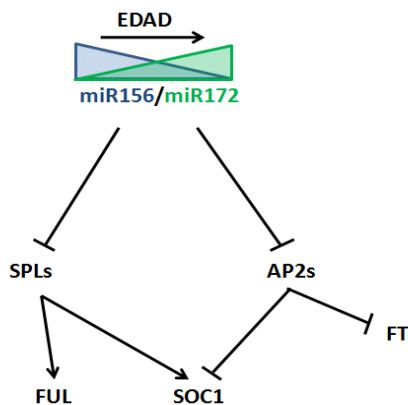


Figura 1-6: Ruta endógena. La ruta endógena permite la transición floral en función de la edad y etapa de desarrollo de la planta. Esta ruta está controlada por dos familias génicas controladas por los niveles de dos miRNAs, el miR156, que controla la expresión de los genes SPLs, y el miR172, que controla la expresión de los genes AP2. El balance entre estos dos miRNAs regula pues los niveles de las proteínas SPL y AP2. En etapas de desarrollo tempranas, el balance favorece los niveles de las proteínas AP2 que actúan reprimiendo la expresión de *FT* y *SOC1*. Con el paso del tiempo, el balance favorece la presencia de las proteínas SPL, que funcionan promoviendo la expresión de *SOC1* y *FUL*, que inician la transición floral.

Efecto de la temperatura

Independientemente del efecto de la vernalización sobre el tiempo de floración en *Arabidopsis*, la temperatura ambiental también afecta a este proceso. Temperaturas de crecimiento bajas, como 16°C, provocan un retraso en el tiempo de floración, mientras que temperaturas elevadas, como 27°C, provocan su adelanto, incluso en condiciones no fotoinductivas (Balasubramanian et al., 2006) (Fig. 1-7). En la percepción de la temperatura estarían implicados algunos fitocromos (Halliday et al., 2003) y también algunos genes relacionados previamente con la ruta autónoma, como *FVE* y *FCA* (Blazquez et al., 2003). Esta ruta modula el tiempo de floración principalmente a través de *SVP* (Lee et al., 2007), un represor de la transición floral (Hartmann et al., 2000a) que actúa directamente sobre la expresión de *FT* y *SOC1* (Li et al., 2008). A temperaturas bajas existirían niveles elevados de *SVP* que impedirían la expresión de *FT* y *SOC1*, mientras que a temperaturas altas disminuirían los niveles de *SVP*, desreprimiéndose la expresión de estos genes (Lee et al., 2007) (Fig. 1-7).

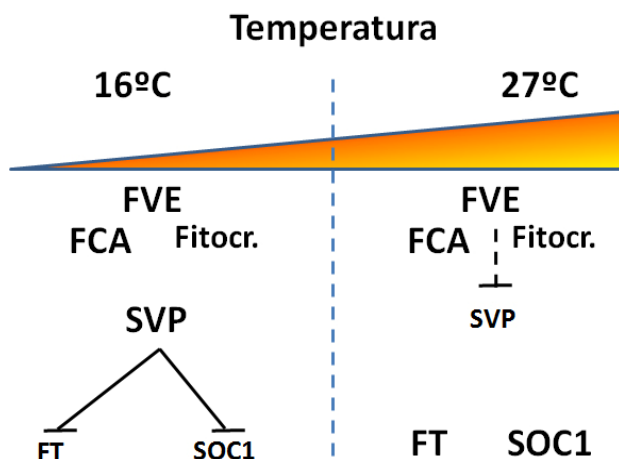


Figura 1-7: Ruta de la temperatura. La temperatura tiene un claro efecto en la transición floral, de modo que altas temperaturas la favorecen mientras que bajas temperaturas la reprimen. Aunque no se ha esclarecido la jerarquía de esta ruta se sabe que participan en ella las proteínas FVE y FCA, así como algunos fitocromos (Fitocr.). Esta ruta influye finalmente en los niveles del represor de la transición *SVP*. A bajas temperaturas los niveles de *SVP* son elevados y reprimen la expresión de los genes *FT* y *SOC1*. A altas temperaturas los niveles de *SVP* son bajos, eliminándose la represión de los genes *FT* y *SOC1*.

Otro gen implicado en esta respuesta sería *FLM*, un parálogo de *FLC*, y que actúa también como un represor de la transición floral (Balasubramanian et al., 2006; Scortecci et al., 2001). *FLM* experimentaría un splicing alternativo a altas temperaturas que provocaría la pérdida de su actividad represora (Balasubramanian et al., 2006; Balasubramanian y Weigel, 2006) facilitando así la transición floral.

Integración de las señales de la floración

Todas las rutas descritas anteriormente convergen en un reducido número de genes que serán los responsables finales de establecer el inicio la transición floral y que reciben el nombre de integradores. El efecto final de todas las rutas es permitir que se puedan incrementar los niveles de *FT* y *SOC1*, bien eliminando represores de su transcripción (vernalización, temperatura, autónoma, endógena), o bien activando su expresión (fotoperiodo, endógena, giberelinas). Además de estos dos genes clásicos, sobre los que se ha acumulado gran cantidad de información, se han identificado otros genes que se podrían considerar también integradores, ya que son capaces de promover la transición floral respondiendo a varias rutas inductoras. Aquí se incluirían *AGL19*, *AGL24* y *FUL*.

La transición floral dependerá del balance existente entre efectos promotores y represores. Los dos genes clave que controlarían la represión de los integradores son *FLC* y *SVP* (Fig. 1-8). Ambas proteínas son capaces de interactuar físicamente y reprimen de forma directa la expresión de *FT* y *SOC1* (Figura 1-8) (Li et al., 2008). Tanto *FLC* como *SVP*, podrían considerarse también integradores de la transición floral, ya que regulan este proceso y a la vez perciben las señales de diferentes rutas: el dímero *FLC-SVP* estaría controlado por la ruta autónoma, la ruta de la vernalización y la ruta de la temperatura. *SVP*, además de la temperatura, también está regulado a través del reloj circadiano, que controla los niveles de su proteína (Fujiwara et al., 2008), y a través de la ruta de las giberelinas, que reducen su expresión (Li et al., 2008).

Al igual que muchas especies de hábito anual, en *Arabidopsis*, la transición floral es un paso irreversible. Una vez alcanzado el compromiso floral, la planta producirá flores independientemente de las condiciones en las que crezca (Bradley et al., 1997). Esta característica de *Arabidopsis* se debe, en parte, a la capacidad que tienen los integradores de la transición floral de activarse los unos a los otros. *FT* activa a *SOC1* y *FUL* en el SAM, y al gen de identidad floral *AP1*, cuando dimeriza con *FD* (Fig. 1-8) (Searle et al., 2006; Shindo et al.,

2005; Werner et al., 2005b; Wigge et al., 2005). A su vez, *SOC1* y *AGL24* se activan mutuamente (Fig. 1-8) (Liu et al., 2008; Michaels et al., 2003a; Yu et al., 2002). Por otro lado, cuando se expresan los genes *FUL* o *SOC1* mediante un promotor específico de floema, se ha observado que son capaces de acelerar la floración y este adelanto depende de *FT* (Mathieu et al., 2007; Searle et al., 2006), sugiriendo que pueden mediar en la activación de *FT* (Fig. 1-8). Toda esta serie de regulaciones mutuas, asegura una respuesta robusta de la floración, disparando la expresión de todos los integradores en el momento que uno de ellos aparece.

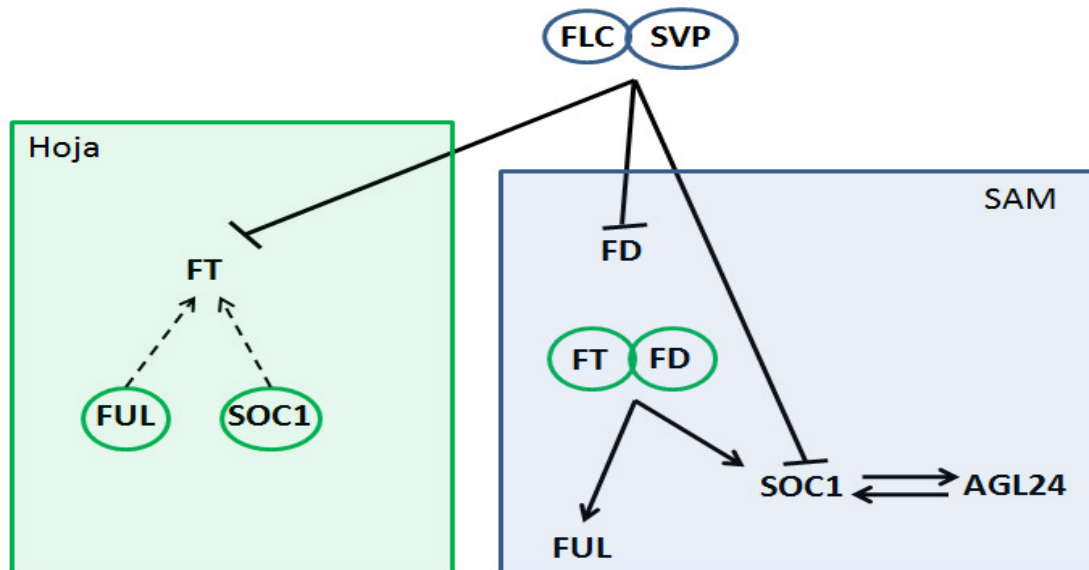


Figura 1-8: Integración de las señales inductoras de la floración. Todas las rutas descritas convergen en la regulación de unos pocos genes, que serán los responsables de iniciar la transición. Entre estos genes podemos encontrar genes represores de la transición floral, como *FLC* y *SVP*, y genes promotores como *FT*, *SOC1*, *AGL24* o *FUL*. Los integradores represores actúan principalmente reprimiendo la expresión de los integradores activadores, por lo que las diferentes rutas que controlan la transición floral actúan bien eliminando el efecto de los integradores represores, bien activando la expresión de los integradores activadores. Además entre los integradores activadores existen mecanismos de activación mutua que aseguran una respuesta robusta de la transición floral.

Inicio del desarrollo floral

Tras la transición, se inicia el desarrollo floral, y la planta, en lugar de generar hojas, inicia la producción de flores. La aparición de las flores se debe a la activación de la expresión de los genes de identidad de meristemo floral en los flancos del SAM, como *LFY* (Blázquez et al., 1997; Kaufmann et al., 2010), y los genes *MADS AP1* y *CAL* (Bowman et al., 1993; Kaufmann et al., 2010; Kempin et al., 1995; Mandel et al., 1992). Clásicamente, *LFY* también ha sido considerado como un gen integrador de la transición floral, ya que su mutación, además de generar pérdida de identidad de los meristemos florales, provoca un retraso en la aparición de las flores, aunque su expresión se detecte principalmente en los primordios florales (Blázquez et al., 1997; Weigel et al., 1992). La aparición de *LFY* activa la expresión de *AP1* y *CAL*, que a su vez mantienen la expresión de *LFY* (Fig. 1-9) (Bowman et al., 1993; Kaufmann et al., 2010; Liljegren et al., 1999; Parcy et al., 1998; Wagner et al., 1999). La actividad conjunta de estas proteínas confiere la identidad de meristemo floral y establece el inicio del desarrollo floral.

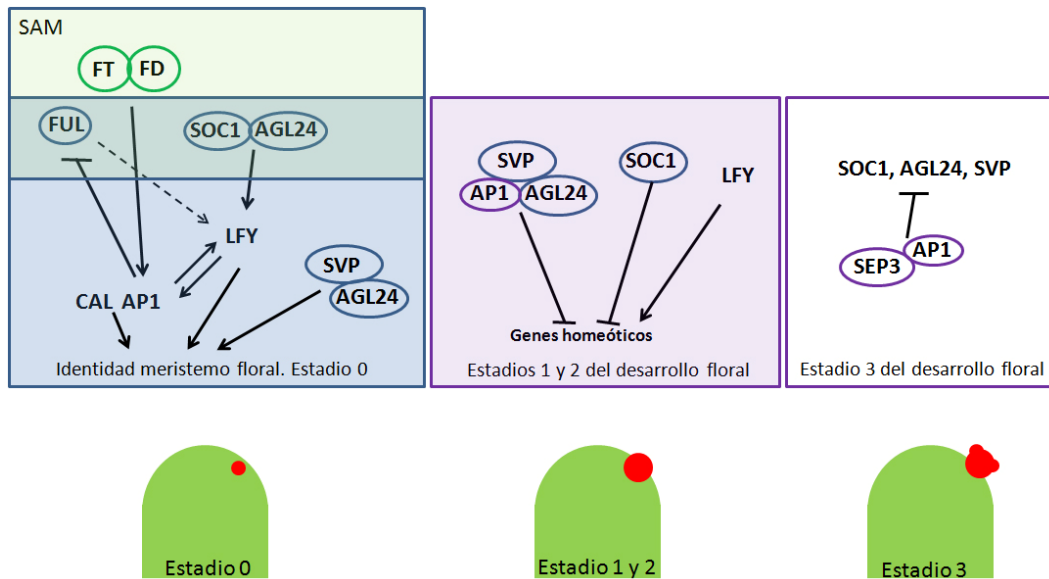


Figura 1-9: Inicio del desarrollo floral. Con la aparición de los integradores de la transición floral se inicia el desarrollo floral. *SOC1* y *AGL24* participan en la activación de *LFY*, un gen de identidad de meristemo floral. *LFY* inicia la activación de *AP1* y *CAL*, otros dos genes de identidad de meristemo floral. El dímero FT-FD, además de participar en la activación de *SOC1* y *FUL*, también participa en la activación de *AP1*. Una vez se inicia la expresión de *AP1* y *LFY* estos genes mantienen su expresión mediante un mecanismo de regulación mutua positiva, estableciendo el inicio primordio floral. En este proceso también participan los genes *AGL24* y *SVP*. Durante esta etapa, la expresión de *FUL* desaparece del primordio floral por la acción de *AP1*. Tras esta etapa, algunos de los integradores florales siguen teniendo una función en el establecimiento de los meristemos florales, ya que *SVP*, *AGL24* y *SOC1* actúan reprimiendo la expresión de algunos genes homeóticos como *SEP3*. Una vez aparece *SEP3*, esta proteína, junto con *AP1*, reprime la expresión de *SVP*, *AGL24* y *SOC1*.

El incremento en la expresión de los integradores precede a la activación de la expresión de los genes de identidad floral (Hempel et al., 1997; Schmid et al., 2003) indicando que median su activación. EL dímero FT-FD, activa la expresión de *AP1* (Fig. 1-9) (Werner et al., 2005b; Wigge et al., 2005). Recientemente se ha descrito que en la activación de *LFY* participa el dímero formado por *AGL24* y *SOC1* (Fig. 1-9) (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008). Las proteínas SPL también actúan activando la expresión de *LFY*, *AP1* y *FUL* (Yamaguchi et al., 2009) en los primordios florales. También se ha descrito que los genes integradores de la transición floral *SVP*, *AGL24* y *SOC1* participan en el establecimiento de los meristemos florales: *SVP*, *AGL24* y *SOC1* confieren identidad de meristemo floral junto a *AP1* en los momentos iniciales del desarrollo floral (Fig. 1-9) (Gregis et al., 2006; Gregis et al., 2008) impidiendo la expresión de genes de identidad de órganos florales. Posteriormente, con la activación de ciertos genes homeóticos que participan en el establecimiento de los órganos florales, como *SEP3*, se reprime la expresión de *AGL24*, *SVP* y *SOC1* (Gregis et al., 2006; Gregis et al., 2008; Gregis et al., 2009; Liu et al., 2009), permitiéndose el desarrollo de la flor (Fig. 1-9).

FUL presenta un alto grado de homología con *AP1* y *CAL* (Mandel y Yanofsky, 1995) y clásicamente ha sido considerado como un gen de identidad de meristemo floral, ya que en un fondo *ap1cal* la ausencia de *FUL* genera pérdida de identidad floral al no poder mantenerse los niveles de expresión de *LFY* (Ferrándiz et al., 2000a) (Fig. 1-9), pero, a diferencia de otros integradores de la transición su expresión esta reprimida por la actividad de *AP1* en los estadios iniciales del desarrollo floral (Mandel y Yanofsky, 1995) (Fig. 1-9).

Antecedentes

En el momento en que se inició esta tesis, apenas se conocía el papel que podía desempeñar *FUL* en el proceso de la transición floral. Aunque se había descrito el patrón de expresión de *FUL* en la inflorescencia (Mandel y Yanofsky, 1995), únicamente existían dos publicaciones que relacionaban a *FUL* con un posible papel en la regulación del tiempo de floración. En 1997, Hempel et al. observaron que *FUL* incrementaba rápidamente su expresión en el meristemo apical del tallo cuando se sometían las plantas a fotoperiodos inductivos de la floración, lo que sugería un posible papel de *FUL* en la respuesta a este tipo de estímulo. El siguiente trabajo apareció en el año 2000, donde Ferrándiz et al. describían brevemente un pequeño retraso de la floración en el mutante *ful* en condiciones de luz continua.

Por este motivo, se decidió realizar una caracterización más completa del papel de *FUL* en el control del tiempo de floración. Durante el desarrollo de esta tesis, diferentes grupos han ido aportando evidencias sobre el papel de *FUL* en la transición floral (Melzer et al., 2008; Schmid et al., 2003; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009), algunas de ellas solapando el trabajo realizado por nuestro grupo (Melzer et al., 2008). A pesar de la creciente información acerca de la función de *FUL* en el proceso de la transición floral, poco se sabe sobre su papel regulador en este proceso y mucho menos sobre el mecanismo de acción que sigue.

Objetivos

A pesar de que cada vez se conocen mejor los mecanismos implicados en la transición floral y la función que desempeñan los genes de la familia MADS en este proceso, conocemos muy poco sobre el papel que *FUL* puede jugar en ella. Trabajos previos sugieren que *FUL* puede comportarse tanto como un integrador de las señales que promueven la transición como confiriendo identidad de meristemo floral. Por ello, el objetivo general de este capítulo de Tesis Doctoral es la caracterización del papel de *FUL* durante la transición floral, así como intentar comprender mejor cual es el mecanismo de acción que sigue *FUL* en este proceso. Con este propósito general, se han marcado los siguientes objetivos concretos:

-Caracterizar el tiempo de floración del mutante *ful-2*, así como de una línea que sobreexpresa el gen *FUL* bajo control del promotor 35S del virus del mosaico del tabaco, en diferentes condiciones de crecimiento.

-Caracterizar la respuesta de diferentes alelos de *FUL* en un fondo con hábito invernal, donde existan niveles altos de *FLC*.

-Generar y caracterizar combinaciones génicas entre diferentes alelos de *FUL* y alelos de los genes *SVP* y *SOC1*, genes clave en la integración de las señales que regulan la transición floral

-Comprobación de posibles interacciones proteicas y de regulación entre *FUL* y algunos de los integradores de la transición floral, mediante ensayos de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) y ChIP.

-Analizar la expresión del gen de identidad floral *LFY* en diferentes alelos de *FUL* utilizando una línea delatora de la expresión de *LFY* en diferentes condiciones de crecimiento, así como ensayar la posible regulación directa de este gen por *FUL* mediante ChIP.

Resultados

Caracterización del tiempo de floración en el mutante *ful-2*.

Para obtener más información acerca del papel que *FUL* desempeña durante la transición floral, se realizó la caracterización fenotípica del mutante *ful-2* en nuestras condiciones de crecimiento. Se testó el desarrollo del mutante en condiciones tanto inductivas (día largo 16h luz-8h oscuridad) como no inductivas (día corto 8h luz-16h oscuridad), así como una caracterización de la respuesta a vernalización, de la que no se tenía ninguna referencia en la bibliografía.

La forma más utilizada para determinar el tiempo de floración en *Arabidopsis* es el conteo de las hojas producidas desde la aparición de las dos primeras hojas reales hasta la aparición de la primera flor, que equivale al número de hojas totales. Este tipo de conteo estaría de acuerdo con el modelo bidireccional, ya que incluye todas las hojas producidas por la planta en una única fase vegetativa anterior a la transición floral.

Con este propósito, se cultivaron plantas silvestres del ecotipo Columbia y plantas mutantes *ful-2* en condiciones de día largo y en condiciones de día corto. Las plantas silvestres produjeron menos hojas que el mutante *ful-2* en ambas condiciones. En día largo, las plantas silvestres produjeron 13,3 hojas totales de media frente a las 15,1 del mutante *ful-2* (Tabla 1-1, Fig. 1-10 A). En día corto, las plantas silvestres florecieron tras la producción de 64,4 hojas totales de media frente a las 83,6 producidas por *ful-2* (Tabla 1-1, Fig. 1-10 C). Estos datos mostraron que el mutante *ful-2* tiene retrasada la floración en ambas condiciones, aunque el efecto era mucho más evidente en condiciones de día corto.

TABLA 1-1: Tiempo de floración expresado en número de hojas totales producidas por plantas silvestres, *ful-2* y 35S::FUL.

	Hojas totales	
	Día largo	Día corto
Columbia	13,3±1,0	64,4±3,7
<i>ful-2</i>	15,1±1,0 ^a	83,6±6,0 ^a
35S::FUL	5,4±0,5 ^{ab}	11,9±1,8 ^{ab}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a y ^b representan diferencias significativas con un $p < 0.05$ respecto a Columbia (^a) y *ful-2* (^b). Prueba t-student.

Al realizar este experimento observamos también un cambio morfológico en la arquitectura de la inflorescencia del mutante *ful-2* crecido en día corto. El mutante *ful-2* desarrolló un mayor número de inflorescencias secundarias ya que desarrollaba más hojas caulinares que el silvestre. Por este motivo decidimos contar por separado el número de hojas totales en hojas de roseta -las producidas antes del inicio del desarrollo de la inflorescencia- y hojas caulinares -las que aparecen en la inflorescencia y sustentan las coflorescencias-, para tratar de cuantificar este efecto en nuestros conteos. Este tipo de conteo estaría de acuerdo con el modelo acropétalo de transición floral, ya que permite cuantificar la contribución de la etapa I1.

Al analizar de nuevo los datos, obtuvimos que las plantas silvestres producían 10,2 hojas de roseta y 3,2 caulinares de media en día largo frente a las 10,7 hojas de roseta y 4,4 caulinares

de media del mutante *ful-2* (Tabla 1-2, Fig. 1-10 B). En condiciones de día corto, las plantas silvestres produjeron 55,1 hojas de roseta y 9,3 caulinares de media mientras que las plantas *ful-2* produjeron 59,9 hojas de roseta y 23,7 caulinares de media en día corto (Tabla 1-2, Fig. 1-10 D). Según este tipo de conteo, *ful-2* seguía presentando un retraso en la aparición de las flores. Este retraso dependía, en gran medida, del incremento en el número de hojas caulinares producidas por el mutante *ful-2*, y que, en condiciones de día largo, era el único responsable del retraso en el tiempo de floración.

TABLA 1-2: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *ful-2* y 35S::FUL.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	10,2±1,0	3,2±0,4	55,1±3,4	9,3±0,7
<i>ful-2</i>	10,7±0,8	4,4±0,5 ^a	59,9±3,8 ^a	23,7±3,2 ^a
35S::FUL	4,0±0,0 ^{ab}	1,4±0,5 ^{ab}	8,3±1,8 ^{ab}	3,5±0,8 ^{ab}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a y ^b representan diferencias significativas con un p<0.05 respecto a Columbia (^a) y *ful-2* (^b). Prueba t-student.

Ya que este tipo de conteo nos permitía cuantificar mejor los efectos de la mutación *ful-2*, decidimos realizar todos los conteos de esta tesis del mismo modo, a la vez que utilizar el modelo acropétalo para discutir los resultados relacionados con tiempo de floración. De este modo consideraremos la existencia de tres fases de desarrollo: fase vegetativa (V), que comprende el desarrollo vegetativo y que en nuestros conteos estará representado por el número de hojas de roseta; fase inflorescente 1 (I1), que comprende el desarrollo de la inflorescencia que da lugar a la formación de las coflorescencias y que en nuestros conteos quedara reflejado por el número de hojas caulinares; y fase inflorescente 2 (I2), que comprende el desarrollo de la inflorescencia que da lugar a la producción de las flores.

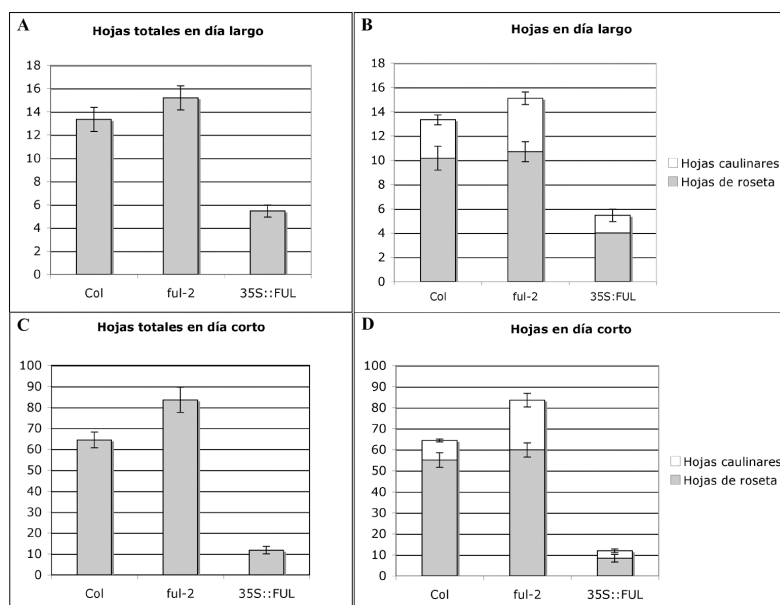


Figura 1-10: Tiempo de floración de plantas silvestres, *ful-2* y 35S::FUL. Número de hojas totales (A, C) y hojas de roseta más caulinares (B, D) producidas por plantas silvestres del ecotipo Columbia, el mutante *ful-2* y la línea de sobreexpresión 35S::FUL en condiciones de día largo (A, B) y día corto (C, D). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de cada media.

En condiciones de día corto, junto al fenotipo de incremento de la fase I1, los mutantes *ful-2* presentaban diferencias en las coflorescencias, que desarrollaban una fase vegetativa previa a su alzado. En la axila de las hojas caulinares, en lugar de desarrollarse directamente el tallo de la coflorescencia (una fase I1), se desarrollaba de nuevo una fase V, generándose una especie

de roseta aérea antes de la elongación de la coflorescencia (Fig.1-11 C). Este fenotipo también se detectó en las plantas silvestres, pero estas fases V de las coflorescencias generaban un número menor de hojas (Fig. 1-11 A). El mutante *ful-2* presentó, además, un nuevo fenotipo en estas condiciones. Las primeras flores producidas por el mutante presentan una hoja en la base de su pedicelo (Fig. 1-11 H), que era idéntica a las hojas caulinares producidas en las coflorescencias, pero de menor tamaño, y que no se observó en las plantas silvestres (Fig. 1-11 F).

Con los datos obtenidos de los conteos realizados en condiciones de día largo y día corto podemos concluir que *FUL* participa en el proceso de la transición floral en *Arabidopsis* como un promotor de la floración, y que este efecto promotor se ejerce principalmente durante la fase I1. Durante la fase V también se detecta un efecto de *FUL*, aunque sólo apreciable en condiciones de fotoperiodo no inductivas.

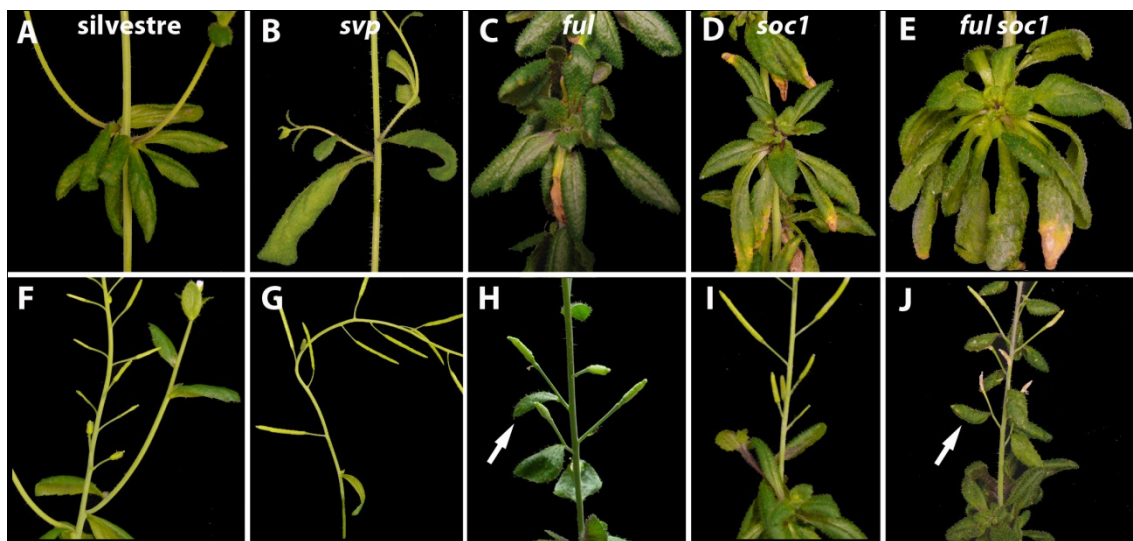


Figura 1-11: Fenotipos de las hojas caulinares y los primeros frutos de plantas crecidas en condiciones de día corto. Hojas caulinares (A-E) y frutos iniciales (F-J) producidos por las plantas silvestres (A y F), el mutante *svp* (B y G), el mutante *ful* (C y H), el mutante *soc1* (D y I) y el doble mutante *ful soc1* (E y J) en condiciones de día corto. Las plantas silvestres, en condiciones de día corto, generan algunas hojas a partir del meristemo axilar de la hoja caulinar antes de que se desarrolle la coflorescencia (A). En el mutante *svp* esto no ocurre (B), mientras que en *ful*, *soc1* y *ful soc1* (C, D y E), se producen un gran número de hojas antes de iniciarse el desarrollo de la coflorescencia, formándose una especie de roseta aérea. Además, tanto en el mutante *ful* como en el doble mutante *ful soc1* (H y J), se observó el desarrollo de una hoja en el pedicelo de todas las flores producidas.

El desarrollo de las hojas caulinares también apareció alterado en los mutantes *ful-2*, tanto en las plantas cultivadas en condiciones de día largo como en día corto. Las plantas silvestres, durante la transición floral, sufren un cambio morfológico y en la distribución de los tricomas presentes en las hojas caulinares respecto a las hojas de roseta. Las hojas de roseta silvestres, al final de la fase vegetativa, tienen forma ovalada y presentan tricomas estrellados tanto en el haz como el envés de las hojas, típicos de esta etapa de desarrollo. Durante la transición floral las hojas caulinares van cambiando de forma, volviéndose más alargadas, y perdiendo todos los tricomas presentes en el haz y casi todos los del envés (Fig. 1-12) (Poethig, 2003). En el mutante *ful-2* este cambio no ocurre. Las hojas caulinares presentan formas redondeadas, y siempre desarrollan tricomas estrellados en ambas caras de las hojas, lo que se puede interpretar como un mantenimiento de caracteres vegetativos durante el desarrollo de fase I1 (Fig. 1-12).

Tras el estudio de la respuesta del mutante *ful-2* a diferentes condiciones de fotoperiodo podemos decir que FUL participa en el proceso de transición floral tanto en presencia como en ausencia de señales inductivas, como un promotor de la floración y que su papel es más evidente en el control de la fase I1 del desarrollo de la inflorescencia, mediando la transición entre la fase I1 y la I2.

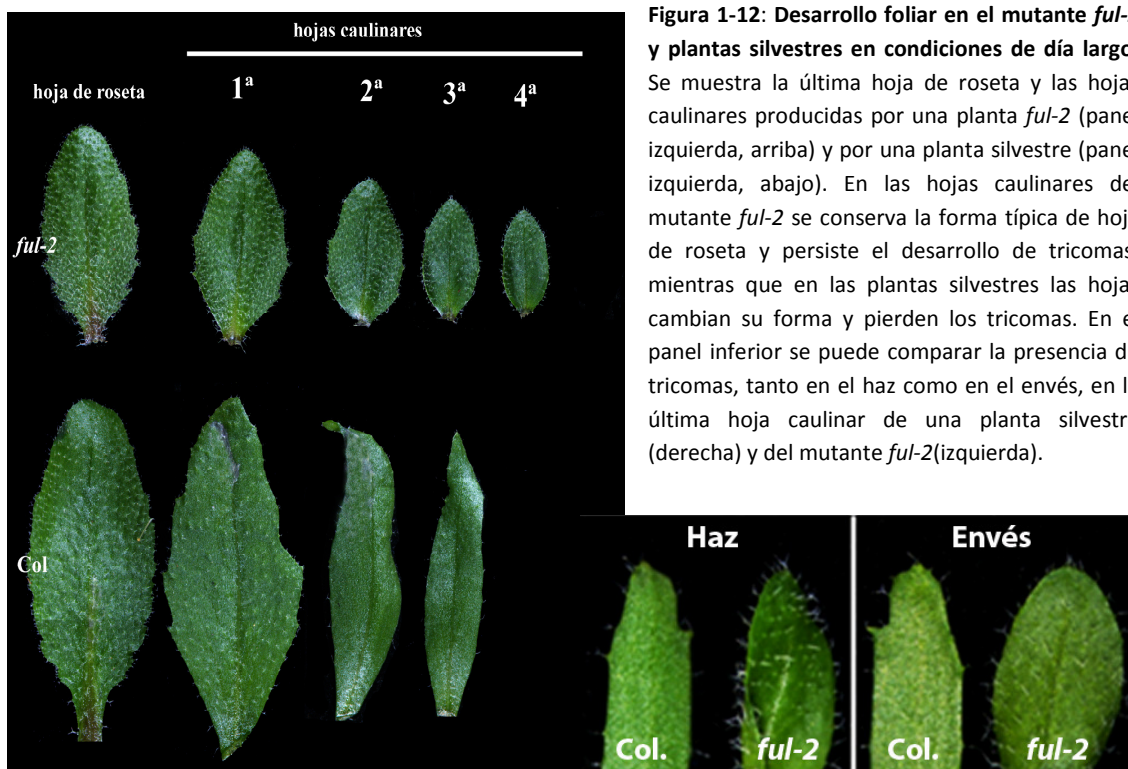


Figura 1-12: Desarrollo foliar en el mutante *ful-2* y plantas silvestres en condiciones de día largo.

Se muestra la última hoja de roseta y las hojas caulinares producidas por una planta *ful-2* (panel izquierda, arriba) y por una planta silvestre (panel izquierda, abajo). En las hojas caulinares del mutante *ful-2* se conserva la forma típica de hoja de roseta y persiste el desarrollo de tricomas, mientras que en las plantas silvestres las hojas cambian su forma y pierden los tricomas. En el panel inferior se puede comparar la presencia de tricomas, tanto en el haz como en el envés, en la última hoja caulinar de una planta silvestre (derecha) y del mutante *ful-2* (izquierda).

Efecto de la sobreexpresión de *FUL* en el tiempo de floración

Si *FUL* es un inductor de la transición floral, las plantas que sobreexpresen el gen deberían florecer mucho más temprano que las plantas silvestres. De hecho, en la bibliografía se encuentran referencias a este fenotipo en *Arabidopsis* (Ferrándiz et al., 2000a), aunque no se presentó una caracterización detallada. Cuando se sobreexpresa el homólogo de *FUL* de *Nicotiana tabacum* (*NtFUL*) en diferentes especies de *Nicotiana*, se produce un fuerte adelanto de la floración, independientemente de las condiciones inductivas requeridas por cada especie (Smykal et al., 2007). Estos datos sugieren una función conservada para *FUL* en el control del tiempo de floración en diferentes especies.

Para analizar cuál era el efecto de la sobreexpresión de *FUL* en el tiempo de floración, se sembraron plantas 35S::*FUL* en condiciones de día largo y día corto. Las plantas 35S::*FUL* mostraron floración temprana en ambas condiciones. En día largo produjeron 4,0 hojas de roseta y 1,4 caulinares de media (Tabla 1-1, Fig. 1-10 A y B), y en día corto 8,3 hojas de roseta y 3,5 caulinares de media (Tabla 1-2, Fig. 1-10 C y D), mientras que las plantas silvestres producían 10,2 hojas de roseta y 3,2 caulinares de media en día largo (Tabla 1-1) y 55,1 hojas de roseta y 9,3 caulinares de media en día corto (Tabla 1-2). También se observó que las condiciones de crecimiento afectaban al desarrollo de las plantas 35S::*FUL*. Mientras que en condiciones de día largo en las plantas 35S::*FUL* la fase I2 terminaba temprano con la

formación de una flor terminal (Fig. 1-13), en condiciones de día corto se suprime este fenotipo, observándose un desarrollo de la fase I2 similar a la del silvestre (Fig. 1-13).

Según estos resultados, la sobreexpresión de *FUL* acortaría tanto la fase V como la I1 de la planta, por lo que *FUL* podría actuar como un activador de la transición floral, capaz de promover el desarrollo reproductivo incluso en condiciones no inductivas, acortando la duración de las diferentes fases de desarrollo

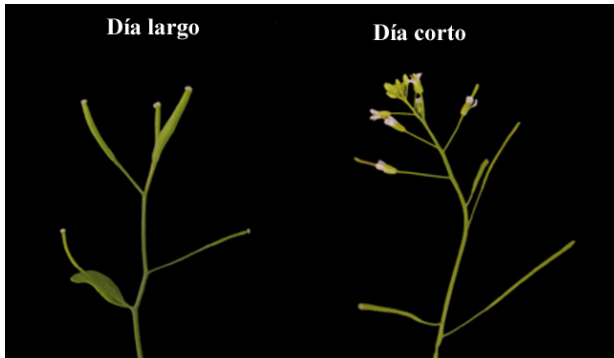


Figura 1-13: Inflorescencias generadas por plantas de la línea 35S::FUL. En condiciones de día largo 35S::FUL, se determina desarrollando una flor terminal tras generar unas pocas flores (derecha), mientras que en condiciones de día corto el SAM se mantiene indeterminado, desarrollando una inflorescencia similar a la generada por plantas silvestres.

Interacciones génicas

Los resultados que se habían obtenido señalaban a *FUL* como un posible regulador de la transición floral y del cambio de fase, por lo que nos preguntamos cómo podía participar *FUL* en estos procesos y cuál era su relación con otros integradores y reguladores de la transición floral. Se sabía, mediante ensayos de doble híbrido en levadura, que *FUL* era capaz de interactuar proteína a proteína con otros factores de transcripción de la familia MADS en *Arabidopsis* (de Folter et al., 2005), al igual que sus homólogos en otras especies, como arroz (Fornara et al., 2004) y petunia (Immink et al., 2003). De entre estos interactores, nos interesaron particularmente *SOC1* y *SVP*. Ambos genes se han descrito como reguladores de la transición floral. *SOC1* es un integrador positivo de la transición floral que participa en todos los procesos inductivos descritos (Borner et al., 2000; Lee et al., 2000; Moon et al., 2003; Samach et al., 2000). *SOC1* actúa mediando la activación de otros genes, que al igual que él, actúan como integradores de la transición, como es el caso de *AGL24* (Liu et al., 2008). Además, *SOC1* participa en la activación del gen de identidad floral *LFY* (Lee et al., 2008).

SVP, por su parte, es un represor de la transición floral (Hartmann et al., 2000b), ya que su mutación adelanta el tiempo de floración en cualquier situación testada (Hartmann et al., 2000b; Lee et al., 2007). *SVP* ejerce su función reguladora mediante la represión directa de genes que promueven la transición, como *FT* (Lee et al., 2007) o *SOC1* (Li et al., 2008). Además se ha mostrado que *SVP* forma complejos con otros factores de transcripción de la familia MADS pertenecientes al clado de *FLC* y que actúan también como represores de la transición floral (Michaels y Amasino, 1999; Scortecci et al., 2001); (Helliwell et al., 2006; Li et al., 2008; Scortecci et al., 2003).

Tanto *SOC1* y *SVP*, como *FUL* son necesarios para el correcto establecimiento de la identidad de los meristemas florales en *Arabidopsis*. *SOC1* y probablemente *FUL*, son activadores de la expresión de *LFY*. Por su parte, la interacción de *SVP* con *AP1* es clave durante los estadios iniciales del desarrollo floral, limitando la expresión de los genes homeóticos que dirigen el desarrollo de los órganos florales y permitiendo el correcto establecimiento del meristemo

floral (Ferrándiz et al., 2000a; Gregis et al., 2006; Gregis et al., 2008; Gregis et al., 2009; Liu et al., 2009).

Para intentar esclarecer la relación existente entre estos genes se realizaron combinaciones genéticas del mutante *ful-2* y de la línea 35S::FUL con los mutantes *soc1-2* y *svp-32*, así como con líneas que los sobreexpresaban.

Interacciones entre *FUL* y *SOC1*.

Para estudiar la relación existente entre los genes *FUL* y *SOC1* se generaron las siguientes combinaciones: *ful-2soc1-2*, 35S::FUL *soc1-2*, 35S::SOC1 *ful-1* y 35S::FUL 35S::SOC1. Una vez obtenidos los dobles mutantes se procedió a su caracterización fenotípica.

soc1-2

SOC1 ha sido descrito previamente como un integrador de las diferentes rutas inductivas de la transición floral ya que su pérdida de función es capaz de retrasar la floración tanto en condiciones de día largo como en condiciones de día corto, y estar regulado por todas las rutas descritas que inducen la floración (Borner et al., 2000; Lee et al., 2000; Lee y Lee, 2010; Moon et al., 2003; Samach et al., 2000). En nuestras condiciones de día largo y día corto, el fenotipo observado fue similar al previamente descrito (Moon et al. 2003). En día largo, el mutante *soc1-2* floreció más tarde que el alelo silvestre y que *ful-2*, produciendo 19,3 hojas de roseta y 4,2 caulinares de media (Tabla 1-3, Fig. 1-14 A, C). Del mismo modo, cuando las plantas crecieron en condiciones de día corto, ocurrió algo similar. Aquí, el mutante *soc1-2* produjo 75,0 hojas de roseta de media, unas 20 hojas más que el parental silvestre y unas 15 más que el mutante *ful-2* (Tabla 1-3, Fig. 1-14 B, D). Respecto al número de hojas caulinares, en estas condiciones, *soc1-2* produjo 15,2 hojas de media, unas 6 hojas más que la planta silvestre pero casi 9 hojas menos que el mutante *ful-2* (Tabla 1-3, Fig. 1-14 B).

TABLA 1-3: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *ful-2* y *soc1-2*.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	10,2±1,0	3,2±0,4	55,1±3,4	9,3±0,7
<i>ful-2</i>	10,7±0,8	4,4±0,5 ^a	59,9±3,8 ^a	23,7±3,2 ^a
<i>soc1-2</i>	19,3±0,9 ^{ab}	4,2±0,5 ^a	75,0±4,2 ^{ab}	15,2±0,5 ^{ab}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a y ^b representan diferencias significativas con un $p < 0.05$ respecto a Columbia (^a) y *ful-2* (^b). Prueba t-student.

Otro fenotipo encontrado en el mutante *soc1-2* en estas condiciones, al igual que en el mutante *ful-2*, fue el desarrollo de rosetas aéreas a partir de los meristemos axilares de las hojas caulinares (Fig. 1-11 D), produciéndose también un retraso en el alzado y elongación de las coflorescencias. A diferencia del mutante *ful-2*, las flores del mutante *soc1-2* no desarrollaban hojas en su base (Fig. 1-11 I).

Los datos obtenidos mostraron que el mutante *soc1-2* presentaba un retraso de la floración más fuerte que el mutante *ful-2* durante la fase V (número de hojas de roseta). Respecto a la fase I1 (número de hojas caulinares) no se observaron diferencias entre ambos mutantes en

condiciones de día largo, pero en condiciones de día corto el mutante *ful-2* presentaba una fase I1 mucho más larga que el mutante *soc1-2*.

A partir de estos resultados podemos hipotetizar que ambas proteínas trabajan promoviendo la transición floral, pero que, aunque afectan a las dos transiciones descritas, cada una podría tener un papel más relevante en una fase concreta: SOC1 en la transición de la fase V a la fase I1, y FUL en la transición de la fase I1 a la fase I2.

ful-2 soc1-2

El doble mutante *ful-2 soc1-2* presentó fenotipos sinérgicos respecto a los de los dos mutantes por separado. En condiciones de día largo el doble mutante inició la transición tras la producción de 24,5 hojas de roseta de media (Tabla 1-4, Fig. 1-14 A), frente a las 10,7 de *ful-2*, las 19,4 de *soc1-2*, y las 10,2 del silvestre, por lo que mostró un claro retraso respecto a los mutantes sencillos en la fase V. Durante el desarrollo de la inflorescencia produjo 9,6 hojas caulinares de media (Tabla 1-4, Fig. 1-14 A), frente a las 4,4 de *ful-2* y las 4,2 de *soc1-2*, por lo que también mostraba un incremento notable en la duración de la fase I1. En condiciones de día corto también se observó un incremento en el número de hojas producidas. En estas condiciones el doble mutante *ful-2soc1-2* produjo las mismas hojas de roseta que producía el mutante *soc1-2*, 75,1 hojas de media, pero un número mayor de hojas caulinares que cualquiera de los dos mutantes simples, 28,1 hojas de media (Tabla 1-4, Fig. 1-14 B), frente a las 23,7 de *ful-2* y las 15,2 de *soc1-2*. El hecho que tanto el doble mutante *ful-2soc1-2* como el mutante *soc1-2* produjeran el mismo número de hojas de roseta en estas condiciones indicaría que la mutación *soc1-2* es epistática sobre la mutación *ful-2*, y que SOC1 actuaría mediando el efecto de FUL en esta etapa de desarrollo y condiciones de crecimiento.

TABLA 1-4: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *ful-2*, *soc1-2* y *ful-2 soc1-2*.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	10,2±1,0	3,2±0,4	55,1±3,4	9,3±0,7
<i>ful-2</i>	10,7±0,8 ^c	4,4±0,5 ^a	59,9±3,8 ^{ac}	23,7±3,2 ^{ac}
<i>soc1-2</i>	19,4±0,9 ^{ab}	4,2±0,5 ^a	75,0±4,2 ^{ab}	15,2±0,5 ^{ab}
<i>ful-2 soc1-2</i>	24,5±0,8 ^{abc}	9,6±1,9 ^{abc}	75,1±3,5 ^{ab}	28,1±1,7 ^{abc}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a, ^b y ^c representan diferencias significativas con un p<0.05 respecto a Columbia (^a), *ful-2* (^b) y *soc1-2* (^c). Prueba t-student.

En condiciones de día corto, en las axilas de las hojas caulinares de las plantas *ful-2 soc1-2* también se generaron las rosetas aéreas descritas en el silvestre y en los mutantes sencillos (Fig. 1-11 A, C, y D) pero en el doble mutante estas rosetas presentaron más hojas y permanecieron en estado vegetativo durante más tiempo (Fig. 1-11 E). Cuando estas rosetas aéreas generaron coflorescencias, se repitió de nuevo el proceso, dando lugar a nuevas rosetas aéreas en estas coflorescencias.

Además, estas plantas presentaron fenotipos adicionales relacionados con la identidad del meristemo inflorescente. Tras la producción de un número variable de flores, el meristemo inflorescente volvió a producir de nuevo hojas sin elongación de los entrenudos, dando lugar a una especie de roseta vegetativa. Este hecho ocurrió tanto en condiciones de día largo como

de día corto (Fig. 1-15). Además, todas las flores producidas por el doble mutante presentaron un órgano foliar en la base de su pedicelo (Fig. 1-15).

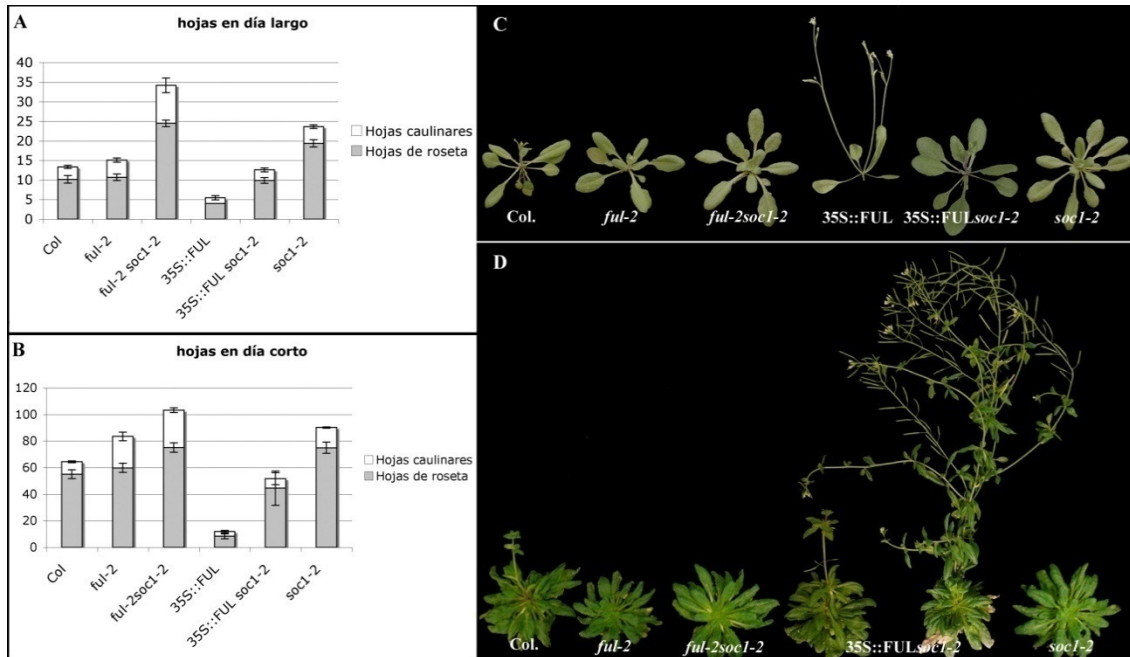


Figura 1-14: Tiempo de floración de las combinaciones de los alelos de FUL con *soc1-2*. Número de hojas de roseta más caulinares (A, B) producidas por plantas silvestres del ecotipo Columbia, el mutante *ful-2*, la combinación *ful-2 soc1-2*, 35S::FUL, la combinación 35S::FUL *soc1-2* y el mutante *soc1-2* en condiciones de día largo (A) y día corto (B). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de cada media. También se muestra el fenotipo de las plantas crecidas durante 3 semanas en condiciones de día largo (C, de izquierda a derecha: silvestre, *ful-2*, *ful-2 soc1-2*, 35S::FUL, 35S::FUL *soc1-2* y *soc1-2*) y crecidas durante 9 semanas en condiciones de día corto (D, de izquierda a derecha: silvestre, *ful-2*, *ful-2 soc1-2*, 35S::FUL *soc1-2* cosuprimida, 35S::FUL *soc1-2* no cosuprimida y *soc1-2*), donde se puede apreciar la gran variabilidad entre las plantas 35S::FUL *soc1-2*.

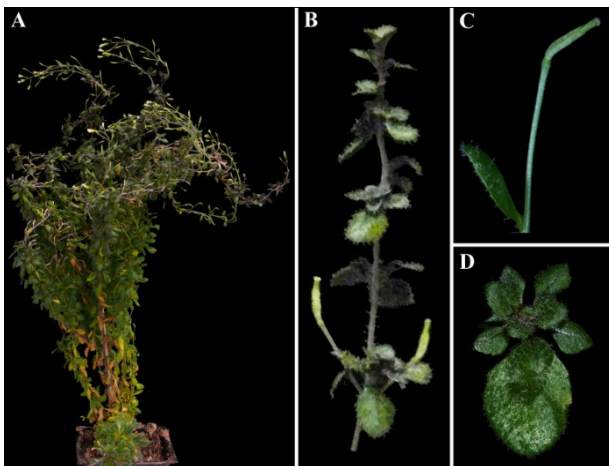


Figura 1-15: Fenotipos presentes en las plantas *ful soc1*. Aspecto de una planta *ful soc1* tras tres meses de crecimiento en condiciones de día largo (A). Estas plantas presentan reversiones del SAM de la inflorescencia I2 a un SAM V (B). Casi todas las flores desarrolladas por estas plantas desarrollan hojas en la base de los pedicelos florales (C). Por último, a partir de las hojas caulinares de la inflorescencia se desarrollan, en lugar de coflorescencias, nuevas rosetas vegetativas (D).

Estos datos nos sugieren que ambas proteínas participan en la promoción de la transición floral. Ambas proteínas pueden actuar en el proceso por separado, como se desprende de los datos obtenidos con los mutantes sencillos, pero la sinergia y los nuevos fenotipos observados en el doble mutante, como la epistasia de *soc1-2* sobre el doble *ful-2 soc1-2* observada en la producción de hojas de roseta en condiciones de día corto, apuntan a una compleja interacción entre ambos genes, que podrían comprender desde un posible efecto conjunto de ambas proteínas, hasta su regulación cruzada y efectos redundantes con otros factores.

Durante el desarrollo de esta Tesis se publicó un trabajo donde se describía el fenotipo del doble mutante *ful soc1* (Melzer et al., 2008), que coincidía plenamente con los resultados obtenidos por nosotros.

35S::FUL 35S::SOC1

Tanto cuando se sobreexpresa *FUL* como cuando se sobreexpresa *SOC1* se produce un fuerte adelanto de la floración, de acuerdo con el papel de estas proteínas como inductores de la transición floral (Ferrándiz et al. 2000, Lee et al. 2000). Como ya hemos descrito, la sobreexpresión de *FUL* produce un fuerte adelanto de la floración. Las inflorescencias de estas plantas generan una coflorescencia y algunas flores antes de generar una flor terminal. Por su parte el fenotipo de las plantas 35S::SOC1 es muy parecido, salvo que producen alguna coflorescencia más y bastantes flores antes de que su meristemo apical genere una flor terminal.

La caracterización del doble mutante *ful-2 soc1-2* apuntaba a que ambas proteínas participaban en la promoción de la transición floral, pero no nos permitía diferenciar si ambas proteínas trabajaban de forma conjunta o independiente en el proceso, al igual que si existía algún tipo de regulación entre ellas. Por este motivo decidimos realizar el cruce entre ambas líneas de sobreexpresión. Si el fenotipo resultante fuera idéntico al de uno de los parentales, nos diría que los efectos observados dependerían de la regulación que uno estuviera ejerciendo sobre el otro. Por otro lado, si en el doble sobreexpresante observáramos un adelanto más fuerte del tiempo de floración, podríamos interpretarlo de dos formas diferentes: podríamos pensar que las dos proteínas actuarían en el proceso de forma independiente a través de rutas paralelas, o podríamos pensar que ambas proteínas trabajan conjuntamente en la misma ruta.

Cuando sembramos el doble sobreexpresante se observó que estas plantas presentaban un fenotipo extremo respecto al tiempo de floración (Fig 1-16). Tras la aparición de dos hojas, estas plantas iniciaron el desarrollo de la inflorescencia, que en ocasiones producía alguna hoja caulinar (Fig. 1-16 B) antes de determinarse en una estructura floral. Estas plantas no desarrollaron ninguna coflorescencia (Fig. 1-16 A, B) ya que todos los meristemos de la parte aérea, incluidos los meristemos axilares de las hojas producidas generaron flores directamente (Fig. 1-16 A, B).

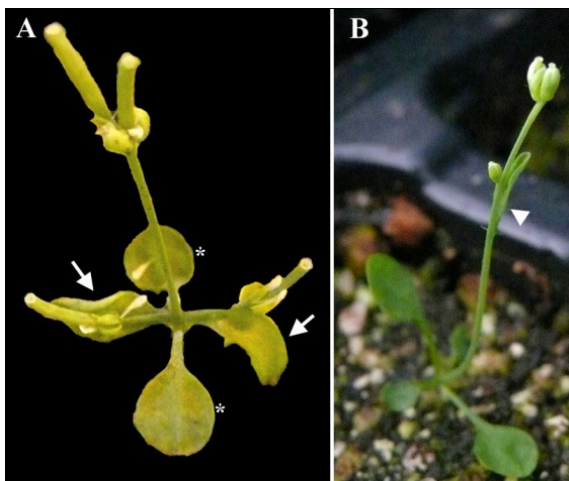


Figura 1-16: Fenotipos del cruce entre 35S::FUL y 35S::SOC1. Los dobles sobreexpresantes obtenidos de este cruce presentaron fenotipos extremos en tiempo de floración (A, B), realizando la transición tras la producción de dos únicas hojas reales (flechas en A, * cotiledones). En alguna ocasión se observó alguna hoja caulinar que desarrolló una flor en lugar de una coflorescencia (punta de flecha en B). Todos los meristemos axilares se determinaron en estructuras florales.

Estos datos apoyan la idea de que ambas proteínas promoverían la transición floral, bien conjuntamente o bien por rutas independientes y convergentes.

35S::FUL *soc1-2* y 35S::SOC1 *ful-1*

Para intentar averiguar si *FUL* y *SOC1* funcionaban de forma conjunta se realizaron los cruces 35S::FUL *soc1-2* y 35S::SOC1 *ful-1*. El motivo de utilizar *ful-1* en el cruce por 35S::SOC1 fue para mantener el mismo fondo genético, Landsberg *erecta*, y no registrar variaciones del tiempo de floración dependientes de la mezcla de ecotipos. Si los fenotipos en el adelanto de la transición de las líneas sobreexpresantes dependieran de la presencia de la otra proteína esperaríamos una atenuación de este fenotipo, y si no existiera ésta dependencia, el fenotipo no debería cambiar.

TABLA 1-5 A: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *soc1-2*, 35S::FUL y 35S::FUL *soc1-2*.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	10,2±1,0	3,2±0,4	55,1±3,4	9,3±0,7
<i>soc1-2</i>	19,4±0,9 ^{a c}	4,2±0,5 ^{a c}	75,0±4,2 ^{a c}	15,2±0,5 ^{a c}
35S::FUL	4,0±0,0 ^{a b}	1,4±0,5 ^{a b}	8,3±1,8 ^{a b}	3,5±0,8 ^{a b}
35S::FUL <i>soc1-2</i>	9,0±1,1 ^{a c}	2,2±0,7 ^{a c}	de 26 a 80	de 5 a 20

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a, ^b y ^c representan diferencias significativas con un $p < 0.05$ respecto a Columbia (^a), *soc1-2* (^b) y 35S::FUL (^c). Prueba t-student.

Cuando estas plantas crecieron en condiciones de día largo se obtuvo el siguiente resultado: 35S::FUL *soc1-2* inició la transición con 9,0 hojas de roseta y generó 2,2 hojas caulinares de media (Tabla 1-5A, Fig. 1-14 A, C), frente a las 4 hojas de roseta y 1,4 caulinares de 35S::FUL y las 19,3 de roseta y 4,2 caulinares de media del mutante *soc1-2*. Además, en estas plantas se suprimió el fenotipo de flor terminal típico de 35S::FUL (Fig. 1-14 C). 35S::SOC1 *ful-1* inició la transición con 4,0 hojas de roseta y generó 2,0 hojas caulinares de media (Tabla 1-5B), un fenotipo muy similar al que presentan las plantas 35S::SOC1, 3,9 hojas de roseta y 1,2 caulinares (Tabla 1-5B), mientras que el mutante *ful-1* produce 9,4 hojas de roseta y 5,2 hojas caulinares (Tabla 1-5B). Cuando se observaron las plantas en condiciones de día corto, se observaron fenotipos similares a los encontrados en día largo, aunque con ciertos problemas para las plantas 35S::FUL *soc1-2*. Las plantas 35S::FUL *soc1-2* realizaron la transición con un número de hojas muy variable, entre 26 y 80 hojas de roseta y entre 5 y 20 hojas caulinares (Fig. 1-14 B), en tres siembras diferentes, por lo que no establecimos un valor medio fiable de estos conteos. Estas plantas, curiosamente, en todos los intentos realizados, acababan cosuprimiendo la expresión de *FUL* (Fig. 1-14 D), ya que produjeron frutos similares a los que produce el mutante *ful-2*. Por su parte, las plantas 35S::SOC1 *ful-1* florecieron con un número de hojas similar al producido por la misma línea en día largo (Tabla 1-5B), por lo que se podrían considerar insensibles a las condiciones inductivas y a la presencia/ausencia de *FUL*.

Estos resultados indican que en el adelanto del tiempo de floración observado en las plantas 35S::SOC1 no dependería de la actividad de *FUL*, mientras que el observado en 35S::FUL si depende, en parte, de la presencia de *SOC1*, sugiriendo que, o bien *FUL* estaría funcionando aguas arriba de *SOC1*, o bien que *FUL* requiere la presencia de *SOC1* para promover la floración, indicando la posible formación de un dímero FUL-SOC1 con una potente actividad promotora de la floración. La formación de un dímero también explicaría el fenotipo

observado en las plantas 35S::FUL 35S::SOC1. Estos resultados también confieren a *FUL* alguna función independiente de *SOC1* en la transición floral, ya que su sobreexpresión es capaz de rescatar gran parte del fenotipo del mutante *soc1-2*, por lo que *FUL* podría regular las mismas dianas que regula *SOC1*.

TABLA 1-5 B: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *ful-1*, 35S::SOC1 y 35S::SOC1 *ful-1*.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Landsberg	6,4±0,5	2,0±0,0	-	-
<i>ful-1</i>	9,4±0,5 ^a c	5,2±0,4 ^a c	-	-
35S::SOC1	3,9±0,5 ^a b	1,2±0,5 ^b	4,0±0,5	1,2±0,5
35S::SOC1 <i>ful-1</i>	4,0±0,0 ^a b	2,0±0,2 ^b	4,3±0,0	2,0±0,2

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a, ^b y ^c representan diferencias significativas con un $p < 0.05$ respecto a Landsberg (^a), *ful-1* (^b) y 35S::SOC1 (^c). Prueba t-student.

FUL y SOC1 interaccionan proteína con proteína y se localizan en el núcleo.

Se ha descrito que *FUL* y *SOC1* son capaces de interaccionar físicamente en ensayos de dos híbridos en levadura (de Folter et al. 2005). Los datos que habíamos obtenido indicaban que ambas proteínas podrían funcionar de forma conjunta a través de la formación de un dímero, por lo que comprobamos si la interacción *FUL-SOC1* ocurría también *in vivo*. Para ello se realizó un ensayo de BiFC. Este experimento consiste en expresar conjuntamente dos proteínas en un mismo tejido. Cada proteína está fusionada a una mitad de la YFP, es decir, una proteína fusionada al extremo N-terminal de la YFP y la otra proteína fusionada al extremo C-terminal. Al expresarse conjuntamente, si ambas proteínas interaccionan físicamente, la YFP es capaz de reconstituirse y emitir luz fluorescente que se puede detectar en un microscopio confocal. Efectivamente, como predecía el trabajo de de Folter et al. del año 2005, *FUL* y *SOC1* interaccionaron entre sí. Además, el dímero resultante se localizaba en núcleo (Fig.1-18).

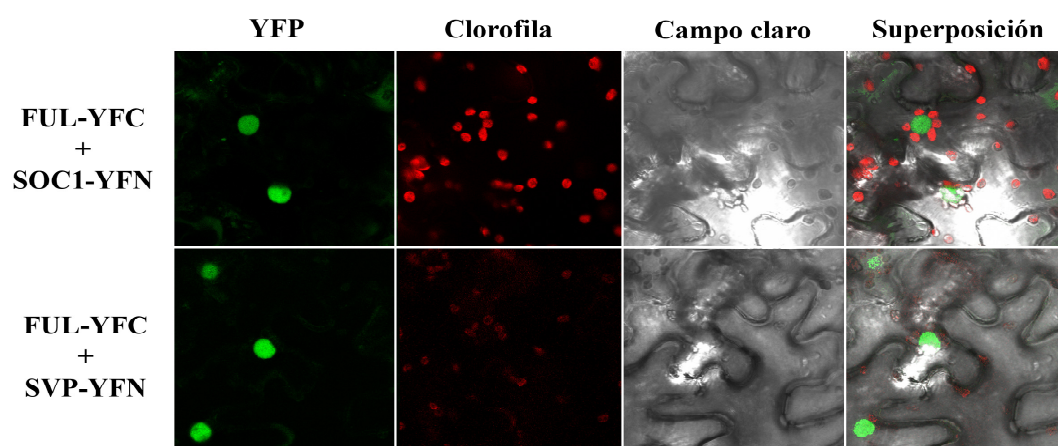


Figura 1-18: Interacción FUL-SOC1 y FUL-SVP. Experimento de complementación bimolecular de la fluorescencia realizado con la proteína *FUL* fusionada al extremo C-terminal de la proteína YFP y las proteínas *SOC1* y *SVP* fusionadas al extremo N-terminal de la proteína YFP. En la primera columna se registra el canal de emisión de la YFP, en la segunda el canal de la clorofila, y en la tercera la imagen en campo claro. En la última columna se muestra la superposición de las tres columnas anteriores, donde se puede apreciar que la señal de la proteína YFP reconstituida se encuentra localizada en el núcleo de las células.

FUL se une directamente al promotor de SOC1

Ya que nuestros datos genéticos sugerían además una posible regulación de *SOC1* por *FUL* decidimos comprobar si *FUL* era capaz de unirse al promotor de *SOC1*. Para verificar esta posibilidad, realizamos un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina. Como no se disponía de ningún anticuerpo contra la proteína *FUL*, decidimos realizar una fusión de la proteína a un epítipo reconocido por algún anticuerpo comercial. Con este propósito se generó la línea 35S::*FUL*:GFP. Se decidió elegir la GFP como epítipo ya que en la bibliografía encontramos un buen número de ejemplos de su uso para la realización de esta técnica y porque se había descrito que la fusión de esta proteína a proteínas tipo MADS no afectaba a su función. Además existía un anticuerpo contra GFP que daba muy buenos resultados en esta técnica (de Folter et al., 2007; Immink et al., 2009; Kaufmann et al., 2009; Urbanus et al., 2009). Las plantas 35S::*FUL*:GFP generadas eran idénticas fenotípicamente a las plantas 35S::*FUL* descritas anteriormente, y que fueron utilizadas como control en el experimento (Fig. 1-19). Para la realización de este experimento se recolectaron plántulas de 12 días.

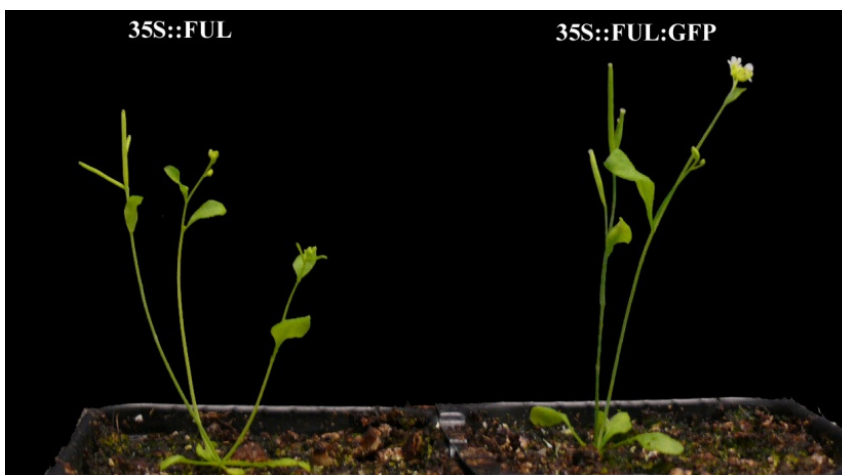


Figura 1-19: Comparación fenotípica de las plantas 35S::*FUL* (izquierda) y 35S::*FUL*:GFP (derecha) utilizadas en el experimento de ChIP. Ambas líneas muestran fenotipos idénticos.

Se ha descrito que los factores de transcripción tipo MADS se unen a unas secuencias denominadas CarG, cuyo consenso es CC(A/T)₆GG. En el promotor de *SOC1* han sido identificadas diferentes cajas CarG, por lo que se decidió cuantificar el enriquecimiento en cada una de ellas en la cromatina inmunoprecipitada. Como control interno se utilizó una zona codificante del gen de la *UBIQUITINA 10*.

Mediante este experimento pudimos determinar que *FUL* se unía a la región promotora de *SOC1*, en una zona situada entre 650-800 bases antes del inicio del gen, obteniendo enriquecimientos del orden de 6 veces respecto a las plantas control y zonas no enriquecidas (Fig.1-20 A).

Como *FUL* era capaz de interactuar físicamente con *SOC1* decidimos comprobar si *FUL* podía estar regulando genes también regulados por *SOC1*, como el gen de identidad floral *LFY* (Lee et al., 2008).

Para determinar si *FUL* era capaz de controlar los niveles de *LFY*, se decidió observar su expresión en el mutante *ful-2* y en la línea 35S::*FUL*. Con este propósito se cruzaron estas líneas con una línea delatora *LFY*::GUS. Cuando se analizaron las plantas generadas se observó que los niveles de *LFY* en el mutante *ful-2* estaban reducidos, mientras que en la línea 35S::*FUL*

ocurría lo contrario, mostrando niveles de expresión más elevados que en la línea control (Fig1-21). Si *FUL*, al igual que *SOC1*, es capaz de regular a *LFY*, y ambas proteínas son capaces de formar un dímero, podríamos pensar que ambas serían capaces de unirse en una misma zona de una diana común. Al realizar el experimento de ChIP correspondiente observamos que *FUL* era capaz de unirse al promotor de *LFY*, con un enriquecimiento del orden de 5 veces respecto al control (Fig.1-20 B), y que lo hacía en una zona donde previamente había sido descrito que se unía *SOC1* (Lee et al. 2008).

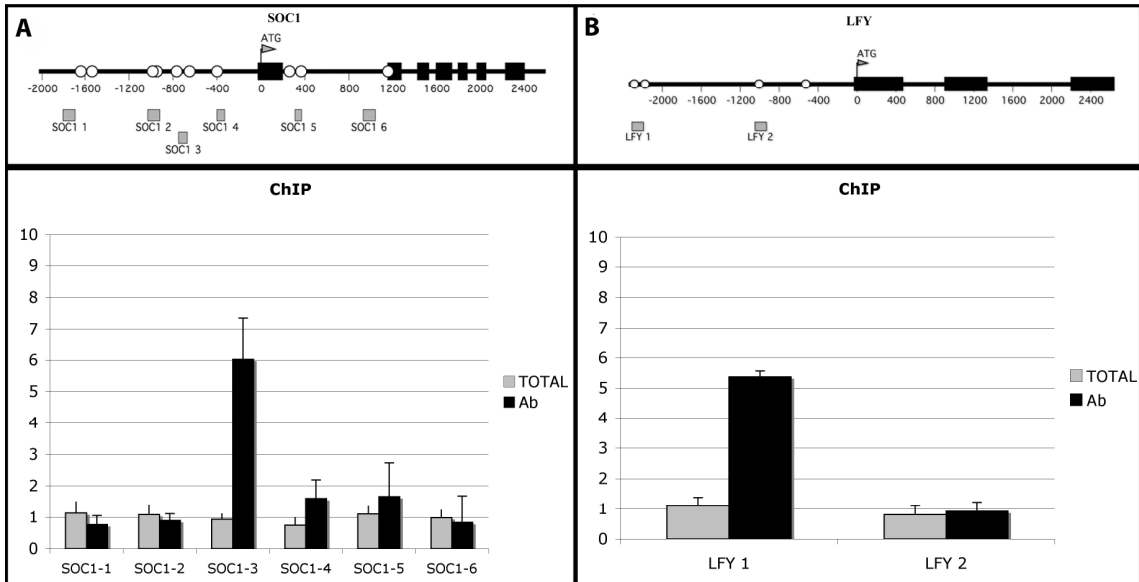


Figura 1-20: Resultados de los experimentos de ChIP sobre los promotores de *SOC1* (A) y *LFY* (B). *FUL* es capaz de unirse a una región del promotor de *SOC1* situada unas 800 pares de bases antes del codón de inicio del gen (A) y a una región situada a unas 2000 pares de bases por debajo del codón de inicio del gen *LFY*. En la parte superior se muestra una representación esquemática de la región genómica de los genes, donde los rectángulos negros representan los exones de los genes, los círculos blancos las posibles CarGs, y los rectángulos grises los fragmentos amplificados en el experimento de ChIP. En la parte inferior se muestran los enriquecimientos obtenidos en cada región.

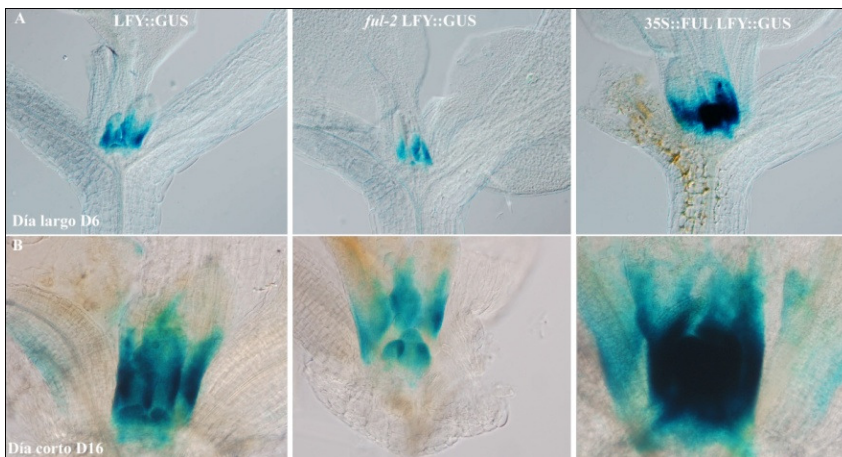


Figura 1-21: Expresión de *LFY* en plantas silvestres (izquierda), el mutante *ful-2* (centro) y la línea 35S::*FUL* (derecha), en plantas de 6 días cultivadas en condiciones de día largo (arriba) y plantas de 16 días cultivadas en día corto (abajo).

Como resumen de este apartado podemos decir que *FUL* se comporta como un activador de la transición floral en *Arabidopsis*, y que actuaría en este proceso, al menos, de tres formas diferentes. Una de ellas sería mediante la regulación directa de *SOC1*, otra sería mediante la formación de complejos con *SOC1* para mediar la correcta activación de otros genes importantes en la transición floral, como *LFY*, y por último también sería capaz de regular la transición floral de forma independiente de *SOC1*, ya que en ausencia de una proteína

funcional de *SOC1*, niveles altos de *FUL* son capaces de rescatar parcialmente el fenotipo de *soc1-2*.

Interacciones entre *FUL* y *SVP*.

De modo paralelo al estudio realizado para determinar la relación entre *FUL* y *SOC1*, para estudiar la relación existente entre los genes *FUL* y *SVP* se procedió a la generación de las siguientes combinaciones genéticas: *ful-2 svp-32*, *35S::FUL svp-32*, *35S::SVP ful-2* y *35S::FUL 35S::SVP*. Una vez obtenidos los dobles mutantes se procedió a su caracterización fenotípica.

svp-32

SVP se ha descrito como un represor de la transición floral (Hartmann et al., 2000, Scortecci et al., 2003, Li et al., 2008). En nuestras condiciones de día largo, *svp-32* floreció tras la producción de 6,2 hojas de roseta y 3,0 caulinares de media (Tabla 1-6, Fig.1-22 A, C), lo que supone un claro adelanto frente al número de hojas de roseta producido en el silvestre, mientras que en el número de hojas caulinares no se apreció ningún efecto. En condiciones de día corto el mutante *svp-32* produjo 16,4 hojas de roseta y 4,6 hojas caulinares (Tabla 1-6, Fig.1-22 B, D), un claro adelanto frente a las plantas silvestres, tanto en el número de hojas de roseta como en el de caulinares. Además, el mutante *svp-32* mostró un desarrollo de las coflorescencias similar al que mostraba en condiciones de día largo, sin producir ninguna hoja extra a partir de la hoja caulinar (Fig. 1-11 B).

TABLA 1-6: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *ful-2*, y *svp-32*.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	10,2±1,0	3,2±0,4 ^b	55,1±3,4 ^b	9,3±0,7 ^b
<i>ful-2</i>	10,7±0,8	4,4±0,5 ^a	59,9±3,8 ^a	23,7±3,2 ^a
<i>svp-32</i>	6,2±0,5 ^{ab}	3,0±0,4 ^b	16,4±2,1 ^{ab}	4,6±1,0 ^{ab}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a y ^b representan diferencias significativas con un $p < 0.05$ respecto a Columbia (^a) y *ful-2* (^b). Prueba t-student.

En nuestras condiciones, el mutante *svp-32* produjo un número menor de hojas de roseta tanto en día corto como en día largo, acortando la fase V, pero mientras que en día largo parecía no tener efecto en el desarrollo de la fase I1, en día corto se observó una clara reducción del número de hojas caulinares respecto a las plantas silvestres.

ful-2 svp-32

Ya que *FUL* y *SVP* parecen tener funciones opuestas, en el doble mutante podríamos esperar una atenuación de los fenotipos de alguno de los mutantes sencillos. Se ha propuesto que *SVP* funciona reprimiendo la expresión de genes inductivos de la transición, como es el caso de *SOC1* (Li et al. 2008), pero se desconoce su relación respecto a *FUL*.

En nuestras condiciones de día largo, el doble mutante *ful-2 svp-32* floreció con 5,8 hojas de roseta de media y 3,0 hojas caulinares (Tabla 1-7, Fig.1-22 A, C), mientras que las plantas silvestres lo hacían con 10,2 hojas de roseta y 3,2 caulinares, los mutantes *ful-2* con 10,7 y 4,4 y los mutantes *svp-32* con 6,2 y 3,0 (Tabla 1-7, Fig.1-22 A, C), por lo que el doble *ful-2 svp-32* fue prácticamente idéntico al mutante *svp-32*. Cuando se analizaron las plantas en condiciones de día corto, el resultado fue similar. El doble mutante desarrolló 16,1 hojas de roseta y 7,1

caulinares de media (Tabla 1-7, Fig.1-22 B, D), frente a las 55,1 y 9.3 del silvestre, las 59,9 y 23,7 del mutante *ful-2* y las 16,4 y 4,6 del mutante *svp-32* (Tabla 1-7, Fig.1-22 A, C). En estas condiciones el doble mutante *ful-2 svp-32* generó prácticamente el mismo número de hojas de roseta que el mutante *svp-32*, y tan sólo se diferenciaron en un ligero incremento del número de hojas caulinares. Así, en ambas condiciones de crecimiento, la mutación *svp-32* es capaz de suprimir prácticamente todo el fenotipo de la mutación *ful-2*, aunque en condiciones de día corto, todavía se aprecie un efecto de la mutación *ful-2* en el desarrollo de la fase I1 del doble mutante.

TABLA 1-7: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *ful-2*, *svp-32* y *ful-2 svp-32*.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	10,2±1,0	3,2±0,4	55,1±3,4	9,3±0,7
<i>ful-2</i>	10,7±0,8 ^c	4,4±0,5 ^{ac}	59,9±3,8 ^{ac}	23,7±3,2 ^{ac}
<i>svp-32</i>	6,2±0,5 ^{ab}	3,0±0,4 ^b	16,4±2,1 ^{ab}	4,6±1,0 ^{ab}
<i>ful-2 svp-32</i>	5,8±0,5 ^{ab}	3,0±0,5 ^b	16,1±2,5 ^{ab}	7,1±1,6 ^{abc}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a, ^b, ^c y ^d representan diferencias significativas con un $p < 0.05$ respecto a Columbia (^a), *ful-2* (^b) y *svp-32* (^c). Prueba t-student.

La epistasia de *svp-32* respecto a *ful-2* indicaría que el retraso del tiempo de floración observado en las plantas *ful-2* sería dependiente de la presencia de un gen *SVP* activo. Este dato nos permitiría hipotetizar que *FUL* podría promover la floración actuando sobre *SVP*, controlando su expresión o antagonizando su efecto, por ejemplo, reprimiendo su expresión o activando genes reprimidos por *SVP* como *SOC1* (Li et al. 2008). El efecto de la pérdida de función de *SVP* se observa tanto en la transición V como en la I1, pero en condiciones de día corto, la ausencia de *FUL* todavía tiene un claro efecto en el número de hojas caulinares. Esto sugiere que el papel de *FUL* en la transición V depende básicamente de la presencia de *SVP*, mientras que en la transición I1, *FUL* tendría un papel dependiente de *SVP* y otro independiente de *SVP*, al menos, en condiciones de día corto.

35S::FUL *svp-32*

Para intentar resolver estas cuestiones se realizó el cruce 35S::FUL *svp-32*. Si *FUL* estuviera compitiendo por las mismas dianas que *SVP*, o reprimiendo la expresión de *SVP*, en las plantas 35S::FUL *svp-32* esperaríamos ver un fenotipo igual o más fuerte que el observado en la línea 35S::FUL. Cuando las plantas 35S::FUL *svp-32* crecieron en condiciones de día largo se observó que estas plantas iniciaban la transición tras la producción de 6,3 hojas de roseta y 2,3 hojas caulinares de media (Tabla 1-8, Fig.1-22 A, C), frente a las 4,0 y 1,4 de 35S::FUL y las 6,2 y 3,0 caulinares de *svp-32*. Además, se suprimió el fenotipo de flor terminal de 35S::FUL. En condiciones de día corto las plantas 35S::FUL *svp-32* iniciaban la floración tras la producción de 15,0 hojas de roseta y 3,3 caulinares de media (Tabla 1-8, Fig.1-22 B, D), frente a las 8,3 y 3,5 de 35S::FUL y las 16,4 y 4,6 de *svp-32*. Los datos obtenidos fueron totalmente contrarios a nuestras suposiciones. El número de hojas producido por el doble 35S::FUL *svp-32* fue prácticamente idéntico al mostrado por el mutante *svp-32*, en ambas condiciones de crecimiento, por lo que se estaba suprimiendo el efecto de la sobreexpresión de *FUL*. De nuevo encontramos epistasia de *svp-32*, esta vez frente a 35S::FUL, indicándonos que el papel promotor de *FUL* en la transición floral estaría mediado por *SVP*. Este resultado implica que

SVP podría ser bifuncional, comportándose como un represor, y a su vez, como un activador, de la transición floral.

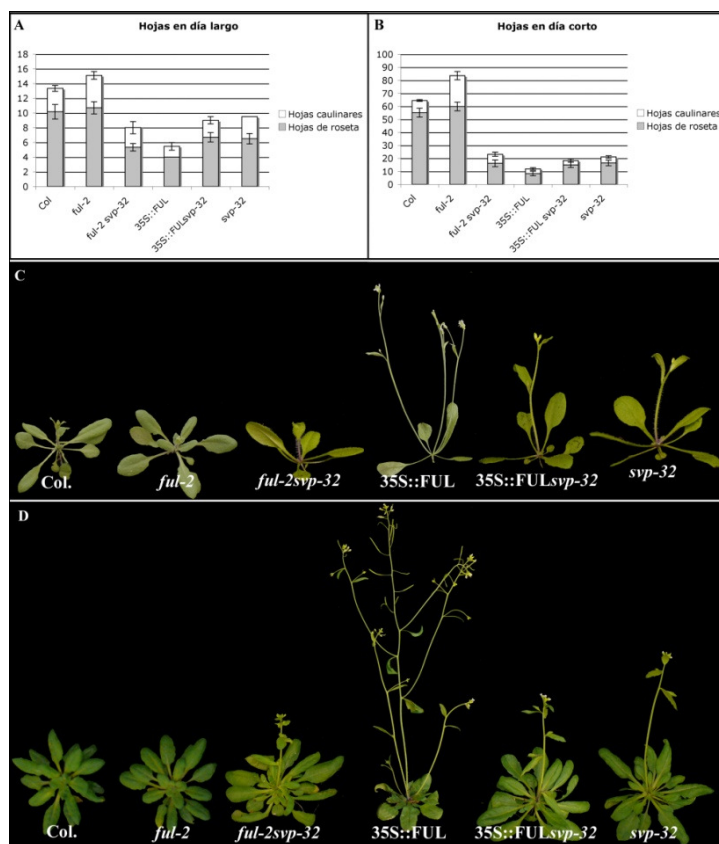


Figura 1-22: Tiempo de floración de las combinaciones de los alelos de *FUL* con *svp-32*. Número de hojas de roseta más caulinares (A, B) producidas por plantas silvestres del ecotipo Columbia, el mutante *ful-2*, las combinación *ful-2 svp-32*, *35S::FUL*, las combinación *35S::FUL svp-32* y el mutante *svp-32* en condiciones de día largo (A) y día corto (B). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de cada media. También se muestra el fenotipo de las plantas crecidas durante 3 semanas en condiciones de día largo (C, de izquierda a derecha: silvestre, *ful-2*, *ful-2 svp-32*, *35S::FUL*, *35S::FUL svp-32* y *svp-32*) y crecidas durante 6 semanas en condiciones de día corto (D, de izquierda a derecha: silvestre, *ful-2*, *ful-2 svp-32*, *35S::FUL*, *35S::FUL svp-32* y *svp-32*).

TABLA 1-8: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres, *ful-2*, *svp-32*, *35S::FUL* y *35S::FUL svp-32*.

	Día largo		Día corto	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	10,2±1,0	3,2±0,4	55,1±3,4	9,3±0,7
<i>ful-2</i>	10,7±0,8 ^{cd}	4,4±0,5 ^{acd}	59,9±3,8 ^{acd}	23,7±3,2 ^{acd}
<i>svp-32</i>	6,2±0,5 ^{acd}	3,0±0,4 ^{bd}	16,4±2,1 ^{abd}	4,6±1,0 ^{abd}
<i>35S::FUL</i>	4,0±0,0 ^{abc}	1,4±0,5 ^{abc}	8,3±1,8 ^{abc}	3,5±0,8 ^{abc}
<i>35S::FUL svp-32</i>	6,3±0,5 ^{abd}	2,3±0,5 ^{abcd}	15,0±2,1 ^{abd}	3,3±1,2 ^{abc}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a, ^b, ^c y ^d representan diferencias significativas con un p<0.05 respecto a Columbia (^a), *ful-2* (^b), *svp-32* (^c) y *35S::FUL* (^d). Prueba t-student

35S::FUL 35S::SVP

Nuestros datos indicaban que, en contra de lo que se conocía sobre su papel represor de la floración, *SVP* podría estar participando en la misma ruta que *FUL*, favoreciendo la transición floral. De acuerdo con el papel represor en la transición descrito en la bibliografía, la sobreexpresión de *SVP* provoca un claro retraso de la floración entre otros fenotipos (Masiero et al., 2004) mediado en parte por la represión directa de *SOC1* (Li et al., 2008). Para obtener más información sobre la relación existente entre *FUL* y *SVP* se generó la combinación *35S::FUL 35S::SVP*. Cuando se caracterizó esta nueva combinación, se observó que las plantas *35S::FUL 35S::SVP* florecieron con un número de hojas similar al producido por *35S::FUL*. Las plantas *35S::FUL 35S::SVP* florecieron con 5,8 hojas de roseta y 2,7 hojas caulinares de media, frente a las 4,0 y 1,4 de *35S::FUL* y las 27,5 y 7,3 de *35S::SVP* (Tabla 1-9, Fig.1-23 A, B).

Estos datos sugerían que el efecto represor de la sobreexpresión de *SVP* en el tiempo de floración era suprimido por niveles altos de *FUL*, lo que podría explicarse si *FUL* actuase aguas abajo de *SVP*. Sin embargo, la epistasia de *svp-32* sobre *ful-2* y *35S::FUL* sugerían lo contrario, es decir, que *FUL* debería actuar aguas arriba de *SVP*. Ya que el efecto represor de *SVP* desaparece casi por completo en presencia de *FUL*, una posible explicación a esta aparente contradicción podría ser que *FUL* y *SVP* formaran un dímero que presentase una actividad diferente de la de *SVP* en ausencia de *FUL*. *SVP* actuaría reprimiendo la expresión de ciertos genes necesarios para iniciar la transición, pero en presencia de *FUL* se comportaría de forma opuesta, bien desbloqueando la represión o bien pasando a activarlos.

TABLA 1-9: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas 35S::FUL, 35S::SVP y 35S::FUL 35S::SVP.

	Día largo	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares
35S::FUL	4,0±0,0	1,4±0,5
35S::SVP	27,5±1,7 ^a	7,3±1,0 ^a
35S::FUL 35S::SVP	5,8±1,2 ^{ab}	2,7±0,8 ^{ab}

Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a y ^b representan diferencias significativas con un $p < 0.05$ respecto a 35S::FUL (^a) y 35S::SVP (^b). Prueba t-student

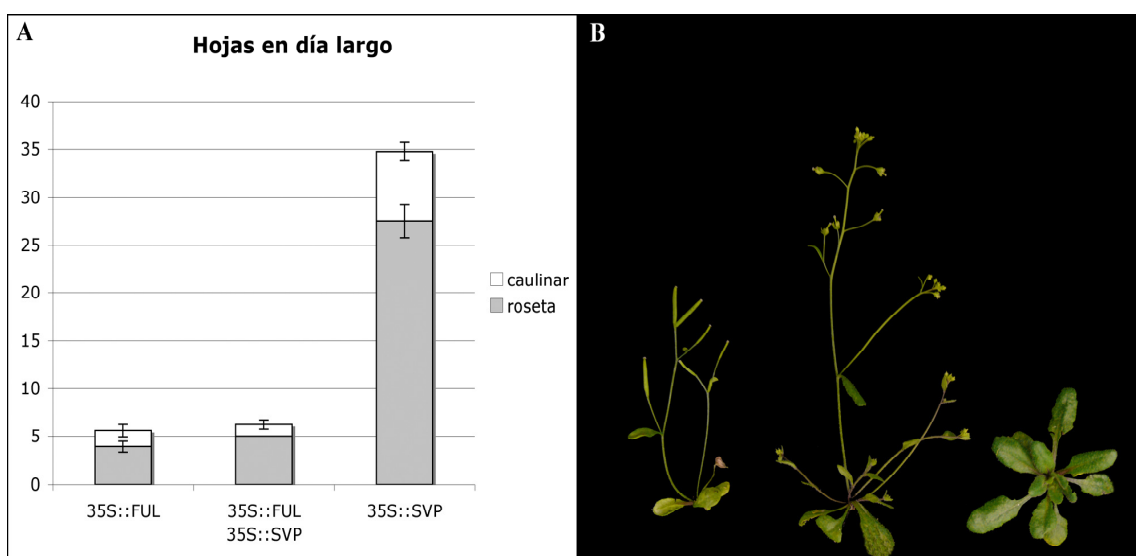


Figura 1-23: Tiempo de floración de la combinación 35S::FUL 35S::SVP. Número de hojas de roseta más caulinares (A) producidas por plantas 35S::FUL, 35S::FUL 35S::SVP y 35S::SVP. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de cada media. También se muestra el fenotipo de las plantas crecidas durante 3 semanas en condiciones de día largo (B, de izquierda a derecha: 35S::FUL, 35S::FUL 35S::SVP y 35S::SVP).

FUL y SVP interaccionan proteína con proteína.

Los datos obtenidos en el anterior apartado se podrían explicar si *FUL* y *SVP* interaccionaran físicamente. Se ha mostrado en la bibliografía que los ortólogos de *FUL* y *SVP* en arroz y petunia interaccionan en ensayos de doble híbrido (Fornara et al. 2004, Immink et al. 2003), aunque en *Arabidopsis* no se ha detectado esta interacción con dicho sistema (de Folter et al. 2005). Nuestros resultados sugerían que *FUL* y *SVP* podrían interaccionar entre sí para promover la transición. Para comprobar si la interacción *FUL*-*SVP* podía ocurrir también *in vivo*, decidimos realizar un ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia con *FUL* y *SVP*, del mismo modo que se hizo para la interacción entre *FUL* y *SOC1*. El resultado obtenido fue que *FUL* y *SVP* interaccionaban entre sí y se localizaban en el núcleo (Fig. 1-18).

FUL se une directamente al promotor de SVP

Nuestros datos también eran compatibles con una posible función de *FUL* aguas arriba de *SVP*, por lo que se decidió testar esa posibilidad. Para ello realizamos un experimento de ChIP, del mismo modo que se realizó para *SOC1*. En el promotor de *SVP* se habían identificado (Li et al., 2008) diferentes CarGs, por lo que se decidió testar si *FUL* era capaz de unirse a ellas. Mediante Q-PCR se determinó el grado de enriquecimiento en las secuencias reguladoras del gen *SVP* respecto a nuestro control en el gen de la *UBQ10*. Este experimento desveló que *FUL* se unía al promotor de *SVP* en una región próxima al codón de inicio del gen, a unas 200 bases aguas arriba. El grado de enriquecimiento fue de unas 7 veces respecto a las plantas control (Fig.1-24 A).

Resumiendo este apartado, podríamos decir que *FUL* y *SVP* actuarían conjuntamente promoviendo la transición de la floración y que este efecto podría estar mediado por su dimerización. A su vez, ya que *FUL* es capaz de unirse al promotor de *SVP*, *FUL* también podría actuar regulando la expresión de *SVP* durante el desarrollo de la inflorescencia, contribuyendo a su exclusión en el SAM, donde *SVP* deja de expresarse tras la transición.

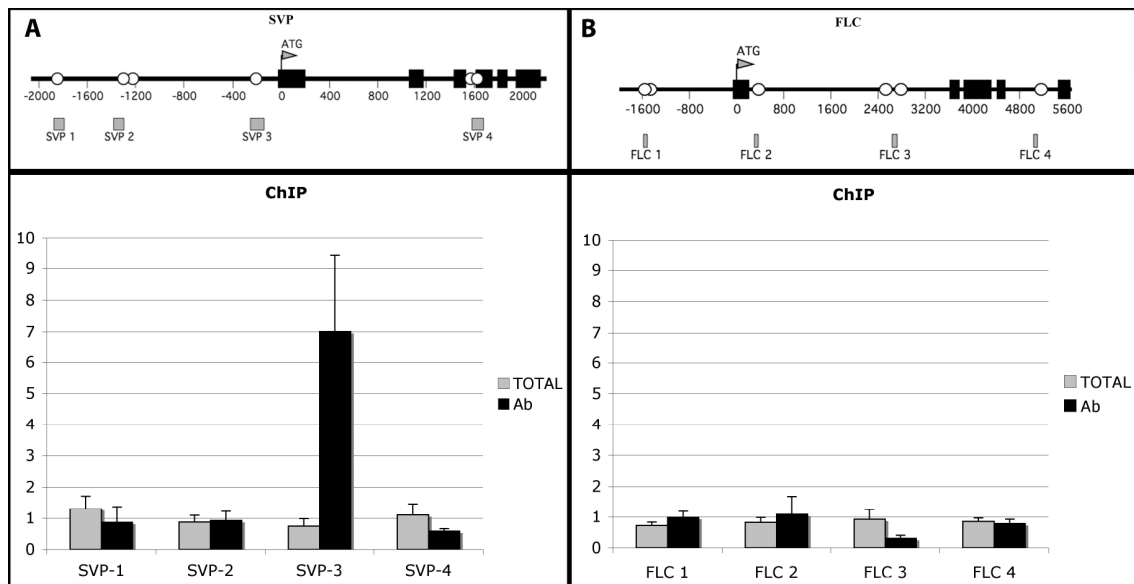


Figura 1-24: Resultados de los experimentos de ChIP sobre los promotores de *SVP* (A) y *FLC* (B). *FUL* es capaz de unirse a una región del promotor de *SVP* situada unas 250 pares de bases antes del codón de inicio del gen (A), mientras que parece no unirse a ninguna de las regiones testadas en el promotor de *FLC*. En la parte superior se muestra una representación esquemática de la región genómica de los genes, donde los rectángulos negros representan los exones de los genes, los círculos blancos las posibles CarGs, y los rectángulos grises los fragmentos amplificados en el experimento de ChIP. En la parte inferior se muestran los enriquecimientos obtenidos en cada región.

El papel de *FUL* en el proceso de vernalización.

Junto a estos experimentos, realizamos en paralelo un tratamiento de vernalización. La vernalización es un proceso mediante el cual la planta percibe el paso del invierno y le permite florecer cuando las condiciones son favorables. En este proceso son claves las proteínas *FLC* y *FRI*. *FLC* es un represor de la transición floral mientras que *FRI* es un fuerte activador de la expresión de *FLC*. En condiciones normales *FRI* activa la expresión de *FLC*, que a su vez, impide la transición floral incluso en condiciones de fotoperiodo inductivo. Cuando las plantas se exponen a periodos fríos los niveles de expresión de *FLC* se reducen debido a modificaciones

epigenéticas en la secuencia de *FLC* que silencian su expresión. De este modo, la expresión de *FLC* queda reprimida permanentemente. Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, las plantas pueden florecer al no encontrar el efecto represor de *FLC*.

En nuestro experimento se germinaron las plantas en condiciones de día largo y posteriormente se traspasaron a una cabina de vernalización donde estuvieron durante un mes a 4°C en condiciones de fotoperiodo no inductivo. Tras este tiempo, las plantas se trasladaron a condiciones de día corto. El experimento se realizó en condiciones de día corto debido a que el ecotipo Columbia, aunque posee una copia funcional de *FLC*, carece de un alelo funcional de *FRI*. Por este motivo, el efecto de *FLC* no es detectable en condiciones de día largo donde existe un fuerte estímulo de la transición, pero sí que lo es en condiciones de día corto donde este estímulo no existe (Michaels y Amasino, 2001). Las plantas silvestres florecieron con 49,8 hojas de roseta y 8,3 caulinares de media, frente a las 55,1 hojas de roseta y 9,3 caulinares que produjeron las plantas no vernalizadas (Tabla 1-10, Fig. 1-25 A, B, C). Esto suponía una reducción del 9,7% en número de hojas de roseta y del 10,7% en el de caulinares de las plantas silvestres vernalizadas respecto a las no vernalizadas. Por su parte, las plantas *ful-2* vernalizadas florecieron con 58,1 hojas de roseta y 15,2 caulinares de media, mientras que las plantas *ful-2* no vernalizadas lo hicieron con 59,9 hojas de roseta y 23,7 caulinares de media (Tabla 1-10, Fig. 1-25 A, B, F), lo que supone una reducción del 3% en el número de hojas de roseta y del 35,7% en el de caulinares de las plantas *ful-2* vernalizadas respecto a las plantas *ful-2* sin vernalizar. Además, el tratamiento suprimió el fenotipo de “roseta aérea”, tanto en las plantas *ful-2* (Fig. 1-25 G, H) como en las plantas silvestres (Fig. 1-25 D, E), al igual que la aparición de hojas en la base de las flores del mutante *ful-2*, sugiriendo que la vernalización no sólo afecta al tiempo de floración, sino también a otros aspectos del desarrollo de la inflorescencia.

TABLA 1-10: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres y *ful-2* en condiciones de día corto.

	No Vernalizadas		Vernalizadas	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
Columbia	55,1±3,4	9,3±0,7	49,8±3,3 ^a	8,3±0,9 ^a
<i>ful-2</i>	59,9±3,8 ^b	23,7±3,2 ^b	58,1±7,0 ^b	15,2±4,0 ^{ab}

Plantas crecidas en condiciones de día corto. Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a y ^b representan diferencias significativas con un p<0.05 respecto a no vernalizadas (^a) y Col. (^b). Prueba t-student.

Los datos obtenidos del tratamiento de vernalización indicaron dos respuestas diferentes en el mutante *ful-2*. Por un lado, el mutante *ful-2* parecía ser insensible a la vernalización en la fase V, mientras que en la fase I1 fue altamente sensible a este tratamiento. Estos resultados sugerían, de nuevo, un papel regulador de la transición floral de *FUL*, esta vez, en la respuesta mediada por vernalización. La insensibilidad al tratamiento en la fase V sugería que *FUL* pudiera tener un papel en el inicio de la transición floral en estas condiciones, y el adelanto del tiempo de floración observado en la fase V en plantas vernalizadas en condiciones de día corto dependería de la presencia de *FUL*. Por otro lado, la alta sensibilidad al tratamiento en la fase I1 de los mutantes *ful-2*, indicaron que parte del fenotipo que el mutante *ful-2* presentaba durante el desarrollo de la fase I1 en condiciones de día corto estaba relacionado con factores controlados por la vernalización, y que, por consiguiente, *FUL* podría participar de algún modo en la regulación de estos factores. Ya que uno de mayores efectos de la vernalización es la

disminución de los niveles de *FLC*, podríamos pensar que *FUL* pudiera mediar de algún modo en la regulación de *FLC* en estas condiciones.

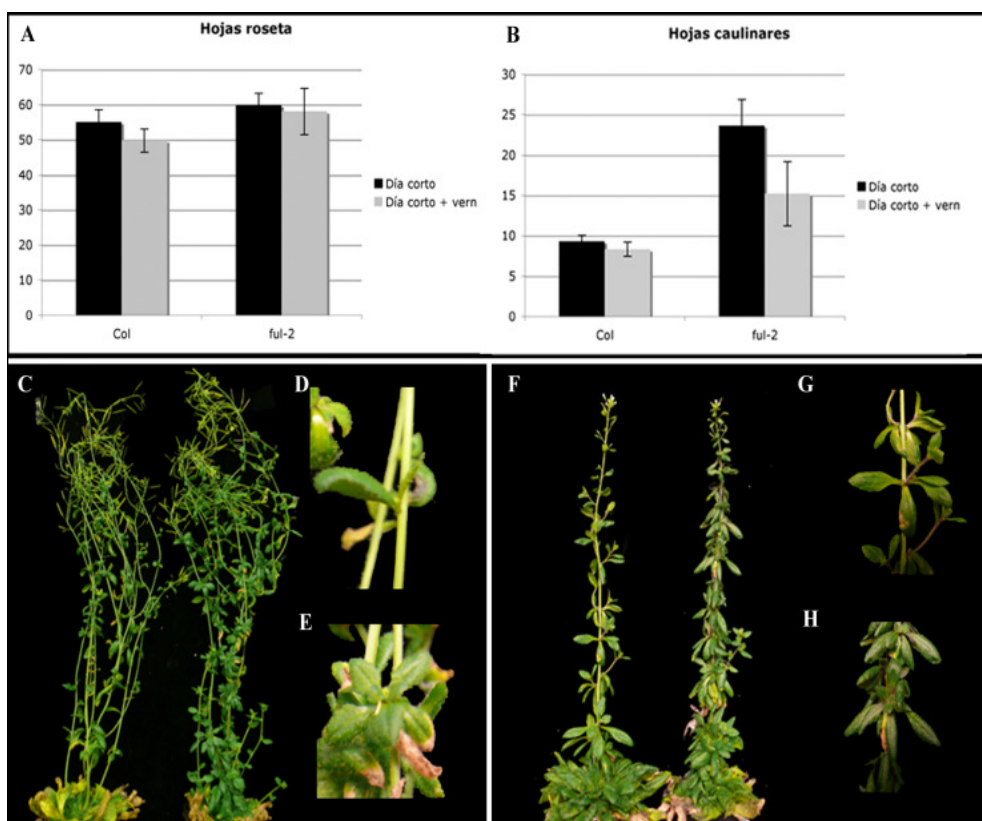


Figura 1-25: Efecto de la vernalización en el tiempo de floración de plantas silvestres y mutantes *ful*. Comparación entre el número de hojas de roseta (A) y caulinares (B) producidas por plantas silvestres y mutantes *ful-2*, vernalizadas durante un mes a 4°C y no vernalizadas, crecidas en condiciones de día corto. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de cada media. También se muestra el fenotipo de las plantas Col (C) y *ful-2* (F) crecidas durante 12 semanas en condiciones de día corto tras la vernalización (izquierda) y sin vernalización (derecha), al igual que el desarrollo de las rosetas aéreas típicas del crecimiento en día corto a partir de las hojas caulinares en plantas vernalizadas (D, G) y no vernalizadas (E, H) de plantas Col (D, E) y *ful-2* (G, H).

Los fenotipos observados sugerían un papel de la proteína *FLC*, en el control del desarrollo de la inflorescencia en condiciones de día corto, y un papel regulador de *FUL* en el proceso. Ya que en condiciones de día largo *FLC* no tiene un efecto importante en el ecotipo Columbia, se decidió introducir un alelo funcional de *FRI* en este ecotipo y cruzarlo por el mutante *ful-2* para caracterizar su tiempo de floración. Una vez obtenidas las nuevas líneas, se caracterizaron en nuestras condiciones de día largo. Las plantas ColFRI realizaron la transición con 57,6 hojas de roseta y 9,5 caulinares de media, mientras que las plantas FRI*ful-2* generaron 73,8 hojas de roseta y 19,2 caulinares de media (Tabla 1-11. Fig.1-26 A, C). Este retraso en la transición tan marcado sugiere que *FUL* podría desempeñar un papel importante en el control de la transición floral cuando *FLC* está presente, como ocurre en los ecotipos de *Arabidopsis* de hábito invernal.

También se estudió la respuesta de estas líneas a la vernalización. Tras pasar un mes a 4°C, las plantas se pasaron a condiciones de día largo. Las plantas ColFRI desarrollaron 24,4 hojas de roseta y 5,9 hojas caulinares de media, mientras que las FRI*ful-2* generaron 23,2 hojas de roseta y 8,7 hojas caulinares de media (Tabla 1-11. Fig.1-26 B, C), es decir, que tras el

tratamiento de vernalización, se redujo el número de hojas generadas en ambas líneas de un modo similar. Tanto ColFRI como FRI*ful-2* produjeron un número similar de hojas de roseta, aunque la línea FRI*ful-2* produjo unas pocas hojas caulinares más que la línea ColFRI. Los resultados de las líneas FRI vernalizadas se podrían considerar similares a los que se obtuvieron con plantas sin el alelo de FRI activo, ya que en ambas sólo se observó un ligero incremento en el número de hojas caulinares al comparar el mutante *ful-2* con la línea silvestre.

TABLA 1-11: Tiempo de floración expresado en número de hojas de roseta y caulinares producidas por plantas silvestres y *ful-2* en presencia de FRI y condiciones de día largo.

	No Vernalizadas		Vernalizadas	
	Hojas de roseta	Hojas caulinares	Hojas de roseta	Hojas caulinares
FRICol	57,6±8,1	9,5±2,1	24,4±2,1 ^a	5,9±1,0 ^a
FRI<i>ful-2</i>	73,8±6,3 ^b	19,2±0,8 ^b	23,2±2,3 ^a	8,7±0,8 ^{ab}

Plantas crecidas en condiciones de día largo. Los valores mostrados equivalen a la media ± la desviación estándar. ^a y ^b representan diferencias significativas con un p<0.05 respecto a no vernalizadas (^a) y FRICol. (^b). Prueba t-student.



Figura 1-26: Efecto de la vernalización sobre plantas FRI Col y FRI *ful*. Número de hojas producidas por plantas FRI Col y FRI *ful-2* en condiciones de día largo sin vernalizar (A) y vernalizadas (B). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las medias. También se muestra el fenotipo de las plantas FRI Col y FRI *ful-2* (C) sin vernalizar (izquierda) y vernalizadas (derecha).

Estos datos sugerían que el fenotipo de *ful-2* podría depender, en parte, de los niveles de *FLC* existentes, ya que cuando se realizaban tratamientos de vernalización se suprimían gran parte de los fenotipos de *ful-2* asociados al tiempo de floración. Los fenotipos observados en las líneas con el alelo funcional de *FRI* son mucho más fuertes en ausencia de *FUL*, sugiriendo que *FUL* podría actuar bien como un regulador negativo de los niveles de *FLC* o bien contrarrestando los efectos de *FLC* compitiendo por dianas comunes, aunque ambas posibilidades no serían excluyentes.

Para evaluar estas posibilidades ideamos dos tipos de cruces que nos proporcionaran rápidamente información. Haciendo uso de la sobreexpresión de *FUL* realizamos cruces con

35S::FLC, FRI Col, y una línea delatora FRI *flc-3* FLC::GUS, que nos permitirían observar el resultado en la descendencia de los cruces (F1), ya que tanto 35S::FLC, como FRI y FLC::GUS presentan un fenotipo dominante. Tanto las plantas 35S::FLC/+ como las FRI/+ realizan la transición con más de 50 hojas de roseta (Fig.1-27 A), debido a los altos niveles de FLC, mientras que las plantas 35S::FUL produjeron tan sólo 4 hojas de media. Al analizar las plantas procedentes del cruce entre 35S::FUL con 35S::FLC y ColFRI se observó lo siguiente: las plantas 35S::FUL/+ 35S::FLC/+ produjeron una media de 34,0 hojas de roseta (Fig.1-27 A, B), mientras que un cruce de la línea 35S::FLC por Columbia (35S::FLC/+) no mostró diferencias con la línea parental que sobreexpresaba *FLC*. Estos datos sugerían que niveles altos de *FUL* podían suprimir parcialmente el retraso de la floración provocado por *FLC*. Por su parte, las plantas derivadas del cruce 35S::FUL por FRI (35S::FUL/+ FRI/+) tan sólo generaron 9,6 hojas de roseta de media (Fig.1-27 A, B), mientras que un cruce de la línea ColFRI por Columbia (FRI/+) produjo 56,0 hojas de roseta de media (Fig.1-27 A, B), similar a la línea homocigota FRI Col. Comparando los resultados de ambos cruces se observaba que *FUL* era capaz de suprimir el retraso de la floración provocado por *FLC*, pero que era mucho más efectivo cuando *FLC* se expresaba bajo el control de su propio promotor.

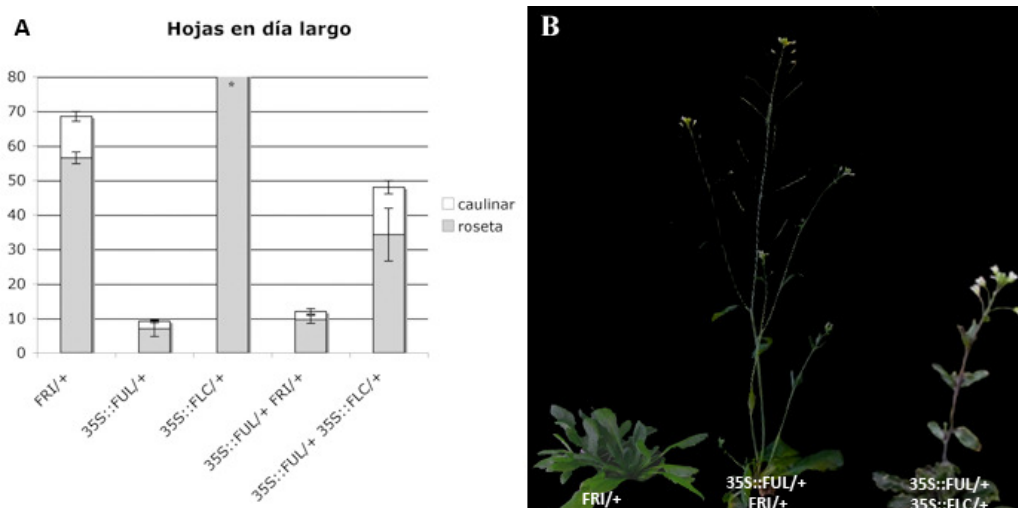


Figura 1-27: Tiempo de floración de las combinaciones de 35S::FUL con líneas que expresan niveles elevados de *FLC*. Número de hojas de roseta más caulinares producidas por plantas FRI/+, 35S::FUL/+, 35S::FLC/+, 35S::FUL/+ FRI/+ y 35S::FUL/+ 35S::FLC/+ en condiciones de día largo (A). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las medias. * Las plantas 35S::FLC/+ produjeron todas más de 80 hojas de roseta. También se muestra el fenotipo desarrollado por las plantas (B) FRI/+ (izquierda), 35S::FUL/+ FRI/+ (centro) y 35S::FUL/+ 35S::FLC/+ (derecha).

Estos resultados apoyaban la idea de que *FUL* era capaz de interferir en la función de *FLC* ya que era capaz de suprimir parte del retraso en el tiempo de floración provocado por la sobreexpresión de *FLC*. Sin embargo, la mayor eficiencia en la supresión del retraso del tiempo de floración cuando *FLC* estaba regulado por su propio promotor nos hacía contemplar de nuevo la posibilidad de un papel regulador de *FUL* sobre la expresión de *FLC*.

FUL controla la expresión de *FLC*

Para comprobar si existía un efecto de *FUL* sobre la expresión de *FLC* se analizaron las plantas derivadas del cruce entre 35S::FUL y Col con la línea FRI FLC::GUS. Los resultados fenotípicos de estos cruces fueron similares a los obtenidos con los cruces 35S::FUL por FRI. Al comparar la

tinción GUS entre ambos tipos de plantas se apreció que los niveles de expresión de GUS en la línea 35S::FUL/+ FRI/+ FLC::GUS/+ eran menores que en la línea control FRI/+ FLC::GUS/+ (Fig.1-28 A, B). Aunque en los cotiledones de ambas líneas no se apreciaron diferencias en los niveles de GUS (Fig.1-28 C, D), sí que se observó una disminución de los niveles desde la formación de la primera hoja (Fig.1-28 E, F). Por otro lado, a pesar que la sobreexpresión de *FUL* reducía los niveles de expresión de GUS, no la eliminaba por completo. Además, la línea que sobreexpresaba *FUL* era capaz de realizar la transición floral en presencia de FLC, ya que la aparición de flores se dio con niveles de tinción GUS altos (Fig.1-28 H, J), mientras que la línea control no realizó la transición hasta que la tinción GUS fue prácticamente nula (Fig.1-28 G, I). La expresión del gen delator desapareció prácticamente por completo en las hojas caulinares de la línea 35S::FUL (Fig.1-28 K).

Estos resultados sugerían que las dos opciones barajadas podían ocurrir simultáneamente. 35S::FUL podría eludir la represión ejercida por FLC, bien porque ambas proteínas estuvieran compitiendo por dianas comunes, o porque la sobreexpresión de *FUL* podría evitar una posible represión por FLC (Schmid et al., 2003), ya que las plantas que sobreexpresan *FUL* eran capaces de realizar la transición floral incluso cuando *FLC* estaba expresándose. Por otro lado *FUL* parecía estar afectando también a la expresión de *FLC*, ya que los niveles de expresión del gen delator fueron menores en las plantas 35S::FUL desde la aparición de las primeras hojas, lo que indicaba que *FLC* podría también estar regulándose de un modo independiente de la ruta de vernalización, y que *FUL* podría participar en esta represión.

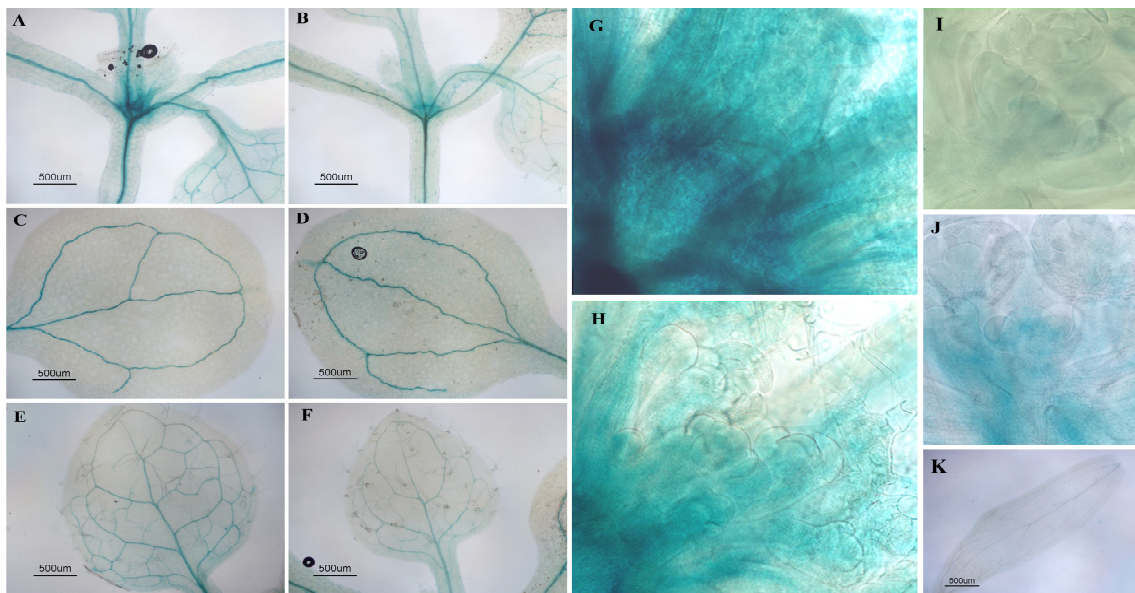


Figura 1-28: Expresión de *FLC*. Tinción GUS de las líneas heterocigotas FRI FLC::GUS (A, C, E, G, I) y 35S::FUL FRI FLC::GUS (B, D, F, H, J, K). Las plantas que sobreexpresan *FUL* presentan niveles más bajos de GUS cuando se comparan plántulas crecidas durante 6 días (A, B). Esta diferencia no es evidente en los cotiledones (C, D), pero sí en las primeras hojas desarrolladas por las plántulas (E, F). En el momento en que las plántulas 35S::FUL realizan la transición, se detecta todavía expresión del reportero (H), aunque a menor nivel que las plántulas que no sobreexpresan *FUL*, y que no realizan la transición (G). Cuando las plantas control realizaron la transición e iniciaron la producción de flores, los niveles de GUS detectados fueron muy bajos (I), mientras que en las plántulas 35S::FUL, en un estadio similar, continuaba expresándose el gen delator en la inflorescencia (J), aunque no se detectaba en las hojas caulinares (K).

FUL controla la expresión de *FLC* posiblemente de forma indirecta.

Nuestros resultados con la línea delatora FLC::GUS indicaban una posible función de FUL aguas arriba de *FLC*, por lo que se decidió testar esa posibilidad. Para ello realizamos un experimento de CHIP del mismo modo que lo realizamos para *SOC1* y *SVP*. Ya que no existía información en la bibliografía sobre regulación directa de *FLC* por otros factores de transcripción tipo MADS se identificaron posibles dianas *in silico*. Tras la identificación de cuatro posibles CarG (sitios de unión) reguladoras de *FLC* se procedió a medir el grado de enriquecimiento de estas secuencias mediante Q-PCR. Este experimento desveló que FUL no se unía a ninguna de estas cuatro posibles CarG en nuestras condiciones (Fig.1-24 B).

Estos resultados apuntaban a que la regulación de la expresión de *FLC* mediada por FUL podría ser indirecta, aunque no se podía descartar la posibilidad de que FUL se uniera otras zonas no testadas en nuestro experimento.

Discusión

***FUL* es un promotor de la transición floral, comportándose como un integrador de diferentes señales inductoras de la transición floral.**

En este capítulo de tesis se ha realizado la caracterización fenotípica del mutante *ful-2* respecto al tiempo de floración, desvelándose el papel regulador de *FUL* en este proceso como promotor de la transición floral. En todas las condiciones de crecimiento testadas, las plantas *ful-2* produjeron un mayor número de hojas respecto a las producidas por las plantas silvestres. Esta función propuesta para *FUL* está en concordancia con su patrón de expresión. El patrón de expresión de *FUL* se caracteriza por un brusco aumento de su expresión en el meristemo apical del tallo justo en el momento de la transición floral, donde a partir de entonces se expresa de forma continuada (Hempel et al., 1997; Mandel y Yanofsky, 1995). Además, durante el desarrollo de la inflorescencia, *FUL* se expresa fuertemente en la vasculatura de las hojas caulinares y del tallo (Gu et al., 1998). Tanto el meristemo apical del tallo como el tejido vascular de las hojas y el tallo son tejidos clave en la transición floral (Hempel et al., 2000; Searle et al., 2006; Wang et al., 2009; Wigge et al., 2005). El SAM es el lugar donde se integran todas las señales que disparan la transición floral, mientras que el tejido vascular de las hojas es el lugar donde se generan algunas de las señales que inician la transición, principalmente las derivadas de la ruta del fotoperiodo, y que viajan vía floema hasta el meristemo apical del tallo (Fornara y Coupland, 2009). El patrón de expresión característico de *FUL* mimetiza el patrón de expresión descrito para otros genes que participan en el proceso de la transición floral, como *SOC1* o *AGL24* y que se consideran integradores de las señales de floración. Además, los datos obtenidos de la sobreexpresión de *FUL* también apoyan un papel en el control de la transición floral. Las plantas 35S::*FUL* fueron capaces de adelantar la transición en todas las condiciones probadas en este trabajo, reduciendo tanto el número de hojas de roseta como el número de hojas caulinares, indicando que la presencia de *FUL* es suficiente para iniciar la transición floral.

De acuerdo con la función propuesta para *FUL*, recientemente se ha publicado, que la expresión dirigida de *FUL*, tanto a tejidos vasculares como al SAM, es capaz de promover la transición floral en *Arabidopsis* (Wang et al., 2009). Por otro lado, la sobreexpresión del homólogo de *FUL* en tabaco, al igual que en *Arabidopsis*, genera un claro adelanto de la floración (Smykal et al., 2007). Todos estos datos indican que, posiblemente, la función promotora de *FUL* en la transición floral esté conservada entre las angiospermas, aunque el mecanismo de acción pueda diferir entre clases vegetales.

***FUL* es un gen clave en la transición floral de plantas con hábito invernal.**

En la caracterización fenotípica realizada se observó que el efecto de la mutación del gen *FUL* difiere en función de las condiciones de crecimiento empleadas (día largo y día corto), así como de los tratamientos aplicados (sin vernalización y con vernalización). En condiciones de día largo, comparando con las plantas silvestres el efecto de la mutación *ful-2* es muy suave, afectando únicamente a la transición I1 a I2. En condiciones de día corto la mutación *ful-2* muestra fenotipos más severos, afectando ligeramente en la transición de V a I1, y de una forma notable a la transición I1 a I2. En presencia de alelos activos de *FRI* y *FLC*, la mutación *ful-2* afecta notablemente a ambas transiciones en condiciones de día largo. Estas diferencias de fenotipo sugieren que el requerimiento de *FUL* en el proceso de la transición floral es

diferente en función de las condiciones que dirijan la transición. En condiciones de día largo, donde la ruta del fotoperiodo está activa, las señales inductoras de la transición son muy fuertes debido a los altos niveles de *FT*, y en consecuencia, los niveles de las proteínas activadoras de la transición, como *SOC1* y *AGL24*, están altos. En este escenario, la ausencia de *FUL*, parece no afectar en gran medida a la transición floral. Esto se podría explicar si los altos niveles de *SOC1* y *AGL24* pudieran enmascarar la ausencia de *FUL*, sugiriendo que *FUL* actuaría redundantemente con *SOC1* y *AGL24* en la promoción de la transición floral (Fig. 1-29 A). En condiciones de día corto, donde la ruta del fotoperiodo no está activa, se retrasa la transición. En estas condiciones, la transición depende mayoritariamente de otras rutas, como la ruta de las giberelinas o la ruta endógena. En estas condiciones, el papel de *FUL* se hace patente. Ya que *FUL* es uno de los principales genes diana de las proteínas SPL activadas por la ruta endógena (Shikata et al., 2009; Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009), tiene sentido pensar que en estas condiciones, donde la ruta endógena es más importante, los efectos de la mutación *ful-2* sean también más importantes (Fig. 1-29 B). Por último, la presencia de alelos activos de *FRI* y *FLC*, provocan la represión de los principales genes integradores de la ruta del fotoperiodo, asegurando que las plantas sólo puedan responder a fotoperiodos inductivos tras el paso de un periodo prolongado de frío (invierno) o que la planta responda solamente a estímulos provenientes de la ruta autónoma o endógena. En estas condiciones, donde *SOC1* y *FT* están fuertemente reprimidos por *FLC*, y *AGL24* presenta niveles bajos de expresión, la falta de *FUL* genera un fuerte retraso de la transición floral (Fig. 1-29 C). El mutante *soc1-2* no muestra ningún retraso en la transición V-I1 en plantas *FRI FLC* (Moon et al., 2005), sugiriendo que en presencia de *FLC* la activación de la transición floral estaría mediada por otro integrador. Nuestros datos apuntan a que este integrador podría ser *FUL*. De este modo, los niveles de *FUL* podrían ser claves en la transición floral de ecotipos de *Arabidopsis* de hábito invernal.

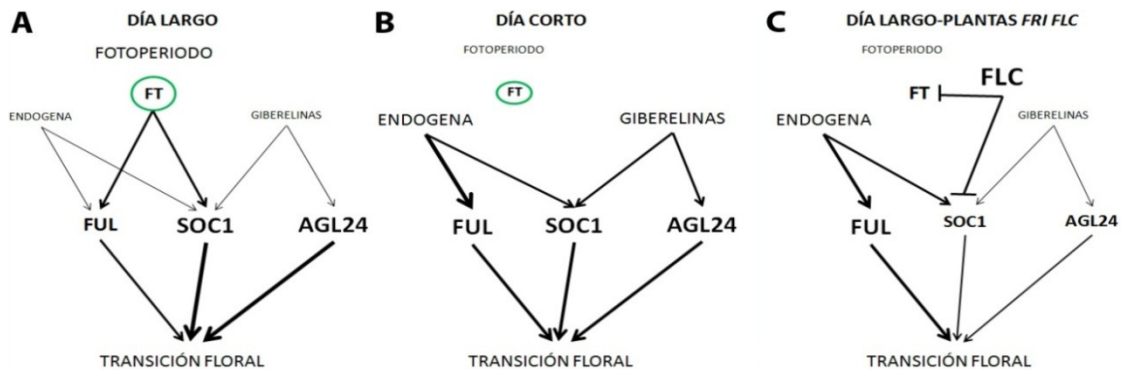


Figura 1-29: El papel de *FUL* en la transición floral en función de las condiciones de crecimiento. Los fenotipos mostrados por el mutante *ful* difieren según las condiciones de crecimiento y los niveles de *FLC*. En condiciones de día largo (A), la ruta del fotoperiodo estimula la acumulación de *FT*, que activa la expresión de *SOC1* y *FUL*. En estas condiciones, la ausencia de *FUL* apenas se percibe, posiblemente debido a la redundancia funcional que puede existir con *SOC1* y *AGL24*. En condiciones de día corto (B), la ausencia de *FT* provoca que otras rutas inductoras se vuelvan más determinantes, como la ruta de las giberelinas que actúa sobre *SOC1* y *AGL24*, o la ruta de la edad que actúa sobre *FUL* y *SOC1*. En estas condiciones el papel de *FUL* en la transición floral es más evidente que en condiciones de día largo. Por último, en plantas con alelos activos de *FRI* y *FLC* (C), *FUL* parece cobrar un papel determinante, debido a la baja expresión de *SOC1* y *AGL24*.

FUL media en la transición del estado adulto vegetativo a reproductivo.

Como hemos comentado, uno de los fenotipos asociados a la mutación *ful* es el retraso en la transición floral, afectando principalmente a la transición de la fase I1 a I2. La transición floral, además de iniciar el desarrollo reproductivo, conlleva una transición en los caracteres de los órganos producidos, que van adoptando características típicas de la fase inflorescente (Poethig, 2003; Wu y Poethig, 2006). El fenotipo observado en las hojas caulinares del mutante *ful* indica, además de un retraso en la transición floral reflejado por el incremento en número, un defecto en la adquisición de los caracteres adultos típicos de este tipo de hoja, ya que estas hojas siguen manteniendo caracteres de hojas adultas vegetativas en lugar de presentar caracteres de hojas adultas reproductivas. La ruta endógena descrita previamente que controla la transición floral, a su vez también está controlando los diferentes cambios de fase que experimenta *Arabidopsis*. Como ya hemos comentado, *FUL* es una de las principales dianas de esta ruta (Shikata et al., 2009; Usami et al., 2009; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Wu y Poethig, 2006; Yamaguchi et al., 2009), por lo que no sería descabellado pensar que pudiera estar mediando en ambos procesos. En cierto modo, podríamos considerar que en el mutante *ful* existe un desacoplamiento entre el inicio de la transición floral y los cambios asociados a ella, por lo que *FUL* podría actuar sincronizando la transición floral con los cambios morfológicos asociados, como la forma, tamaño y caracteres de las hojas caulinares (Shikata et al., 2009; Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009; Wu y Poethig, 2006; Wu et al., 2009) (Fig. 1-30). Una caracterización detallada de todas las hojas generadas por el mutante *ful*, así como por la línea 35S::FUL, serían necesarias para profundizar en el conocimiento de esta posible función de *FUL* en los cambios de fase de *Arabidopsis*.

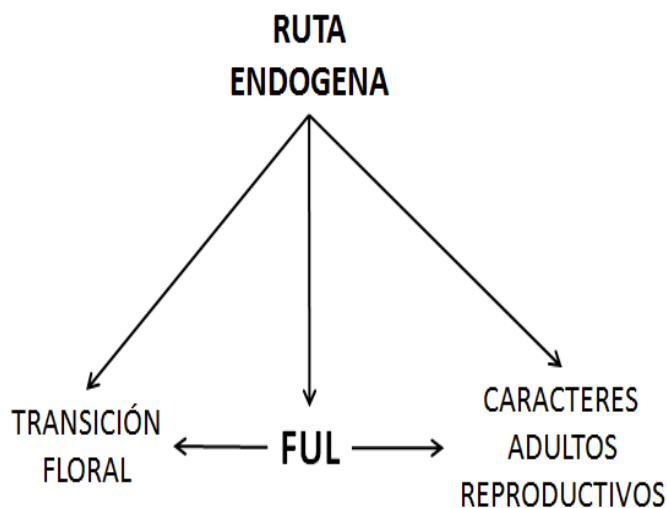


Figura 1-30: FUL participa en la transición floral y en la adquisición de los caracteres adultos reproductivos. La ruta endógena de la edad media tanto en la transición floral como los sucesivos cambios que se producen en los órganos desarrollados por el SAM y que caracterizan las diferentes etapas de desarrollo de *Arabidopsis*, etapa juvenil, adulta y adulta reproductiva. Puesto que esta ruta participa en la regulación de *FUL*, y que el mutante *ful* presenta defectos tanto en la transición floral, como en la adquisición de los caracteres adultos reproductivos de las hojas caulinares, podría ocurrir que *FUL* participara en la sincronización de estos dos procesos.

Este trabajo de tesis pone de manifiesto que *FUL* puede ser considerado como un integrador de la transición floral, y trabajos recientes apoyan esta idea al mostrar que *FUL* está regulado directamente por diferentes rutas inductoras de la transición floral, como la ruta del fotoperiodo y la ruta endógena de la edad, pero,

¿Cómo participa *FUL* en la promoción de la transición floral?

***FUL* controla la duración de la fase inflorescente a través de la regulación de *LFY*.**

El fenotipo mostrado por el mutante *ful* establece también una diferencia entre las dos clases de transiciones descritas, la transición V a I1 y la transición I1 a I2. El mutante *ful* no afecta del mismo modo a las diferentes fases de desarrollo de la planta, siendo la fase I1 la más afectada. De hecho, en condiciones de día largo el efecto de *ful* en la transición V es prácticamente imperceptible, aunque sí se aprecia un efecto significativo en la fase I1. Cuando las condiciones no son favorables (día corto o presencia de un gen activo de *FRI*) el requerimiento de *FUL* se hace más patente en ambas transiciones, pero el efecto de la mutación siempre es más notable en el establecimiento de la transición I1 a I2, alargando la fase de desarrollo inflorescente. Curiosamente, si se comparan estos fenotipos con los mostrados por otros mutantes considerados integradores de la transición floral, como *soc1* o *agl24*, observamos que estas mutaciones generan siempre retrasos más severos en la transición V a I1 que en la transición I1 a I2, indicando efectos diferenciales entre los mutantes de estos integradores y *ful* durante la transición floral (Fig. 1-31). Por otro lado, también se conocen mutaciones que incrementan el número de hojas caulinares producidas durante la transición floral, todas ellas relacionadas con la pérdida de identidad floral, como las mutaciones en los genes *LFY* y *AP1*, y que generan, además, defectos severos en el desarrollo floral (Fig. 1-31). El fenotipo del mutante *ful* podría considerarse pues, como intermedio entre los fenotipos mostrados por los mutantes de integradores de la transición floral y los mostrados por mutantes de genes de identidad de meristemo floral, ya que genera un retraso en la transición V, pero también genera un retraso en la transición I1, aunque sin provocar defectos en el desarrollo floral.

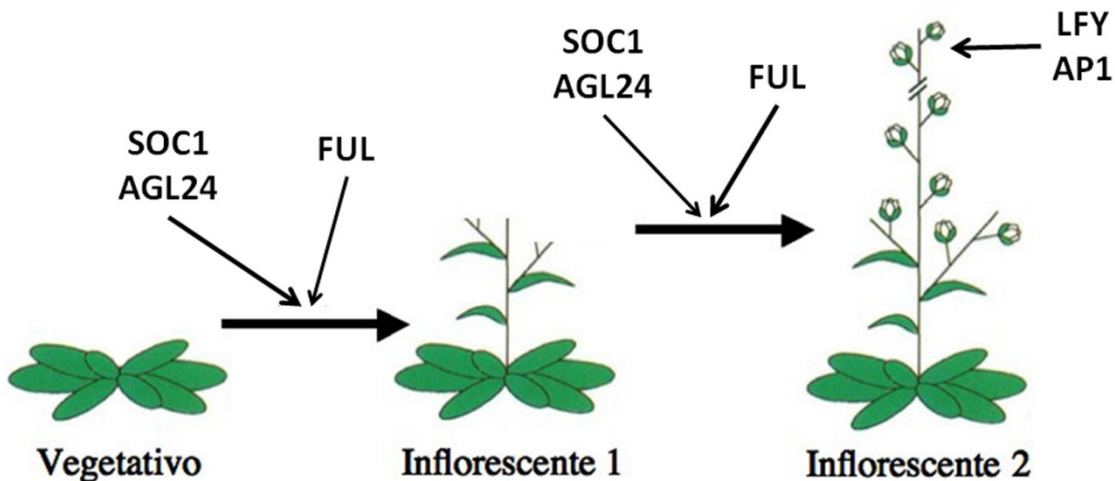


Figura 1-31: *FUL* tiene un papel destacado en la transición I1 a I2. El mutante *ful* provoca un retraso en la transición floral afectando tanto a la transición V a I1 como a la transición I1 a I2, pero su efecto siempre es más notable durante la fase I1, provocando un fuerte incremento en el número de hojas caulinares producidas, lo que se traduce en un alargamiento de la fase inflorescente I1. Mutaciones en otros genes considerados integradores de la transición floral como *SOC1* o *AGL24* afectan principalmente a la transición V a I1, con pequeños efectos sobre la transición I1 a I2. Incrementos similares en el número de hojas caulinares también se han descrito en mutantes que confieren identidad de meristemo floral, como *lfy* y *ap1*, aunque estas mutaciones apenas afectan a la transición V a I1., por lo que *FUL* podría ser clave en la activación adecuada de estos genes de identidad floral, además de promover la transición floral.

Durante mucho tiempo *FUL* se ha considerado como un gen que confiere identidad de meristemo floral, ya que presenta un alto grado de homología con los genes de identidad de meristemo floral *AP1* y *CAL* y a que el triple mutante *ap1 cal ful*, presenta una mayor pérdida de identidad de meristemo floral que la mostrada por el doble mutante *ap1 cal*. Esto sugiere que *FUL* podría funcionar de forma similar a *AP1* y *CAL*. La expresión de *LFY* en el triple mutante *ap1 cal ful* es menor que en el doble *ap1 cal*, indicando que *FUL* podría participar en la activación y mantenimiento de la expresión de *LFY* en los meristemos florales (Ferrándiz et al., 2000a), al igual que lo hacen *AP1* y *CAL*. Nuestros resultados muestran, efectivamente, que *FUL* es un regulador directo de *LFY*. Sin embargo, en plantas silvestres, *FUL* nunca se expresa en los estadios iniciales de desarrollo de los primordios florales, ya que *AP1* parece reprimir su expresión en estos tejidos (Mandel y Yanofsky, 1995). *LFY* y *AP1* se autoregulan (Liljegren et al., 1999; Parcy et al., 1998), pero la expresión de *LFY* precede a la expresión de *AP1* (Hempel et al., 1997). Toda esta información sugiere que *FUL* podría actuar promoviendo la activación de la expresión inicial de *LFY* en los flancos del SAM, y que una vez *LFY* estuviera presente, este activaría la expresión de *AP1* que finalmente reprimiría la expresión de *FUL* en el primordio floral (Fig. 1-32). El fallo en la correcta activación de *LFY* explicaría el retraso en la aparición de las flores, así como la aparición de flores sustentadas en una hoja observadas en condiciones de día corto, ya que se ha relacionado a *LFY*, con la supresión de este carácter durante el desarrollo floral (Hepworth et al., 2006; Weigel et al., 1992).

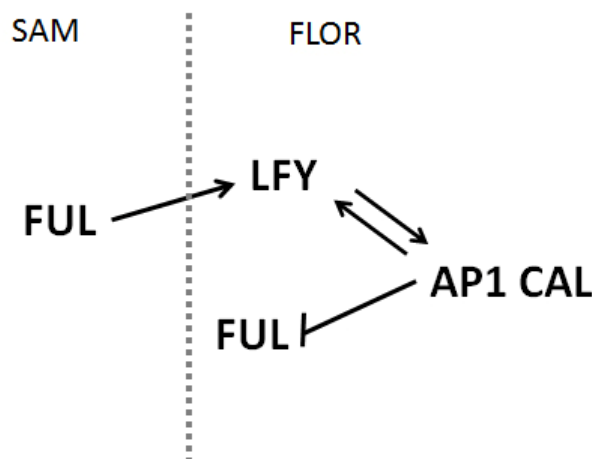


Figura 1-32: *FUL* es un regulador directo de *LFY*. Una vez *FUL* ha empezado a expresarse en el SAM, participa en la activación de *LFY*, un gen de identidad floral. La expresión de *LFY* activa a su vez la expresión de otro gen de identidad floral *AP1*, entre los que se establece un ciclo de retroalimentación positivo. A su vez, *AP1* reprime la expresión de *FUL*, delimitando claramente la región del SAM en la que se originará el primordio floral.

***FUL* podría regular la activación de *LFY* junto con *SOC1*.**

Nuestros resultados muestran que *FUL* y *SOC* pueden funcionar tanto conjuntamente como independientemente. El efecto conjunto de ambas proteínas se deduce fácilmente a partir de los fenotipos observados en el doble mutante, donde además de mostrar un fenotipo más severo en el tiempo de floración, presenta fenotipos inexistentes en los dos mutantes sencillos, indicando una acción conjunta de ambos genes. La doble sobreexpresión de estos genes también sugiere una acción conjunta de ellos, contribuyendo ambos al adelanto de la transición floral. Los datos genéticos a su vez, también indican cierto grado de independencia de sus efectos reguladores, ya que los mutantes sencillos presentan fenotipos por sí mismos, sugiriendo que si bien una posible redundancia funcional pudiera existir, esta no sería total. En este trabajo de tesis hemos observado que *FUL* es capaz de unirse al promotor de *LFY* y regular su expresión. *SOC1*, al igual que *FUL*, también se une a este promotor y regula la expresión de

LFY (Lee et al., 2008). Ya que ambas proteínas son capaces de dimerizar, tanto en ensayos de doble híbrido en levadura (de Folter et al., 2005) como en ensayos de BiFC en hojas de tabaco, no sería descabellado pensar que este dímero pudiera estar presente durante el desarrollo de *Arabidopsis*, y que tuviera una relevancia funcional. Además, ambas proteínas se unen en la misma región del promotor de *LFY*, sugiriendo que el dímero FUL-SOC1 podría estar controlando la expresión de *LFY*. Ya que ambos mutantes también afectan a la expresión de este gen por separado, podríamos pensar que ambos genes serían capaces también de realizar esta función individualmente (Fig. 1-33) o formando complejos con otros promotores de la transición, aunque el dímero FUL-SOC1 podría activar más eficientemente la expresión de *LFY* (Fig. 1-33). La formación de un dímero que potencie la acción reguladora de estas proteínas también explicaría el fenotipo observado en las plantas 35S::FUL 35S::SOC1, que presentan un fenotipo extremo de floración, donde todos los meristemos aéreos se convierten en meristemos florales al igual que ocurre en plantas 35S::LFY (Weigel y Nilsson, 1995).

El doble *ful soc1* presenta un retraso en la aparición de las flores mucho más fuerte que cualquiera de los mutantes sencillos, indicando que la formación del dímero FUL-SOC1 no sería el único responsable de la transición floral. De ser así, el doble mutante *ful soc1* debería ser epistático a alguno de los mutantes sencillos, sugiriendo que SOC1 y FUL podrían estar formando otros dímeros también importantes en la transición floral y la activación de *LFY*.

De acuerdo con este razonamiento, un mecanismo de acción similar al que hemos propuesto para el dímero FUL-SOC1 ha sido descrito previamente para SOC1 y AGL24. SOC1 tiene localización citoplasmática y cuando interacciona con AGL24, el dímero se localiza en el núcleo de la célula, donde activa la expresión de *LFY* (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008) (Fig. 1-33).

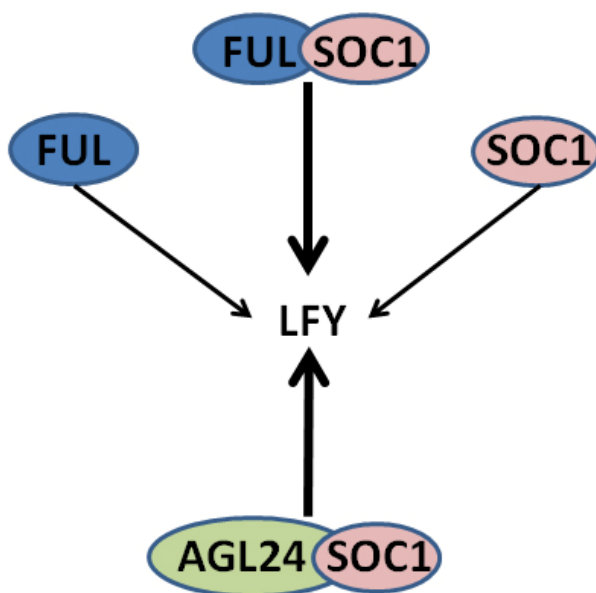


Figura 1-33: El dímero FUL-SOC1 media la activación de LFY. Los mutantes sencillos de FUL y SOC1 presentan defectos en la activación de LFY señalando que participan en su regulación. Tanto FUL como SOC1 son capaces de unirse al promotor de LFY en una misma región, a la vez que son capaces de interactuar físicamente. El hecho de que en un doble mutante *ful soc1* se produzca un retraso en la aparición de las flores muchísimo más fuerte que en cualquiera de los mutantes sencillos indicaría que el dímero FUL-SOC1 regularía la expresión de LFY de una forma más eficiente. Este mismo mecanismo de acción también ha sido propuesto para el dímero formado por SOC1 y AGL24, otro integrador de la transición floral.

Así, FUL parece funcionar de un modo similar a AGL24, ya que el dímero FUL-SOC1 detectado por BiFC se localizó siempre en el núcleo, por lo que la formación del dímero podría dirigir la entrada de SOC1 en el núcleo, y mediar la activación de LFY. El hecho de que FUL y AGL24 interactúen de forma similar con SOC1 explicaría el escaso fenotipo observado en ciertas condiciones en el mutante *ful*, ya que AGL24 podría reemplazar a FUL en esas situaciones. Del mismo modo, FUL podría también interactuar físicamente con AGL24 (de Folter et al., 2005),

por lo que también podría reemplazar en algunas ocasiones la ausencia de *SOC1*. En el doble mutante *ful soc1*, donde ninguna de estas tres combinaciones propuestas podría estar funcionando obtendríamos defectos mucho más fuertes que en cualquiera de los mutantes sencillos.

Además, FUL podría mediar la activación de SOC1.

Como hemos comentado, *FUL* podría estar actuando de forma similar a *AGL24*, pero su relación con *SOC1* no parece ser idéntica. *SOC1* y *AGL24* se autoregulan, confiriendo robustez a la transición floral (Liu et al., 2008) (Fig. 1-34). La sobreexpresión tanto de *SOC1* como de *AGL24* provoca adelanto de la transición floral. Cuando una de estas sobreexpresiones se combina con la mutación del otro gen se produce una corrección del adelanto del tiempo de floración de la sobreexpresión, indicando que la floración temprana de las sobreexpresiones depende, en parte de la regulación y la presencia del otro gen, por lo que ambos genes podrían estar regulándose mutuamente y participando en la promoción de la transición floral como dímero. Nuestros resultados indican que el adelanto del tiempo de floración observado en la línea 35S::FUL depende, en gran medida, de la presencia de *SOC1*, apuntando a que *FUL*, al igual que *AGL24*, actuaría activando la expresión de *SOC1* (Fig. 1- 34). Pero la situación inversa no muestra lo mismo. El efecto promotor de la línea 35S::SOC1 no depende de la presencia de *FUL*, indicando que *SOC1* no estaría regulando los niveles de *FUL* (Fig. 1- 34) o que no necesitara a *FUL* para formar otros complejos promotores de la transición.

Como hemos discutido anteriormente podría ocurrir que *AGL24* estuviera enmascarando la ausencia de *ful*. El hecho de que *FUL* no enmascare el fenotipo observado en las plantas 35S::SOC1*agl24* sugiere que al menos la relación entre *SOC1*, y *AGL24* y *FUL* difiere en este aspecto. *SOC1* sería capaz de regular a *AGL24* pero aparentemente no a *FUL* (Fig. 1- 34). De todos modos sería interesante testar la relación entre estos tres genes, tanto a nivel de regulación como de interacción física, ya que parte de la función reguladora de *SOC1* y su localización en el núcleo parece depender de su interacción con *FUL* y *AGL24*, sin descartar otras posibles interacciones de *SOC1*.

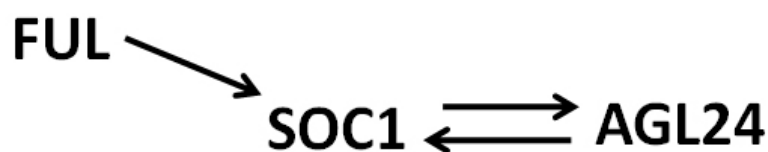


Figura 1-34: FUL media la activación de SOC1. Aunque parte del mecanismo de acción propuesto para *FUL* mimetiza el seguido por *AGL24*, no coinciden completamente. Mientras que entre *SOC1* y *AGL24* se establece un ciclo de retroalimentación positiva, esto no ocurre entre *SOC1* y *FUL*, nuestros resultados sugieren que *FUL* sería capaz de activar a *SOC1*, mientras que *SOC1* podría no regular a *FUL*. De este modo, *FUL* podría actuar en algunas ocasiones aguas arriba de *SOC1* y *AGL24*.

SVP media los efectos de FUL durante la transición floral

FUL y *SOC1* parecen funcionar de un modo similar, actuando como promotores de la transición floral, mientras que *SVP* está considerado como un fuerte represor de la transición, al reprimir la expresión de genes que la promueven, como *SOC1*, y actuando de forma opuesta a *FUL* (Fig. 1-35). De hecho los fenotipos de los mutantes *ful* y *svp* son opuestos. Al analizar los fenotipos de los dobles mutantes de *svp ful* y *svp 35S::FUL* llama fuertemente la atención la epistasia de

svp sobre ambas líneas. El fenotipo del doble *ful svp* resulta esperable. *FUL* podría estar regulando los niveles de *SVP*, de ahí la epistasia de *svp* o bien, ya que *SVP* reprime a *SOC1*, los altos niveles de *SOC1* en el mutante *svp* podrían estar enmascarando la ausencia de *FUL* (Fig. 1-35). Pero el fenotipo de las plantas *35S::FUL svp* es completamente inesperado. Al combinar la sobreexpresión de *FUL* y el mutante *svp*, dos líneas que presentan adelanto del tiempo de floración, esperaríamos un efecto sinérgico sobre este carácter, o al menos, un tiempo de floración similar al de la línea más temprana, *35S::FUL* (Fig. 1-36). Estos resultados indicaban que el papel regulador que ejerce *FUL* sobre el tiempo de floración, donde actúa como un promotor, dependen de la presencia de *SVP*, un represor clásico de este proceso (Fig. 1-36).

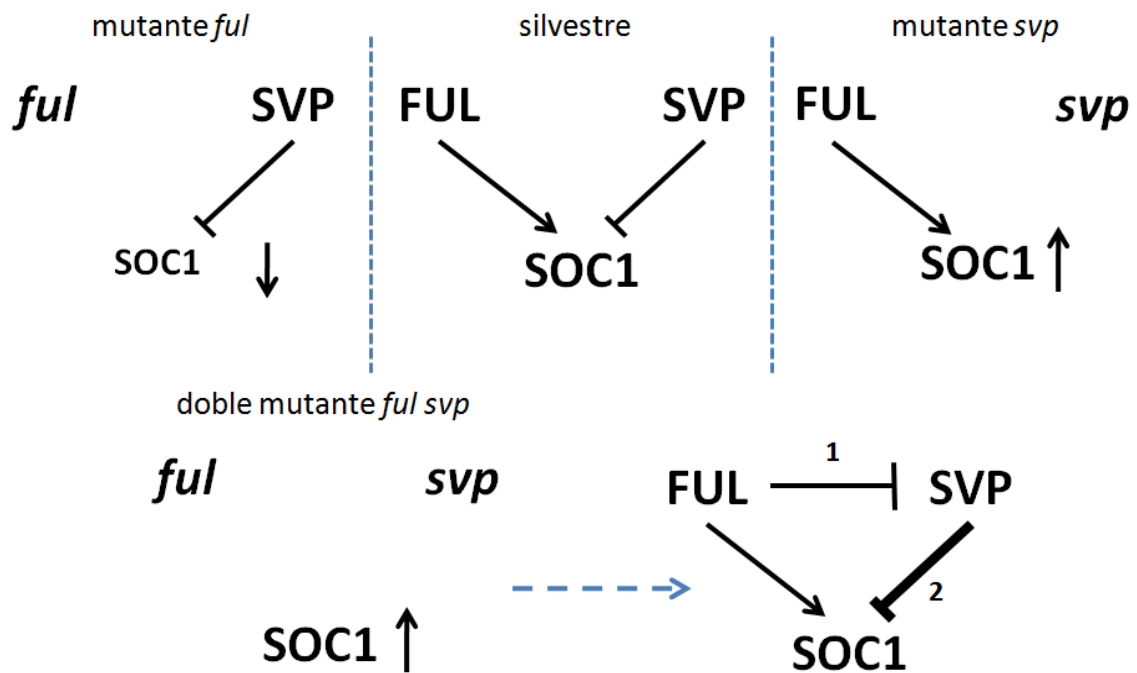


Figura 1-35: *FUL* y *SVP* tienen papeles opuestos durante la transición floral. Se ha descrito que *SVP* es un fuerte represor de la expresión de *SOC1*, mientras que nuestro trabajo indica que *FUL* se puede comportar como un activador de la expresión de *SOC1*. Según este razonamiento en el mutante *ful*, los niveles de *SOC1* estarían bajos debido a la ausencia de *FUL* y la represión de *SVP*. Por su parte, en el mutante *svp* ocurriría lo contrario, encontrando altos niveles de *SOC1*. El fenotipo observado en el doble mutante *ful svp* es similar al observado en el mutante *svp*, sugiriendo un posible papel de *FUL* a través de *SVP*. Una posibilidad sería, puesto que *FUL* es capaz de unirse al promotor de *SVP*, que participara en su represión (1). Por otro lado los altos niveles de *SOC1* del mutante *svp* podrían enmascarar la ausencia de *FUL* (2).

Los patrones de expresión descritos para *FUL* y *SVP* son antagonistas, ya que durante el desarrollo vegetativo *SVP* se expresa en la vasculatura foliar y el SAM mientras que *FUL* apenas se expresa. Durante la transición floral se invierten los patrones de expresión, expresándose *FUL* fuertemente en el SAM y la vasculatura, mientras que *SVP* desaparece de estos tejidos. Esta relación antagonista sugiere una posible regulación entre estos genes, de forma que *FUL* podría estar reprimiendo la expresión de *SVP* durante la transición floral y el desarrollo de la inflorescencia. Esta posibilidad estaría apoyada por el fenotipo del doble mutante, donde se suprime el retraso de la floración observado en el mutante *ful*, y por el resultado del experimento de ChIP realizado sobre el promotor de *SVP*, al que se une *FUL*, pero no explica el

fenotipo de las plantas 35S::FUL *svp*. Si FUL funcionara únicamente regulando los niveles de *SVP*, las plantas 35S::FUL *svp* deberían ser similares a las 35S::FUL, por lo que debe existir otro mecanismo de regulación que explique este resultado (Fig. 1-36).

Ya que tanto FUL, un activador, como SVP, un represor, se unen al promotor de *SOC1*, es lógico pensar que ambos actuarían de forma opuesta, compitiendo por activar o reprimir la expresión de *SOC1* (Fig. 1-36). Según este planteamiento, la ausencia de *SVP* aumentaría la expresión de *SOC1*, adelantando la transición floral, y la sobreexpresión de *FUL* sería capaz de saltar la represión de *SVP*, activando la expresión de *SOC1* y adelantando también la transición floral (Fig. 1-36). Según este planteamiento, la combinación 35S::FUL *svp* debería presentar un fenotipo aditivo, con un tiempo de floración menor que los desarrollados por los parentales, o al menos florecer tan temprano como las plantas 35S::FUL.

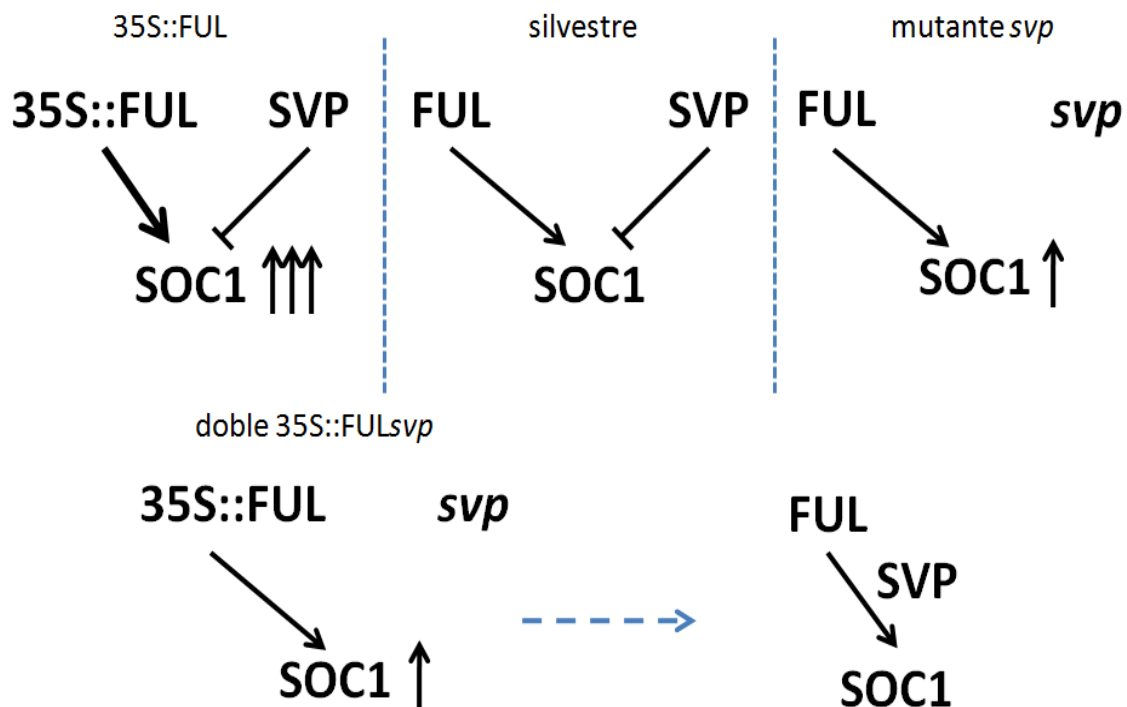


Figura 1-36: SVP puede ser también un promotor de la transición floral. Tanto las plantas 35S::FUL como las *svp* presentan adelantos de la floración, puesto que ambas líneas afectan a *SOC1*. En la combinación 35S::FUL *svp* esperaríamos ver un efecto sinérgico en el tiempo de floración o un fenotipo similar al tiempo de floración más temprano de las líneas parentales, 35S::FUL. La epistasia de *svp* observada en las plantas 35S::FUL *svp* indica que el adelanto de la floración observado en 35S::FUL depende de la presencia de *SVP*, un represor de la transición floral.

La epistasia observada indica que *FUL* requiere de *SVP* para promover la floración. Esta idea implica que *SVP*, considerado un represor clave de la transición floral, también puede comportarse como un promotor, pero

¿Qué puede generar este cambio de acción reguladora en *SVP*?

SVP como un regulador dual de la transcripción.

Una posibilidad que explicara el cambio funcional de SVP sería su interacción con *FUL*. Nuestros resultados de BiFC muestran que ambas proteínas interactúan, y que el dímero resultante se localiza en el núcleo donde podrían ejercer alguna función reguladora conjunta. Para que este dímero fuera funcional, ambas proteínas deberían encontrarse presentes a la vez en un mismo tejido. El único momento en el que ambas proteínas coexisten es al inicio de la transición floral, en el SAM (Fig. 1-37). En ese momento los niveles de *SVP* son elevados y los de *FUL* aumentan rápidamente. Justo en ese momento ambas proteínas podrían dimerizar modificando la acción represora de SVP.

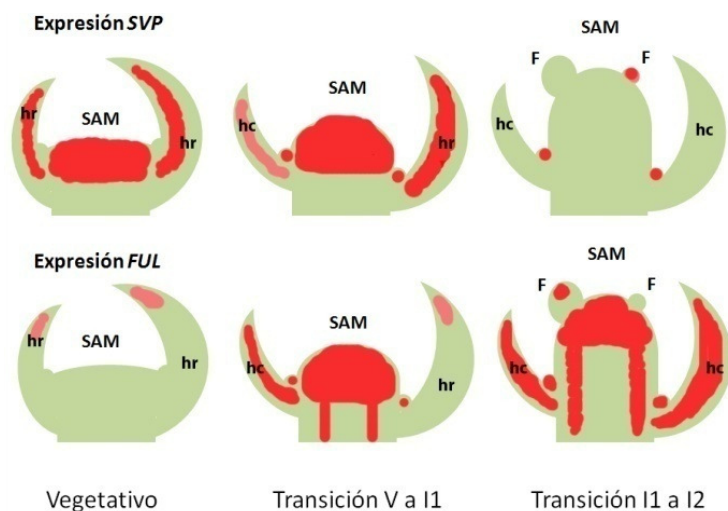


Figura 1-37: Las proteínas *FUL* y *SVP* coinciden en el SAM al inicio de la transición floral. *FUL* y *SVP* presentan patrones de expresión opuestos durante el desarrollo de *Arabidopsis*, expresándose *SVP* fuertemente durante la etapa vegetativa, mientras que *FUL* lo hace durante la etapa reproductiva. Ambas expresiones coexisten en el momento inicial de la transición floral, cuando *FUL* empieza a incrementar su expresión y *SVP* a disminuirla.

Puesto que ambas proteínas se unen al promotor de *SOC1*, una de las dianas reguladas por este dímero, y por el cambio de actividad de SVP, podría ser *SOC1*. Se ha descrito que SVP dimeriza también con el factor de transcripción FLC, otro gen perteneciente a la familia MADS, y que ambas proteínas participarían en la represión directa de *SOC1* (Fig. 1-38). Asumiendo que SVP y *FUL* son capaces de interactuar, la aparición de *FUL* podría desplazar a FLC del dímero que forma con SVP, modificando la regulación de *SOC1* (Fig. 1-38). Puesto que SVP es necesario para obtener el adelanto de la transición floral observado en 35S::*FUL*, posiblemente, el nuevo dímero funcione mediando la activación de *SOC1* (Fig. 1-38).

Este razonamiento estaría de acuerdo con los fenotipos observados en las dobles sobreexpresiones de *FUL* y *SVP*, y de *FUL* y *FLC*. Mientras que en presencia de niveles elevados de *FUL* y *FLC* se observa un tiempo de floración intermedio entre ambos parentales, la doble sobreexpresión de *FUL* y *SVP* presenta floración temprana, similar al tiempo de floración de las plantas 35S::*FUL*, sugiriendo que SVP en presencia de *FUL* no reprime la transición floral, mientras que FLC sí que lo hace. Así, podemos proponer la hipótesis de que *FUL* y *FLC* podrían estar compitiendo por la formación de dímeros con SVP. En función del dímero formado por SVP su función reguladora podría ser activadora (*FUL*-SVP) o represora (*FLC*-SVP) (Fig. 1-38).

Este tipo de comportamiento dual también se ha propuesto para otros factores de transcripción mediante estudios transcriptómicos de micromatrices acoplados a ChIP-seq. (Yant et al., 2010; Kaufmann et al. 2010), entre los que se encuentra algún factor de transcripción tipo MADS (Kaufmann et al. 2010). Nuestra hipótesis establece que en el momento en que apareciera *FUL*, el efecto represor del dímero *FLC*-SVP se vería afectado. *FUL*

dimerizaría con SVP, bien desplazando a FLC, bien formando complejos FUL-SVP activadores que competirían con la acción represora del dímero FLC-SVP en la regulación de *SOC1* (Fig. 1-38).

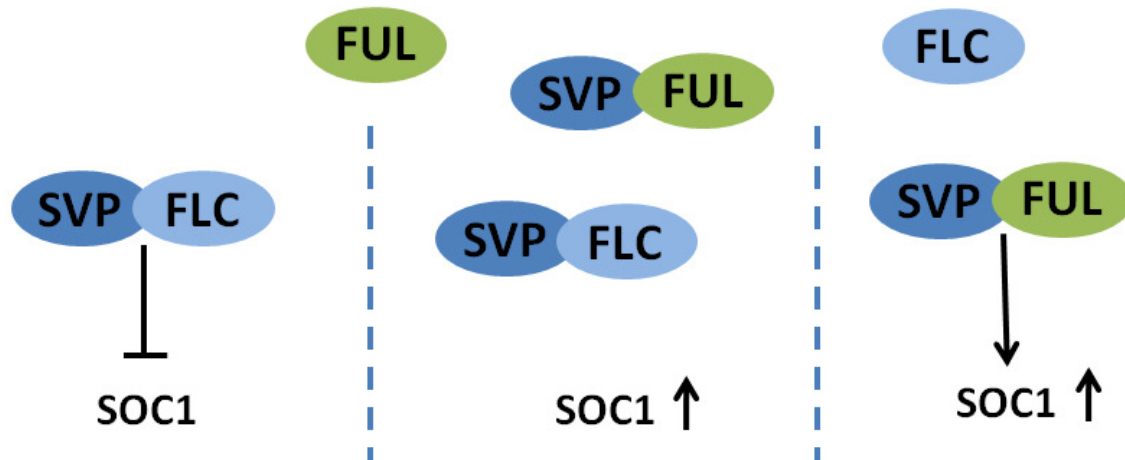


Figura 1-38: SVP podría comportarse como un represor y un promotor de la transición floral. SVP dimeriza con FLC y ambos reprimen la expresión de *SOC1*. Por su parte FUL y SVP promueven la transición floral de forma conjunta. Antes de la transición floral, en ausencia de FUL el dímero SVP-FLC está presente y reprime la expresión de *SOC1*. En el momento que aparece FUL, y puesto que es capaz de dimerizar con SVP podría desplazar a FLC del complejo que forma con SVP, disminuyendo el efecto represor sobre *SOC1*. El nuevo dímero FUL-SVP actuaría ahora como activador, disparando la expresión de *SOC1*.

Los sitios de unión en el promotor de *SOC1* para SVP y FLC se han descrito detalladamente. SVP y FLC se unen a dos CarGs contiguas situadas a -978 y -949 p.b. del codón de inicio de *SOC1* respectivamente. La zona de unión de FUL al promotor de *SOC1* se encuentra a unas 200 bases de las CarG establecidas para SVP y FLC, donde se encuentran dos posibles CarGs, por lo que se une a una región distinta de la unida por SVP y FLC.

Se ha propuesto que los factores de transcripción tipo MADS se unen al DNA en forma de dímeros, y que la actividad reguladora por ellos ejercida depende de la formación de estos dímeros, y de complejos de orden superior formados por los dímeros iniciales. La unión de estos complejos a las secuencias que reconocen en el promotor de los genes diana puede generar la formación de lazos o bucles de DNA que estarían relacionados con la actividad reguladora de estos factores de transcripción. Resulta interesante pues observar que la unión del dímero SVP-FLC, aparentemente no generaría ningún lazo en el promotor de *SOC1* debido a la proximidad de las CarG que unen, mientras que la unión del dímero SVP-FUL aparentemente sí podría hacerlo. La formación de este lazo, al situarse el sitio de unión de FLC al promotor de *SOC1* entre los sitios de unión de SVP y FUL, además de mediar la actividad sobre *SOC1*, podría impedir la futura unión de FLC y su efecto represor (Fig. 1-39).

Para dar más evidencia experimental a este modelo sería interesante testar la capacidad de unión de estos factores de transcripción a sus dianas en ausencia de algún componente del dímero aquí descritos, como por ejemplo realizar experimentos de ChIP con la proteína FUL en plantas mutantes *svp* para observar si la unión de FUL al promotor de *SOC1* depende de la presencia de SVP. Otro experimento a realizar podría ser comprobar si la unión del dímero FUL-SVP al promotor de *SOC1* sería capaz de generar el lazo propuesto en nuestro modelo mediante experimentos de TPM (Tethered particle motion) (Finzi y Dunlap, 2003; Kooiker et al., 2005), donde se fija a un soporte rígido un extremo de una secuencia de DNA, en este caso

un fragmento del promotor de *SOC1*, y se añaden las dos proteínas a testar. Si ambas proteínas se unieran a los sitios descritos e interaccionaran entre ellas, se produciría un acortamiento de la secuencia que seríamos capaces de detectar con esta técnica.

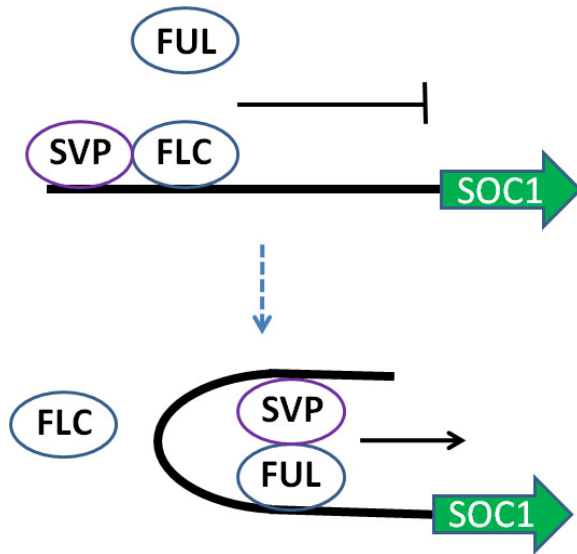


Figura 1-39: La unión del dímero FUL-SVP al promotor de *SOC1* podría generar la formación de un lazo de DNA. Las CarGs reconocidas por SVP y FLC han sido claramente descritas, encontrándose separadas por apenas 20 pares de base. El sitio de unión establecido para FUL se encuentra a unos 200 pares de bases de los sitios de SVP y FLC. Según la disposición de estos sitios de unión, el dímero FLC-SVP, al tener los sitios de unión tan próximos, se uniría a una única zona del promotor. Por otro lado, el dímero FUL-SVP, al encontrarse sus sitios de unión alejados uniría dos zonas distintas, lo que podría generar la formación de un lazo de DNA.

El papel de *FUL* en ecotipos de hábito invernal.

Como hemos introducido, *FLC* actúa como un represor de la transición floral, a través de la represión directa de *SOC1*, dimerizando con *SVP*. Como se describió en la introducción, los genes *FRI* y *FLC* son responsables de una gran parte de la variación natural encontrada entre los diferentes ecotipos de *Arabidopsis*, y a su vez, responsables del tiempo de floración de los ecotipos de hábito invernal, una adaptación clave para la especie en hábitats fríos. Nuestro trabajo muestra que parte del fenotipo en el tiempo de floración de la mutación *ful* se corrige con un tratamiento de vernalización. Además los fenotipos más extremos respecto al retraso en el tiempo de floración del mutante *ful* son los descritos cuando la mutación se encuentra en un fondo *FRI Col*.

La vernalización afecta principalmente a los niveles de *FLC*, reduciéndolos. Ya que parte del retraso en el tiempo de floración del mutante *ful* se corrige con un tratamiento de vernalización, podríamos pensar que existe una relación entre ambos genes. Posiblemente, parte del retraso en el tiempo de floración del mutante *ful* se deban a la presencia de *FLC*, sugiriendo que *FUL* pudiera controlar de algún modo los niveles de esta proteína o evitar su efecto represor. Tanto la regulación de *FLC* por *FUL*, como que *FUL* pudiera interferir en la acción represora de *FLC* son hipótesis plausibles (Fig. 1-40). Por un lado, la expresión ectópica de *FUL* es capaz de suprimir el fenotipo de tiempo de floración observado en las líneas *FRI Col* y *35S::FLC*, aunque este efecto es más notable en plantas *FRI Col*, donde *FLC* se expresa a través de su propio promotor. Estas dos hipótesis explican también lo observado al analizar la expresión de *FLC* en plantas *35S::FUL* con alelos funcionales de *FRI* y *FLC*. Estas plantas florecen mucho antes que las plantas *FRI Col*, pero aunque los niveles de *FLC* son menores, florecen en presencia de *FLC*, mientras que las plantas control florecen cuando no se detecta expresión de *FLC*. Así, *FUL* parece ser capaz de evitar el efecto represor de *FLC*, pero también es capaz de disminuir los niveles de *FLC*, por lo que podría actuar reprimiendo su expresión. El efecto sobre los niveles de *FLC* mediado por *FUL* parece ser indirecto, ya que en nuestro experimento de

ChIP, no hemos sido capaces de encontrar ninguna región del promotor de *FLC* enriquecida, aunque no se puede descartar la posibilidad de una regulación directa de *FLC* por *FUL* a través de otra región no testada en nuestro experimento. Recientemente se ha descrito que *SOC1* puede controlar la expresión de *FLC* de forma indirecta, reprimiendo la expresión de los genes de respuesta a frío *CBFs* (*CRT/DRE binding factors*) y *COLD REGULATED (CR)*, que a su vez activan la expresión de *FLC* (Seo et al. 2009). Ya que *FUL* y *SOC1* son capaces de dimerizar podrían participar de forma conjunta en la regulación de estos genes, y de forma indirecta, en la regulación de *FLC* (Fig. 1-40). De este modo, *FUL* podría regular indirectamente la expresión de *FLC*, y a su vez, eliminar el efecto represor de *FLC* sobre *SOC1* a través de su interacción con *SVP* (Fig. 1-40).

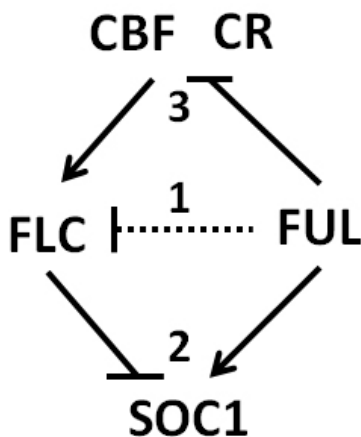


Figura 1-40: Efecto de *FUL* sobre *FLC*. *FUL* podría modular la respuesta mediada por *FLC* de dos modos, bien reprimiendo su expresión (1 y 3), o bien compitiendo con *FLC* por dianas comunes (2). Nuestros resultados no nos han permitido establecer si *FUL* reprime a *FLC* de forma directa, aunque si observamos una disminución de sus niveles en plantas *35S::FUL* (1). Una opción plausible sería la competición por dianas comunes como *SOC1*, ya que ambas proteínas se unen a su promotor (2). La regulación indirecta de *FLC* por *FUL* podría mediarse a través de la represión de los genes *CBF* y *CR* junto a *SOC1*, que son activadores de la expresión de *FLC*.

Relevancia biológica de la función de *FUL* durante la transición floral.

Este trabajo de tesis pone de manifiesto el papel de *FUL* en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*, siendo esta función más notable en condiciones no inductivas de fotoperiodo y cuando están presentes los genes *FRI* y *FLC*. En estas condiciones, donde no existe un fotoperiodo inductor o están presentes fuertes represores de la transición floral, el efecto de otras señales inductoras resulta clave para iniciar la transición floral y asegurar la producción de una nueva generación de plantas. *FUL* podría estar comportándose como un gen clave en estas condiciones. Una de las rutas más relevantes en estas condiciones debe ser la ruta endógena de la edad. Esta ruta modula la transición floral y los cambios morfológicos asociados a este proceso de desarrollo en función de la edad de la planta, asegurando la floración a pesar de las condiciones adversas. Esta ruta además, está acoplada también a la ruta del fotoperiodo, al menos de 2 modos. Por un lado, *GIGANTEA (GI)*, un gen clave en el control de los ritmos circadianos, y por lo tanto de los niveles de *CO*, participa en la regulación positiva de los niveles del miR172 (Jung et al., 2007), al igual que lo hace la ruta endógena de la edad, permitiendo que se expresen los genes *SPL* y se de la activación de *FUL*. Por otro lado, existen indicios de que *FUL*, podría participar de algún modo en la activación de *FT*, contribuyendo de este modo a disparar la transición floral en ausencia de un fotoperiodo inductivo (Wang et al., 2009). Aunque en *Arabidopsis* no se ha demostrado que *FUL* pueda activar a *FT*, en gramíneas parece ser el mecanismo adoptado en condiciones de respuesta al fotoperiodo y a la vernalización, donde el homólogo de *FUL*, *VRN1*, es necesario para activar al homólogo de *FT*, *VRN3* (Shimada et al., 2009). Aunque las transiciones florales de *Arabidopsis* y

de trigo difieren claramente, *FUL* mantiene un papel destacado en ambas especies. Posiblemente, en *Arabidopsis*, *FUL* haya adquirido más importancia relativa en procesos donde no existe un fotoperiodo inductivo, mientras que en condiciones donde sí existe este fotoperiodo inductivo parece no ser tan relevante, posiblemente debido a fenómenos de redundancia funcional con otros genes, como podrían ser *SOC1* y *AGL24*.

Modelo integrador del papel de *FUL* durante la transición floral.

En plantas anuales, como *Arabidopsis thaliana*, donde sólo existe un único ciclo reproductivo, podría resultar clave el efecto inductor de la floración mediado por *FUL*, principalmente cuando no se han encontrado condiciones óptimas durante el desarrollo. *FUL* percibiría las señales procedentes de la ruta endógena, incrementando su expresión. Una vez presente activaría la expresión de *SOC1*, tanto a través de una regulación directa, como a través de la supresión de efectos represores. *FUL* podría desplazar a *FLC* del dímero que forma con *SVP* cambiando su actividad y activando la expresión de *SOC1*, dando inicio a la transición V a I1 (Fig. 1-41).

Una vez *SOC1* estuviera presente, interaccionaría con *FUL* mediando la activación de *LFY* e iniciándose la transición I1 a I2 (Fig. 1-41). Al mismo tiempo, *FUL* podría mediar la represión de *SVP* y *FLC* observada durante el desarrollo de la inflorescencia (Fig. 1-41). Este efecto represor podría estar mediado, al igual que la activación de *LFY*, por el dímero *FUL-SOC1*, o por otros complejos en los que *FUL* estaría participando y que todavía no han sido identificados.

Este modelo explicaría el efecto de *FUL* durante todo el desarrollo inflorescente mediante la formación consecutiva de diferentes complejos proteicos. El balance entre los niveles de cada proteína podría establecer el tipo de dímeros existente en cada momento regulando así la transición de cada fase. De este modo, niveles elevados de *FLC* y *SVP* establecerían un desarrollo vegetativo, mientras que abundancia de *FUL* y *SOC1* determinarían un desarrollo floral. El equilibrio entre los niveles de estas proteínas durante el estado inicial y final podría establecer pues el desarrollo inflorescente, controlando el número de coflorescencias que presentaría la planta.

Posibles aplicaciones de interés económico.

Ya que *FUL* podría estar acoplado a la transición floral y los cambios de fase asociados a ella, podría resultar ser una herramienta de alto interés para modificar estos caracteres en especies de interés agronómico.

Puesto que *FUL* parece estar implicado en la transición entre las fases de desarrollo y la adquisición de ciertos caracteres adultos reproductivos, sería interesante testar si el incremento de los niveles de *FUL* podría reducir la etapa juvenil de ciertas especies agrícolas, durante la cual no son productivas. Esto podría resultar de interés en especies arbóreas como los cítricos, que presentan etapas juveniles muy largas.

Otra posible aplicación podría ser intentar modificar el desarrollo inflorescente de especies que presentaran patrones de desarrollo similares al de *Arabidopsis*, como podría ser la colza. El incremento en el número de hojas caulinares observado en la mutación *ful* va asociado a un incremento en el número de coflorescencias producidas por la planta. Puesto que en las coflorescencias también se producen flores/frutos, el incremento en coflorescencias se podría

traducir en un incremento de la producción de flores/frutos, sin la necesidad de incrementar la superficie cultivada ni el número de plantas a recolectar, contribuyendo a un mejor aprovechamiento de la superficie cultivada.

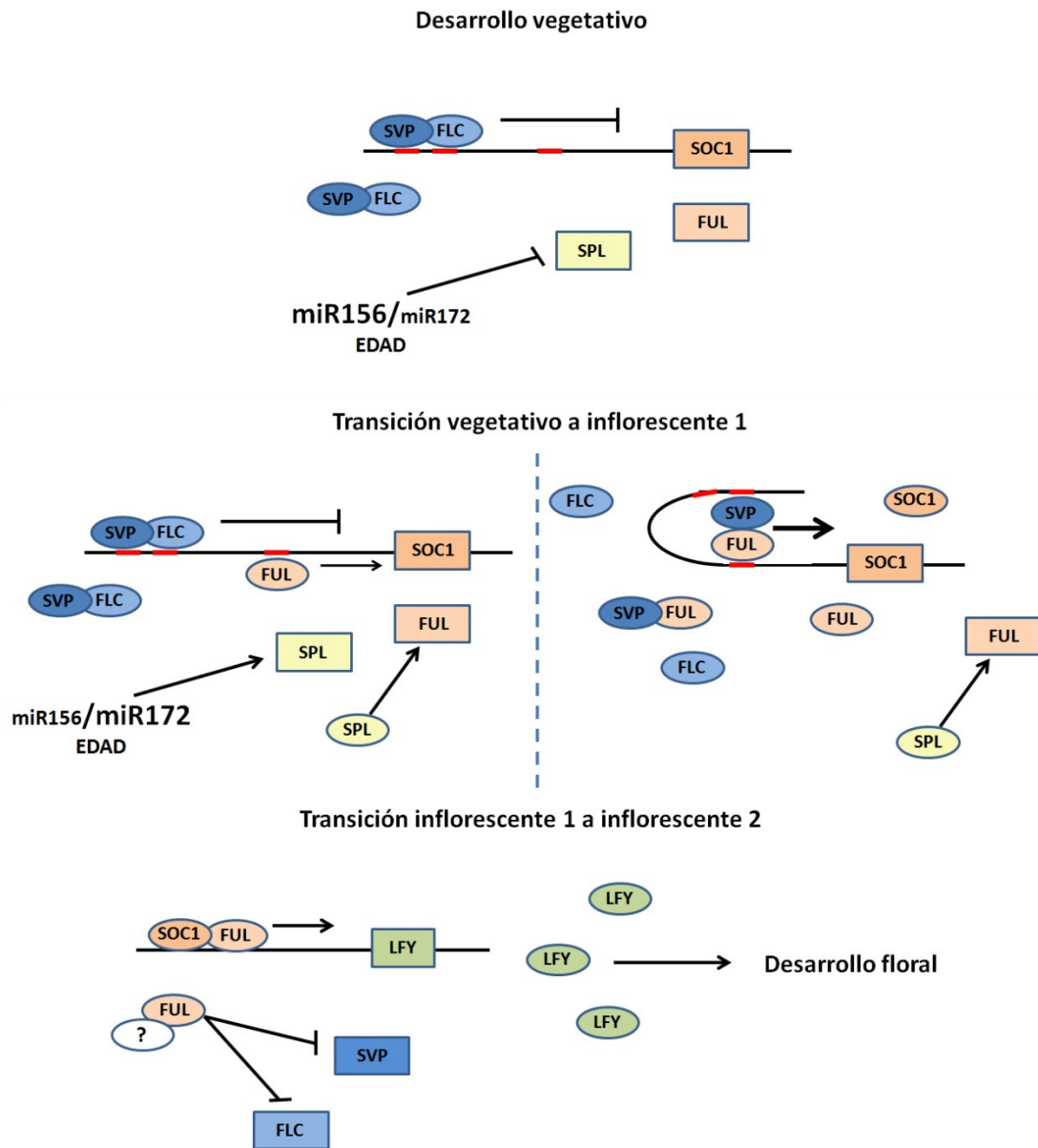


Figura 1-41: Mecanismo de acción de FUL durante la transición floral. En este modelo se muestran los posibles pasos de la transición floral regulados por *FUL*, así como el mecanismo de acción seguido. Durante la fase de desarrollo vegetativa, *FUL* está ausente, pero los niveles de *FLC* y *SVP* son elevados. El dímero formado por *FLC* y *SVP* actúa reprimiendo la expresión de algunos integradores de la transición floral como *FT* y *SOC1*. En condiciones de fotoperiodo no inductivo esta represión se mantiene durante largo tiempo, pero finalmente las plantas inician la transición floral debido a la actividad de otras rutas inductoras como la ruta endógena de la edad mediada por el balance entre los *miR156* y *172*. Esta ruta activa finalmente la expresión de *FUL*. Una vez aparece *FUL* se inicia la activación de *SOC1*. *FUL* activa la expresión de *SOC1* directamente, pero a su vez dimeriza con *SVP*, por lo que desplazaría a *FLC* del complejo que forma con *SVP*. El nuevo dímero *FUL-SVP* se comportaría como un activador de la expresión de *SOC1*, provocando un cambio estructural en el promotor de *SOC1* que podría a su vez impedir la unión de *FLC*. Este grupo de eventos establecería el inicio de la transición V a I1. Una vez apareciera *SOC1*, *FUL* y *SOC1* formarían un nuevo complejo que activaría la expresión del gen de identidad floral *LFY*. Al mismo tiempo *FUL* podría estar mediando la represión de *SVP* y *FLC* durante esta etapa junto a otros factores. Con la aparición de *LFY* se establecería el inicio de la transición I1 a I2, y la aparición de las flores. Los rectángulos indican genes mientras que los círculos representan a las proteínas.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

-*FUL* es un integrador de la transición floral, que resulta clave en la transición de ecotipos de hábito invernal donde los niveles de *FLC* son elevados.

-*FUL* regula los dos cambios de fase que tienen lugar durante la transición floral (V a I1 y I1 a I2) de forma diferente y en función de las condiciones de crecimiento. En condiciones favorables, como las de día largo, *FUL* participa básicamente en la transición I1 a I2, pero en condiciones desfavorables, como las de día corto, participa tanto en la transición V a I1 como en la I1 a I2.

-*FUL* media la transición I1 a I2 a través de la activación directa del gen de identidad de meristemo floral *LFY*.

-*FUL* participa en la transición V a I1 a través de la activación directa de otro integrador de la transición floral *SOC1*. Al mismo tiempo ambas proteínas son capaces de interactuar físicamente y unirse al promotor de *LFY*.

-EL efecto promotor de *FUL* en la transición floral depende de la presencia de *SVP*.

-*FUL* y *SVP* interactúan físicamente y se unen al promotor de *SOC1*

-*SVP* presenta un comportamiento dual en la transición floral, en función de los dímeros que forma. El dímero *SVP-FLC* reprime la expresión de *SOC1*. El dímero *SVP-FUL* puede presentar una actividad diferente y convertirse en un activador de la transición floral, activando la expresión de *SOC1*.

**CAPÍTULO 2: EL Papel de *FUL* en
el Control de la Longevidad en
*Arabidopsis Thaliana***

Introducción

El desarrollo en *Arabidopsis thaliana*

A diferencia del desarrollo animal, donde durante la embriogénesis se establecen y distribuyen todos los tejidos y órganos que conformarán el ser vivo adulto, el desarrollo de las plantas es básicamente post-embriionario. Durante el desarrollo embrionario de una planta se diferencian los principales tejidos que la formarán y se establece el eje de crecimiento que determinará el futuro desarrollo de la planta, a través de la diferenciación de dos estructuras: la radícula en la parte basal, y el hipocotilo y el/los cotiledón/es en la parte apical. En estos tejidos quedarán latentes un pequeño grupo de células indiferenciadas que tras la germinación darán lugar al desarrollo modular típico de la planta: los meristemas. En la parte apical del embrión, entre el/los cotiledón/es, encontramos el meristemo apical del tallo (SAM, del inglés Shoot Apical Meristem), que dará lugar al desarrollo de toda la parte aérea de la planta y en la parte basal del embrión, en el extremo distal de la radícula, encontramos el meristemo apical de la raíz, que dará lugar al desarrollo de toda la parte subterránea de la planta (Fig. 2-1) (Bowman, 1994; Weigel y Jürgens, 2002; Wolpert, 1998)

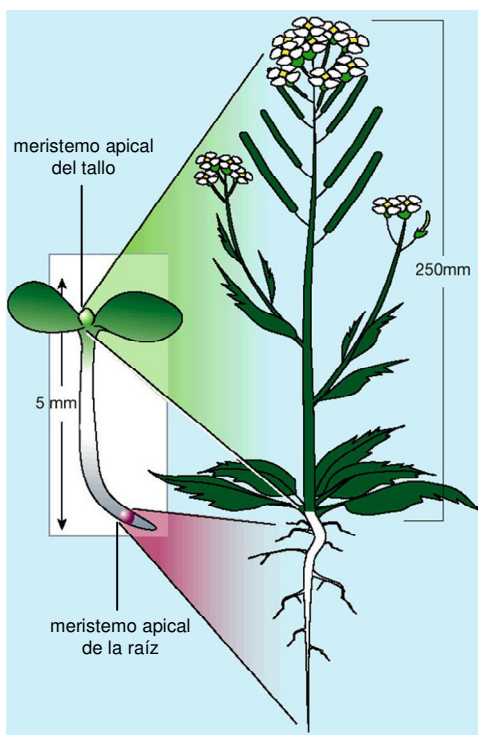


Figura 2-1. El desarrollo de las plantas es fundamentalmente post-embriionario. Tras la germinación se obtiene una plántula donde ya se observa la estructura básica de lo que será la morfología de la planta adulta. Esta morfología deriva de la actividad de los meristemas apical del tallo y apical de la raíz, que son establecidos durante la embriogénesis. Las escalas de la figura son aproximadas. Imagen de *Arabidopsis* modificada a partir de Weigel y Jürgens (2002).

Tras la germinación, se inicia el desarrollo de la planta. Los meristemas producen de forma sucesiva nuevos fitómeros, o unidades estructurales que se repiten y conformarán el cuerpo de la planta. Los fitómeros están constituidos por una hoja, un segmento de tallo y un meristemo axilar formado en la intersección de la hoja y el tallo. A lo largo de la vida de la planta, el SAM produce de forma sucesiva estos fitómeros, modificando su estructura en función de fase del desarrollo en la que se encuentre. En *Arabidopsis*, durante la fase vegetativa, el SAM produce hojas sin apenas elongación de los entrenudos; durante el desarrollo de la inflorescencia produce, primero, hojas con elongación de los entrenudos y después, flores, donde persiste la elongación de los entrenudos pero se suprime la formación

de la hoja y se activa el meristemo asociado a ella que constituirá el meristemo floral. Por todo esto, podemos decir que los meristemos presentan dos características esenciales: son capaces de mantenerse a sí mismos, manteniendo el grupo de células madre inicial, y son capaces de integrar todo tipo de estímulos, tanto ambientales como endógenos, que regulan las diferentes etapas de desarrollo de la planta.

Así, en la parte aérea de una planta de *Arabidopsis* adulta se pueden identificar diferentes meristemos:

Meristemo apical del tallo: originado durante la embriogénesis, y que genera todo el crecimiento de la planta. A excepción de los cotiledones, todos los órganos y estructuras presentes en la planta derivan de él. En *Arabidopsis* se considera que este meristemo es indeterminado, ya que continuamente está generando nuevos órganos.

Meristemos axilares: son meristemos derivados del SAM, que se forman en las axilas de las hojas. Cuando se generan están latentes y se activan posteriormente durante el desarrollo de la planta, comportándose igual que el SAM.

Meristemo floral: son meristemos derivados del SAM durante la segunda fase del desarrollo reproductivo y que dan lugar a las flores. Estos meristemos, a diferencia del resto, están determinados, y se agotan con el desarrollo floral.

Longevidad-hábito de vida

Al observar la naturaleza nos damos cuenta de la gran variedad de formas y tamaños que pueden adoptar las plantas, y de los diferentes hábitos de vida que desarrollan: podemos encontrar desde árboles con cientos de años, a plantas que completan su ciclo de vida en apenas unas semanas. Estas diferencias establecen lo que podemos denominar como hábito de vida de una especie. En función de su hábito de vida podemos clasificar, de un modo general, a las plantas en:

Plantas monocárpicas: son aquellas que solamente presentan un único evento de reproducción en su vida. Dentro de este grupo podemos diferenciar entre plantas anuales y bianuales. Las plantas anuales son aquellas plantas que solamente viven una temporada. La mayoría germinan, crecen y florecen durante la primavera y verano y producen sus semillas a finales de verano u otoño, asegurando así su continuidad para el próximo año. Tras la floración las plantas senescen y mueren, mientras que las plantas bianuales son aquellas que duran un par de temporadas. En la primera temporada solamente presentan desarrollo vegetativo. En la segunda inician el desarrollo floral, con la aparición de los frutos y la dispersión de las semillas. Al igual que las plantas anuales mueren tras la floración. Dentro de este grupo existen excepciones de especies que viven más años, como las especies del género *Agave*.

Plantas policárpicas: son plantas que viven más de dos temporadas, alternando desarrollo vegetativo y reproductivo cada temporada, y que por lo tanto, no mueren tras la floración. Estas plantas también se denominan policárpicas, ya que presentan varios eventos de reproducción en su vida.

El meristemo

El SAM se establece durante la embriogénesis y genera todos los órganos de la parte aérea de la planta, manteniendo su estructura y función a lo largo de toda la vida de la planta. A nivel estructural, el SAM está constituido por tres capas de células diferentes. Las dos capas de células más externas, la capa epidérmica, o L1, y la capa subepidérmica, o L2, que constituyen la denominada túnica, se dividen de forma paralela a la superficie del meristemo. La capa más interna, o L3, que se denomina corpus, presenta divisiones en todas las direcciones (Fig. 2-2) (Barton, 2010; Bowman y Eshed, 2000; Fletcher, 2002; Hobe et al., 2001). A partir de las células de la capa L1 se originará la epidermis de todos los órganos. A partir de las células de la capa L2 se formarán el mesodermo y las células germinales del polen y óvulos. A partir de la capa L3 se derivarán los tejidos vasculares de la planta.

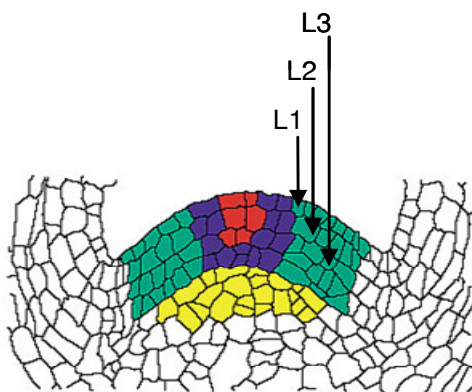


Figura 2-2. Organización histológica del meristemo apical del tallo. Las células de la zona central, en azul, se dividen lentamente. La población apical de células madre, en rojo, reside en la zona central. Las células de la zona periférica, en verde, se dividen más rápidamente e inician la formación de los primordios de los órganos. A partir de la zona medular, en amarillo, se inicia la diferenciación del tejido interno del tallo. Las flechas señalan la posición de las capas celulares L1, L2 y L3. Imagen modificada a partir de Haecker y Laux (2001).

A nivel funcional, el meristemo se puede dividir en tres zonas. La zona central es el lugar donde se encuentran las células madre iniciales (Steeves y Sussex, 1989). La zona central está formada por unas nueve células madre aproximadamente, tres por capa celular meristemática (Furner y Pumfrey, 1992; Irish y Sussex, 1992). Rodeando la zona central se encuentra la zona periférica, de donde se formarán los futuros órganos, mientras que por debajo de ella se encuentra la zona medular de donde se generará el tallo (Fig. 2-2) (Steeves y Sussex, 1989). Siguiendo esta división funcional, la zona central es una zona de baja actividad mitótica, mientras que la zona periférica y la zona medular son zonas de alta actividad, es decir, las células madres se dividen con poca frecuencia, pero sus descendientes, una vez incorporadas a otras zonas, se dividen rápidamente. Este hecho asegura la preservación de las células madres totipotentes, mientras que permite suplir el número de células destinadas a la formación de nuevos órganos (Bowman y Eshed, 2000; Hobe et al., 2001; Fletcher, 2002; Weigel y Jürgens, 2002). De este modo, el meristemo constituye una red celular dinámica que requiere una alta coordinación entre la diferenciación y la proliferación, en la que cada célula debe recibir información acerca de su posición relativa en cada momento en el meristemo (Barton, 2010).

Control genético de la formación y mantenimiento de los meristemos.

La regulación meristemática ha sido objeto de estudio intensivo durante los últimos 20 años, por lo que se dispone de una gran cantidad de información acerca de las rutas genéticas implicadas. Esta información procede en su mayoría de estudios realizados en *Arabidopsis*.

En la regulación de los meristemas, y de la población de sus células madre, se pueden considerar dos aspectos. Uno sería la regulación de su tamaño, que estaría altamente relacionado con la cantidad de células disponibles para la organogénesis y otro sería el mantenimiento, que estaría relacionado con la determinación del meristemo para dar una estructura concreta, como una flor, o con la parada de su actividad.

El nivel de regulación temporal permite diferenciar entre meristemas indeterminados, aquellos que nunca cesan de producir nuevos órganos, y determinados, aquellos que terminan en una estructura concreta agotando el contenido de células madre. En *Arabidopsis* se considera que el SAM de la inflorescencia es un meristemo indeterminado, ya que produce de forma continuada nuevos órganos hasta que la planta muere, pero en otras especies, como el tomate o tabaco, el SAM de la inflorescencia es determinado, y tras la producción de varias flores se determina, produciendo una flor (flor terminal) que agota las células madre del meristemo, provocando que el desarrollo continúe a partir de meristemas axilares

WUSCHEL (WUS) (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998) y *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* (Long et al., 1996) son dos genes clave para la correcta actividad y mantenimiento de los meristemas. *WUS* es un factor de transcripción con homeodominio característico de plantas (Haecker et al., 2004; Kieffer et al., 2006) perteneciente a la familia *WOX (WUSCHEL-like homeobox)* mientras que *STM* también es un factor de transcripción con homeodominio pero perteneciente a la familia *KNOX (Knotted1-like homeobox)*, que presentan gran similitud con los factores de transcripción con homeodominio tipo TALE de animales (Hake et al., 1995). *WUS* se expresa en un pequeño dominio justo por debajo de la población de células madre, siendo necesario para su mantenimiento, mientras que *STM* se expresa más ampliamente, ocupando todo el meristemo, encargándose de mantener a las células del meristemo en un estado desdiferenciado (Lenhard et al., 2002), asegurando así que se dividan el número de veces necesario antes de iniciar la organogénesis. La expresión de *STM* desaparece en los primordios laterales que darán lugar a órganos diferenciados (Long et al., 1996). La pérdida de función de estos genes genera la desaparición de los meristemas (Laux et al., 1996; Long et al., 1996).

La regulación espacial de *WUS*, y en consecuencia del tamaño de la población de las células madre del meristemo, está controlada a través de la conocida ruta *CLAVATA (CLV)*. En esta ruta participan diferentes tipos de proteínas. *CLV3* es un gen que codifica un pequeño glicopéptido extracelular que producen las células madre meristemáticas (Fletcher et al., 1999; Ohyama et al., 2009). *CLV3* funciona como una molécula de señalización que es percibida por complejos receptores de membrana tipo *LRRRK (Leucine Rich Repeat Receptor Kinase)* (Brand et al., 2000; Ogawa et al., 2008) formados por las proteínas *CLV1, CLV2* y *CORYNE (CRN)* (Clark et al., 1997; Jeong et al., 1999; Muller et al., 2008) localizados en las capas celulares L2 y L3 del meristemo. Estos complejos, tras la percepción de *CLV3*, inician la transducción de una señal que finaliza en la represión transcripcional de *WUS*. Por otro lado, *WUS* induce la expresión de *CLV3* de forma no autónoma celular (Brand et al., 2000), mediante un mecanismo todavía no bien conocido. Así se produce una retroalimentación entre la activación de *CLV3* por *WUS* y la represión de éste por la ruta *CLV* que mantiene los niveles de *WUS* controlados espacialmente (Fig. 2-3). Además de esta ruta, también se ha propuesto que otras proteínas participan en la regulación de la actividad de las células madre de los meristemas, como proteínas de

reparación del DNA y de remodelación de la cromatina (Han et al., 2008; Kwon et al., 2005; Saiga et al., 2008; Yadav et al., 2009).

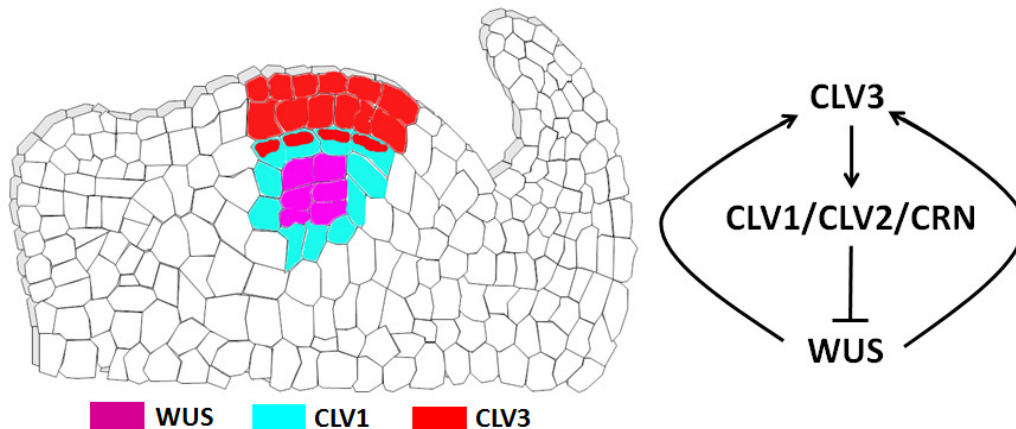


Figura 2-3: Ruta CLV. En el modelo se representan los patrones de expresión de los diferentes componentes de la ruta CLV en el SAM. *WUS* se expresa en el centro del SAM justo por debajo de la capa L3. Tanto *CLV1* (mostrado en el modelo) como *CLV2* y *CRN* se expresan en las capas L2 y L3, mientras que *CLV3* se expresa en las capas L1, L2 y L3. Esta ruta determina un ciclo de retroalimentación entre *CLV3* y *WUS*. Por un lado *WUS* estimula la expresión de *CLV3* de una forma no autónoma celular. Por otro lado *CLV3*, al ser percibido por los complejos formados por *CLV1/CLV2/CRN*, desencadena una señal que dirige la represión de *WUS*.

La determinación también depende de la regulación de *WUS*, produciéndose, en última instancia, su completa represión en los meristemos determinados. Este tipo de regulación se observa en los meristemos florales, que terminan en una estructura concreta, el carpelo y pierden su capacidad de mantenerse en el tiempo. En este proceso es clave el factor de transcripción homeótico *AG*, y el ciclo de retroalimentación negativo que establece con *WUS*. En las flores del mutante *ag*, los órganos reproductivos, estambres y carpelos, pierden su identidad y se transforman en pétalos, pero además, se observa la pérdida de la determinación del meristemo floral (Mizukami y Ma, 1995; Yanofsky et al., 1990). Los meristemos florales del mutante *ag*, tras la producción de los cuatro verticilos típicos de las flores, vuelven a generar flores de forma reiterativa e indefinida, por lo que *AG* media la terminación del meristemo floral. *WUS* se expresa en el centro de los meristemos florales y junto con el factor de transcripción *LFY*, un gen de identidad de meristemo floral, activan directamente la expresión de *AG* en esta zona, durante el estadio 3 del desarrollo floral según (Smyth et al., 1990) (Fig. 2-4). Una vez *AG* está presente, se especifican los primordios de los estambres y carpelos, que consumirán las células meristemáticas existentes, a la vez que se produce la represión de *WUS* mediada por *AG*, cuando se inicia la formación de los carpelos (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001; Prunet et al., 2009). La represión de *WUS* por *AG* no es directa, ya que esta mediada por el factor de transcripción de dedos de zinc tipo C2H2 *KNUCKLES (KNU)* (Payne et al., 2004; Sun et al., 2009), cuya expresión se detecta en el meristemo floral justo en el estadio 6, coincidiendo con la represión de *WUS* (Payne et al., 2004) (Fig. 2-4). *AG* se une al promotor de *KNU* y media su activación, aunque no de forma inmediata. El promotor de *KNU* presenta numerosas marcas represivas de la cromatina, que disminuyen con la unión de *AG* a éste, facilitando su expresión tras un evento de mitosis. Finalmente *KNU* reprime la expresión de *WUS* en el centro del meristemo floral (Sun et al., 2009) (Fig. 2-4).

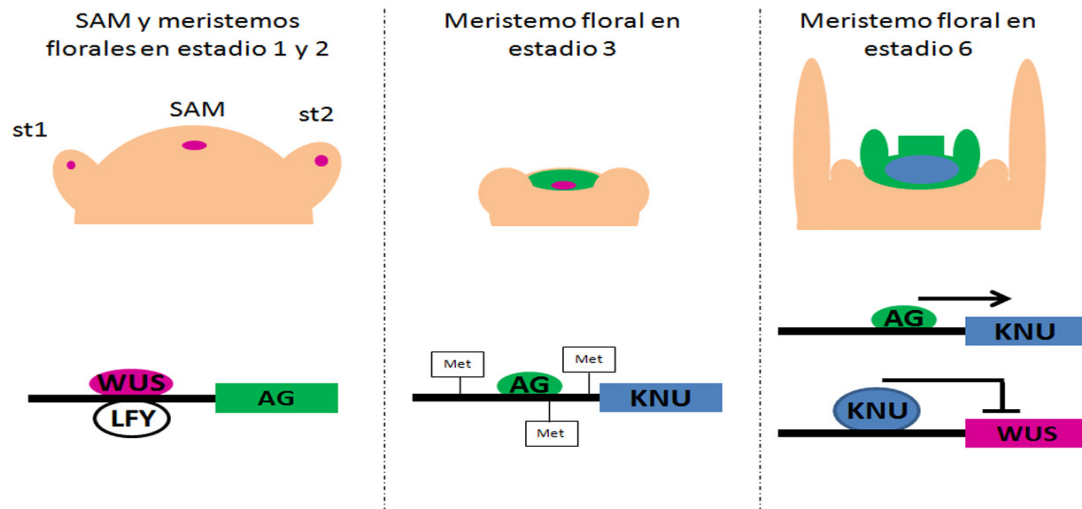


Figura 2-4: Ruta AG. Tras el establecimiento del meristemo floral, la acción conjunta de LFY y WUS, activan la expresión de AG durante el estadio 3 del desarrollo floral. AG se une al promotor de *KNU*. Este promotor posee gran cantidad de marcas represivas epigenéticas que impiden su transcripción. La unión de AG promueve la eliminación de estas marcas, provocando que se inicie su expresión durante el estadio 6 de desarrollo floral. *KNU* se une al promotor de *WUS* reprimiendo entonces su expresión, permitiendo la terminación del meristemo floral.

Además de esta ruta, se han propuesto otros genes que participan en el control de la terminación de los meristemas florales, y muchos de ellos lo hacen contribuyendo a que se establezcan los niveles de expresión adecuados de AG. Entre estos otros genes encontramos diversos tipos de proteínas que actúan de forma redundante en el control de la determinación del meristemo floral, como *CRABS CLAW (CRC)*, un factor de transcripción perteneciente a la familia YABBY (Alvarez y Smyth, 1999; Bowman y Smyth, 1999), *SPATULA (SPT)*, un factor de transcripción bHLH (Alvarez y Smyth, 1999; Heisler et al., 2001), *SQUINT (SQT)*, una ciclofilina (Berardini et al., 2001; Prunet et al., 2008), *ULTRAPETALA1 (ULT1)*, una proteína con dominio SAND (Carles et al., 2005; Carles y Fletcher, 2009) o *SUPERMAN (SUP)*, un factor de transcripción similar a *KNU* (Bowman et al., 1992; Schultz et al., 1991), que aunque aparentemente no afecte a la expresión de AG (Bowman et al., 1992), se ha propuesto que podría actuar de dos modos, impidiendo que AG forme los complejos adecuados para la represión de *WUS* y reprimiendo la proliferación de las células meristemáticas (Lohmann et al., 2001; Prunet et al., 2008; Sakai et al., 1995; Yun et al., 2002).

AP2, otro factor de transcripción también relacionado con el desarrollo floral (Drews et al., 1991), ha sido propuesto recientemente como un regulador de *WUS*. La función reguladora caracterizada durante el desarrollo floral para *AP2* es la de, junto a *AP1*, conferir la identidad a los órganos florales externos, sépalos y pétalos (Bowman et al., 1991; Drews et al., 1991; Okamoto et al., 1997). A su vez, existe una relación antagonista entre *AP2* y AG, de modo que *AP2* restringe la expresión de AG a los dominios internos del meristemo floral, mientras que AG, restringe la expresión de *AP2* a los dominios externos (Bowman et al., 1991; Drews et al., 1991). *AP2* está regulado por el miR172, que actúa sobre el RNA mensajero de *AP2* de dos modos, mediando su degradación (Chen, 2004; Kasschau et al., 2003), y/o impidiendo su traducción (Aukerman y Sakai, 2003). Además de su papel en la especificación de sépalos y pétalos, la identificación de una mutación dominante negativa en *AP2* mostró que este factor de transcripción participa en el control de los niveles de *WUS* en el SAM, y que posiblemente

actúa regulando el ciclo de retroalimentación entre WUS-CLV3, favoreciendo la expresión de WUS (Wurschum et al., 2006). AP2 podría modular también la terminación del meristemo floral mediante su papel en la regulación de AG. Cuando se expresan versiones de la proteína resistentes al miR172 se observan fuertes fenotipos de indeterminación en las flores, con la producción de numerosos estambres adicionales que aparecen en una filotaxis en espiral, y el mantenimiento de forma indefinida de la actividad meristemática (Zhao et al., 2007), por lo que la regulación de AP2 por el miR172 en los meristemos florales parece ser un paso clave para el control de la determinación floral (Fig. 3-5).

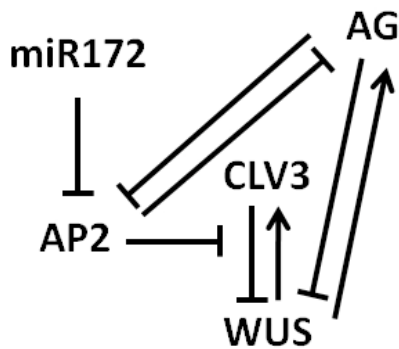


Figura 3-5: AP2 como controlador de la actividad meristemática. AP2 puede regular los niveles de WUS de dos modos, bien modulando el ciclo de retroalimentación existente entre CLV3 y WUS, bien limitando la expresión de AG. Ambos mecanismos de acción acaban favoreciendo la expresión de WUS. Tanto AG como el miR172 regulan los niveles de AP2, de modo que ejercen un efecto contrario sobre los niveles de WUS.

El papel de las hormonas en la función de los meristemos.

La actividad de las proteínas WUS y STM, claves para el mantenimiento de los meristemos, está altamente relacionada con los niveles de tres hormonas vegetales, giberelinas (GAs), citoquininas (CK) y auxinas (Aux). Estas hormonas juegan un papel muy importante en la regulación de los meristemos. Está establecido que las GA promueven la elongación celular, un rasgo característico de células diferenciadas, mientras que las CK promueven la división celular, un rasgo característico de células indiferenciadas (Shani et al., 2006). En los meristemos, pues, los niveles de GA son bajos, mientras que los niveles de CK son altos. Esto se debe en parte a la acción de STM, que reprime la expresión de la *GIBBERELLIN 20-OXIDASE* (*GA20ox*) (Jasinski et al., 2005), un gen implicado en la biosíntesis de GA activas, y a la vez, activa la expresión de *ISOPENTENYLTRANSFERASE* (*IPT*) (Yanai et al., 2005), un gen implicado en la síntesis de CK.

La acumulación local de auxinas en la periferia del meristemo está favorecida por la acción de STM, contribuyendo a la formación de zonas con máximos de Aux donde se desarrollaran los nuevos órganos (Barkoulas et al., 2008; Heisler et al., 2005; Reinhardt et al., 2003). A su vez los máximos de Aux promueven la represión de STM (Barkoulas et al., 2008; Byrne et al., 2000; Hay y Tsiantis, 2006; Ori et al., 2000) y el incremento en los niveles de giberelinas (Jasinski et al., 2005; Yanai et al., 2005).

Las CK, por su parte, son esenciales para el mantenimiento de la actividad meristemática y la división celular (Kurakawa et al., 2007; Riou-Khamlichi et al., 1999), y promueven la expresión de STM (Kurakawa et al., 2007; Rupp et al., 1999) y de WUS (Gordon et al., 2009; Lindsay et al., 2006). WUS, además, actúa generando una zona de alta respuesta o sensibilidad a CK. Esto lo

hace al reprimir directamente la expresión de varios *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* de tipo A (*ARR-A*), *ARR7* y *ARR15* (Leibfried et al., 2005; Zhao et al., 2010), que actúan reprimiendo la señalización de las CK (To et al., 2004).

Estos mismos genes *ARR-A* están también regulados por Aux, en concreto a través de *MONOPTEROS/AUXIN RESPONS FACTOR 5*, que reprime su expresión (Zhao et al, 2010), y que al igual que *WUS*, participaría en la generación de una zona de alta sensibilidad a CK en el meristemo (FIG.2-6).

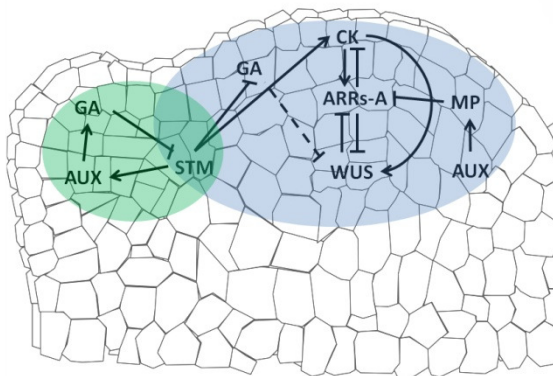


Figura 2-6: Las hormonas en el control y mantenimiento de los meristemos. Las principales hormonas implicadas en el mantenimiento meristemático son las CK, las GA y las Aux. Las CK son claves en el mantenimiento del nicho de células madres y de los niveles de *WUS*. A su vez *WUS* propicia un entorno de alta sensibilidad a las CK al reprimir ciertos genes *ARRs* tipo A que actúan reprimiendo la señalización de las CK. *STM* participa promoviendo que existan altos niveles de CK y reprimiendo la expresión de la síntesis de GA, por lo que en el SAM, los niveles son bajos. *STM* a su vez participa en la generación de máximos de auxina en la periferia del SAM. Cuando se

ha generado el máximo de auxinas, éstas estimulan la producción de las GA, que reprimen la expresión de *STM* y la actividad meristemática, permitiendo la formación de un nuevo órgano. Las Aux presente en el SAM, en las zonas en las que no generan máximos, participan en la generación de un ambiente de alta sensibilidad a las CK, al igual que *WUS*, favoreciendo la actividad meristemática.

También se ha propuesto que en la terminación de los meristemos florales mediada por *AG* podrían participar, de algún modo, las giberelinas, que se supone que antagonizan la actividad meristemática (Shani et al., 2006), ya que uno de los primeros genes que responden a la activación de *AG* es la *GIBBERELLIN 3 BETA-HYDROXILASE 1* (Gomez-Mena et al., 2005), que cataliza el último paso de síntesis de esta hormona.

Regulación meristemática en especies con hábito de vida anual: especies monocárpicas.

A pesar de que el hábito de vida establece grandes diferencias entre las diferentes especies, como la morfología, el tamaño o la estrategia de reproducción, y que muchos de estos caracteres son de gran interés agronómico, poco se sabe de los mecanismos genéticos y moleculares que controlan estas diferencias. Una característica diferencial entre especies con hábitos de vida diferentes es la actividad de sus meristemos. De este modo, una especie perenne presenta un SAM que alterna estadios activos e inactivos durante toda su vida mientras que una especie anual o bianual presenta un SAM que se determina o se agota en un momento concreto.

Arabidopsis es una planta herbácea anual, cuyo SAM presenta un comportamiento indeterminado, produciendo órganos nuevos hasta el momento en el que senesce o muere. El SAM de la inflorescencia principal de *Arabidopsis* detiene su actividad tras la producción de un número predecible de flores/frutos (siempre que se cultivan en unas condiciones similares). Cuando se produce la parada o cese de la actividad del SAM de la inflorescencia principal, ocurre también, en un plazo de unas 24 horas, la parada de todos los meristemos presentes en

los ejes secundarios de la inflorescencia, por lo que este evento se denominó paro de la proliferación global, al que nos referiremos como GPA (del inglés Global Proliferative Arrest) (Hensel et al., 1994) (Fig. 2-7). Este carácter tiene interés agronómico, puesto que muchas de las especies cultivadas, al ser plantas monocárpicas, desarrollan este proceso, que acaba con la etapa productiva de la planta.

Los mecanismos que controlan el GPA son poco conocidos. La mayoría de los estudios realizados sobre esta etapa del desarrollo se han realizado en *Arabidopsis*, soja y otras plantas a partir de los cuales se propusieron diferentes explicaciones para este proceso, como la existencia de relaciones fuente-sumidero con sustancias o nutrientes entre los tejidos somáticos y reproductivos (Hildebrand, 1881 ; Kelly y Davies, 1988), la posible participación de las hormonas conocidas (Noodén y Leopold, 1988), o alguna hormona “de la muerte” no identificada hasta el momento (Engvild, 1989), pero nunca se han ratificado o refutado satisfactoriamente.



Figura 2-7: Global Proliferative Arrest (GPA). En la foto de la izquierda (adaptada de Bleecker y Patterson, 1997) se puede observar el meristemo de una inflorescencia de *Arabidopsis* antes del GPA (A) y tras el GPA (B). En mutantes estériles o en aquellos que producen menos del 30% de las semillas que produce un fruto silvestre, se retrasa el GPA del SAM, que sigue proliferando hasta generar una estructura terminal carpelar que agota el meristemo (C).

Se ha observado una relación importante entre el GPA y la producción de semillas (Hensel et al., 1994). En *Arabidopsis*, Hensel y colaboradores observaron que los mutantes estériles o con una fertilidad reducida tenían alterado el GPA (Hensel et al., 1994). En estos casos, el SAM retrasa el GPA y continúa produciendo flores durante más tiempo que las plantas silvestres, para terminar con su actividad al determinarse en una estructura terminal de carácter carpelar (Hensel et al., 1994) (Fig. 7). Estos resultados también se observaron cuando se eliminaban quirúrgicamente las flores producidas por el SAM de plantas silvestres, indicando que esta respuesta no dependía de las mutaciones testadas, si no de la producción de semillas de esas plantas (Hensel et al., 1994). Este estudio establecía que defectos en la fertilidad que provocan que el fruto sólo produzca un 30-40% de las semillas que se desarrollan en el silvestre presentan alteraciones en el GPA, incrementando el número de flores producidas y agotando el SAM con la producción de una estructura terminal floral (Hensel et al., 1994). El GPA, a su vez, parecía no estar afectado en mutantes con defectos en la señalización hormonal ni tener relación clara y directa con mutaciones que afectaban a la biomasa de la planta, como por ejemplo mutaciones que afectan al tiempo de foración (Hensel et al., 1994).

Con los trabajos realizados hasta la fecha, el único efecto regulador sobre este proceso demostrado sería la ausencia de semillas del fruto (Hensel et al., 1994), aunque el mecanismo por el que se percibe en el SAM es todavía una incógnita. Por otro lado, los mismos autores que realizaron estos trabajos observaron que debía existir también un control genético del GPA, puesto que el momento en el que ocurre en diferentes ecotipos de *Arabidopsis* es distinto y característico de cada uno de ellos, aunque hasta la fecha no se ha identificado ningún mutante que afecte a este proceso sin que presente defectos severos en la fertilidad.

Antecedentes

FUL se expresa en todos los meristemas de la inflorescencia, tanto en el SAM como en los meristemas florales, y se han propuesto funciones independientes para *FUL* en cada tipo de meristemo.

Su expresión en el SAM se ha relacionado con un papel promotor de la transición floral (ver capítulo 1), mientras que en los meristemas florales se ha propuesto que *FUL* puede actuar confiriéndoles identidad como tal (Ferrándiz et al., 2000a). Esta última función sólo es atribuible a *FUL* en ausencia de *AP1* ya que *FUL* se expresa ectópicamente en todo el meristemo floral de los mutantes *ap1* (Mandel y Yanofsky, 1995). En las plantas silvestres, *FUL* se expresa únicamente en el centro del meristemo floral, apareciendo durante el estadio 3 del desarrollo floral (Gu et al., 1998; Mandel y Yanofsky, 1995), cuando ya se ha adquirido la identidad de meristemo floral. Estos datos indican que si bien *FUL* puede reemplazar parcialmente la función de *AP1*, su verdadera función durante esta etapa del desarrollo floral podría ser otra.

Además, aunque *FUL* pudiera estar ejerciendo funciones independientes en cada uno de de estos tipos de meristemas, también cabe la posibilidad de que estuviera ejerciendo una función común en ambos. La expresión de *FUL* en el SAM y en el meristemo floral solapa con el lugar de expresión de genes clave para el mantenimiento meristemático, como el gen *WUS*, presente en ambos meristemas, o el gen *AG*, presente sólo en el meristemo floral, lo cual sugiere un posible papel de *FUL* en la función del meristemo.

Objetivos

El objetivo general de este capítulo de tesis es identificar y caracterizar posibles funciones comunes desempeñadas por *FUL* en el SAM y los meristemos florales de *Arabidopsis*, para lo que se han marcado los siguientes objetivos concretos:

-Caracterizar detalladamente los posibles fenotipos asociados a la función de los meristemos en el mutante *ful*, así como en una línea que presenta la actividad de *FUL* modificada (*pFUL::FUL:VP16*).

-Caracterizar la expresión del gen *WUS* en el fondo mutante *ful* y la línea *FUL:VP16*.

-Generar y caracterizar combinaciones génicas entre el mutante *ful* y la línea *FUL:VP16* con diferentes mutantes que presentan alteraciones en la función de los meristemos.

-Determinar las interacciones genéticas y moleculares de *FUL* con otros genes implicados en la regulación de la función del meristemo mediante:

la caracterización de las interacciones entre *FUL* y mutantes de rutas conocidas que afectan a la regulación de *WUS*,

la identificación de nuevos factores implicados junto con *FUL* en la regulación de *WUS*,

y la determinación de posibles mecanismos moleculares de acción de *FUL* en este procesos.

-Caracterizar la relación existente entre *FUL* y los genes identificados en el objetivo anterior, mediante ensayos de expresión y ChIP (Chromatine InmunoPrecipitation).

Resultados

Las mutaciones en *FUL* provocan un incremento en la longevidad de *Arabidopsis thaliana*.

Para estudiar el posible papel de *FUL* en la función de los meristemos decidimos caracterizar los posibles fenotipos del mutante *ful* en este contexto. Durante las etapas de desarrollo iniciales de estas plantas no se apreciaron diferencias no descritas previamente. Del mismo modo, durante el desarrollo inicial de las inflorescencias tampoco se observó ningún fenotipo relacionado con la actividad meristemática ni en el meristemo floral ni en el inflorescente. Sin embargo, al dejar que estas plantas completaran su desarrollo, se observó que mientras las plantas silvestres sufrían el GPA (Hensel et al., 1994) a las 4 semanas de haber iniciado el desarrollo de la inflorescencia, las plantas *ful* continuaban creciendo y produciendo flores durante al menos 4 semanas más, terminando su crecimiento de un modo similar a las plantas silvestres (Fig. 2-8 A y C). Además los meristemos de las inflorescencias secundarias continuaron produciendo flores durante varios días más tras la parada del SAM de la inflorescencia principal, lo que contrastaba con los de las plantas silvestres, donde todos los SAM sufrían el GPA al mismo tiempo (Hensel et al., 1994). Este mismo experimento se repitió con el alelo *ful-1*, que se encuentra en otro ecotipo (*L.er.*), obteniéndose un resultado similar (Fig. 2-8 B y D). En estos experimentos las plantas *ful* siempre presentaban un porte más alto y una mayor cantidad de frutos que los alelos silvestres (Fig. 2-8 A y B, Fig. 2-9A).

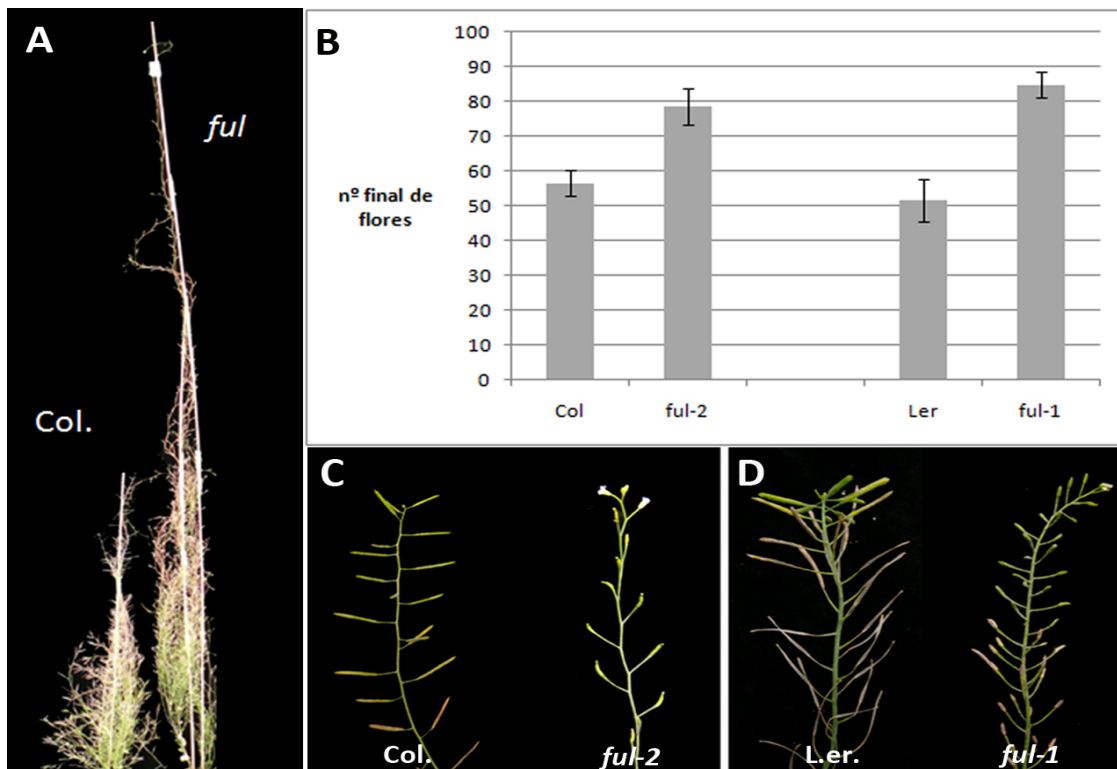


Figura 2-8: Las mutaciones *ful* producen un mayor número de flores en *Arabidopsis*. Aspecto de una plantas silvestres del ecotipo Columbia y un mutante *ful-2* al final de su vida (A), donde se observa la diferencia de altura entre las plantas. Las mutaciones en el gen *FUL* incrementan el número de flores producidas por la inflorescencia principal, independientemente del ecotipo en el que se encuentren. Tanto *ful-2* como *ful-1* incrementan el número de flores producidas en su inflorescencia principal al compararse con sus respectivas líneas silvestres, Columbia y Landsberg *erecta* (B), ya que los SAM de ambos mutantes, *ful-2* (C) y *ful-1* (D) están activos durante más tiempo.

Para determinar si las diferencias observadas en el número de flores producidas y porte de las plantas se debía a un ritmo diferente en la producción de las flores o a una mayor longevidad del SAM, decidimos realizar un seguimiento más detallado del desarrollo de la inflorescencia, anotando la cantidad de flores producidas por el SAM en el mutante *ful* y las plantas silvestres semanalmente. Cuando se comparó la producción de flores entre las plantas *ful-2* y las silvestres no se observaron grandes diferencias entre ellas durante las semanas iniciales (Fig. 2-9 A). Las diferencias aparecieron a partir de la cuarta semana tras la producción de la primera flor, justo en el momento en que las plantas silvestres entraban en el GPA. En ese momento en el que las plantas silvestres dejaron de producir flores, las plantas *ful* continuaron produciendo flores durante 4-6 semanas más antes de desarrollar el GPA. Al final del experimento las plantas silvestres habían producido una media de $56,5 \pm 3,8$ flores en su inflorescencia principal, mientras que las plantas *ful-2* produjeron una media de $78,5 \pm 5,2$ (Fig. 2-8 B, Fig. 2-9 A). Al mismo tiempo se tomaron muestras de los SAM para su observación en un microscopio electrónico de barrido (SEM) y determinar si existían diferencias de tamaño o forma de los meristemas. Los SAM de las plantas silvestres y el de las plantas *ful-2* presentaron un aspecto similar a lo largo del desarrollo de la inflorescencia (Fig. 2-9 B). El tamaño del SAM disminuyó progresivamente en ambas líneas, pero cuando el meristemo de las plantas silvestres se detuvo, el de las plantas *ful-2* continuó produciendo flores, reteniendo siempre un pequeño SAM que se mantenía activo (Fig. 2-9 B).

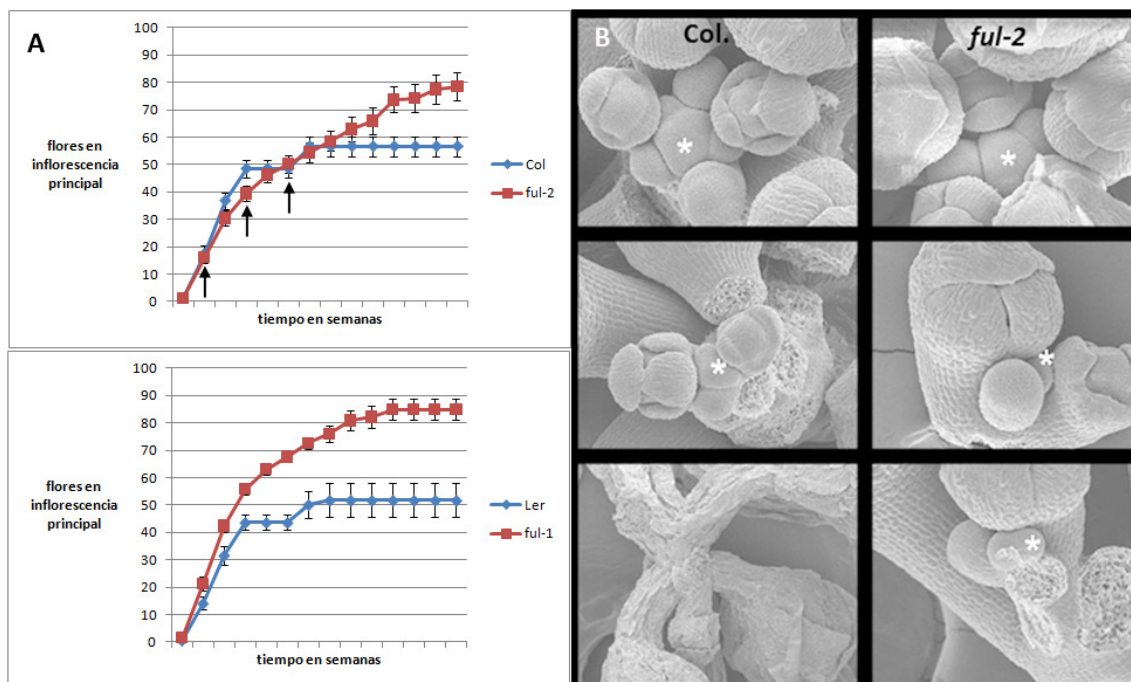


Figura 2-9: El meristemo del mutante *ful* permanece activo más tiempo. El SAM de las plantas silvestres y los mutantes *ful-2* (A arriba) y *ful-1* (A abajo) producen flores a una tasa similar. Una inspección minuciosa de estos SAM (B) desvela que los SAM de las plantas silvestres (B izquierda, silvestre Columbia) y las plantas mutantes (B derecha, *ful-2*) se comportan de un modo similar en el tiempo. En las etapas iniciales ambos SAM presentan un aspecto idéntico (B arriba). Con el desarrollo de la inflorescencia, estos SAM van disminuyendo su tamaño (B centro), pero en estadios posteriores de desarrollo, cuando los SAM de las plantas silvestres se detienen y mueren (B bajo-izquierda), los mutantes *ful* continúan reteniendo un pequeño SAM activo (B bajo-derecha). Las flechas en A indican el momento en el que se tomaron los ápices observados al SEM, 2 (B arriba), 4 (B centro), y 7 semanas (C abajo) después del alzado de la inflorescencia.

En ocasiones, los meristemos de las plantas silvestres, tras el GPA, reiniciaron su actividad, produciendo unas pocas flores más, para después volver a detenerse (Fig. 2-9 A) (Hensel et al., 1994). Este suceso nunca se observó en el mutante *ful*.

Se ha descrito una correlación entre la producción de semillas y el momento en el que ocurre el GPA (Hensel et al., 1994). Ya que las mutaciones *ful* producen defectos severos en el desarrollo del fruto, y esto puede originar una disminución del número de semillas en estos, decidimos establecer el número de semillas que producía el mutante *ful-2*. El mutante *ful-2* produjo una media de $42,9 \pm 4,4$ semillas por fruto, frente a las $60,7 \pm 1,9$ de media que produjeron las plantas silvestres (Fig. 2-10), lo que suponía una producción de alrededor del 62% respecto a los frutos silvestres. Se ha descrito que cuando los frutos producen un número de semillas inferior al 30-40% de las que produce un fruto silvestre, se originan retrasos en el GPA, incrementándose el número de frutos producidos por la inflorescencia (Hensel et al., 1994). De este modo, la disminución en el número de semillas observado en el mutante *ful-2* no debería afectar al GPA. Para asegurarnos que el retraso en el GPA observado en el mutante *ful* no se debía al efecto en la reducción del número de semillas en nuestras condiciones de crecimiento, decidimos comparar la producción de frutos entre plantas silvestres, el mutante *ful* y el mutante *hec3*, que presenta defectos leves en la fertilidad (Gremski et al., 2007). El mutante *hec3* tuvo una producción de semillas similar a la de *ful-2*, con una media de $37,8 \pm 3,2$ (Fig. 2-10), también superior al límite establecido por Hensel y col. (1994). En este experimento, las plantas silvestres y el mutante *hec3*, tras haber desarrollado el GPA, habían producido un número de frutos similar, produciendo una media de $44,2 \pm 3,5$ y $45,3 \pm 3,5$ frutos respectivamente, mientras que las plantas *ful-2* habían producido una media de $63,5 \pm 5,6$ frutos (Fig. 2-10) en el momento que se detuvo el experimento.

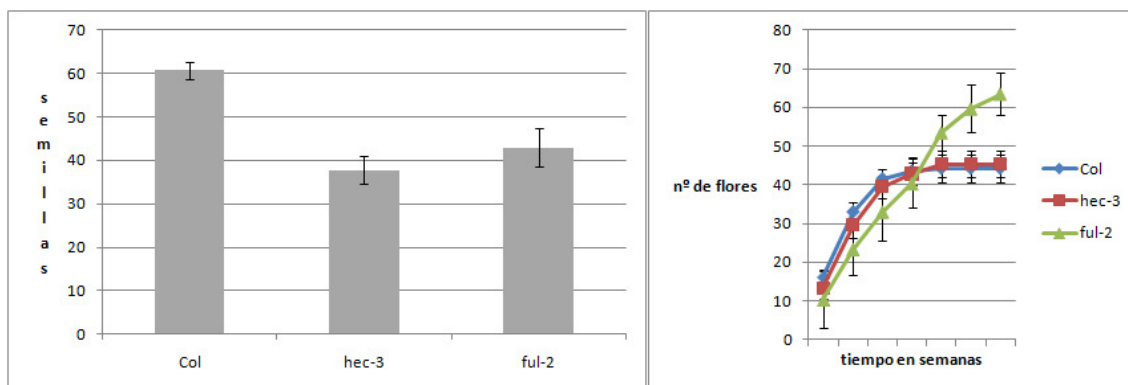


Figura 2-10: El retraso en el GPA en *ful* no se debe a la reducción del número de semillas que produce. Los frutos de las plantas silvestres generaron una media de 60 semillas por fruto, mientras que los mutantes *hec3* y *ful* presentaron una producción media de 38 y 43 semillas por fruto respectivamente (izquierda). A pesar de presentar una menor cantidad de semillas que las plantas silvestres, el mutante *hec3* produjo el mismo número de flores en la inflorescencia principal que las plantas silvestres (derecha), mientras que el mutante *ful* no desarrolló el GPA y continuó produciendo flores (derecha).

Estos datos mostraban que el SAM del mutante *ful* estaba activo durante más tiempo que el del silvestre, por lo que FUL podría, de algún modo, estar regulando su actividad y la parada que éste experimenta al final de la etapa reproductiva en las plantas silvestres. Además, estos resultados indican que FUL podría estar controlando el GPA de forma independiente a como lo hace la baja fertilidad, siendo el único mutante descrito hasta la fecha que afecte el GPA sin presentar defectos importantes en la fertilidad.

El mutante *ful* suprime la estructura terminal típica de los mutantes estériles en *Arabidopsis thaliana*.

Los SAM de plantas que presentan esterilidad o deficiencias severas en el número de semillas producidas, además del incremento del número de flores que producen, no se agotan del mismo modo que las plantas silvestres en el momento del GPA, si no que acaban en una estructura terminal de carácter carpelar (Hensel et al., 1994). El mutante *ful* nunca mostró la estructura terminal asociada a plantas estériles o deficientes en semillas. Puesto que el mutante *ful* retrasaba el GPA, decidimos testar como sería la respuesta del mutante *ful* en condiciones de esterilidad. Para ello se comparó el número de flores iniciadas por el SAM en la inflorescencia principal de plantas silvestres y mutantes *ful* a las cuales se les eliminaron de forma continuada las flores producidas por el SAM antes de que se iniciara el desarrollo de los frutos. La eliminación de las flores en las plantas silvestres provoca un efecto similar al observado en plantas estériles, retrasándose el GPA e incrementando el número de flores producidas, para finalmente agotar el SAM en una estructura carpelar terminal (Hensel et al., 1994). Este experimento mostró que tanto las plantas silvestres como el mutante *ful* generaban más flores cuando éstas eran podadas ($56,5 \pm 3,8$ flores de media en las plantas silvestres frente a las $70,2 \pm 4,5$ de las tratadas, y $78,5 \pm 5,2$ flores de media en el mutante *ful* frente a las $92,1 \pm 5,4$ de las podadas) (Fig. 2-11), pero cuando las plantas silvestres iniciaron la formación de la estructura terminal característica, el mutante *ful* continuó produciendo nuevas flores (Fig. 2-11).

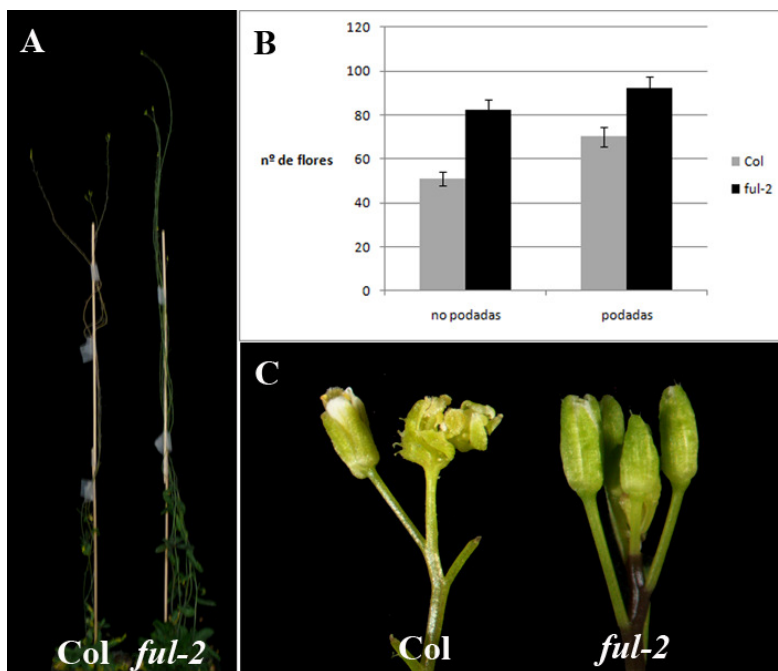


Figura 2-11: el mutante *ful* responde a la falta de semillas pero suprime el fenotipo de la estructura terminal. Las plantas *ful* generan más flores que las plantas silvestres en ausencia de semillas (A, B). Tanto las plantas silvestres como las mutantes *ful* responden a la ausencia de semillas, incrementando el número de flores producido (B), pero mientras las plantas silvestres desarrollan una estructura terminal tras la producción de unas cuantas flores extra (C izquierda), las plantas *ful* continúan produciendo flores durante más tiempo, sin generar esta estructura (C derecha).

Ya que el mutante *ful* no desarrolló la estructura terminal observada en las plantas silvestres, se decidió observar lo que pasaba cuando se introducía esta mutación en fondos estériles, como *pistillata-1* (*pi-1*), o con baja tasa de producción de semillas, como *crc-1*, *spt-2* o *filamentous flower* (*fil*). Todos estos mutantes generan más flores que las líneas control, y terminan el desarrollo de la inflorescencia con una estructura terminal de naturaleza carpelar (Fig. 2-12). Cuando se observó el desarrollo de los dobles mutantes generados con *ful*, ninguna de estas plantas, al igual que en el experimento anterior, generó esta estructura terminal (Fig.

2-12), muriendo las plantas tras la generación de más frutos que las plantas controles, sugiriendo que *FUL* podría estar mediando la formación de esta estructura terminal.

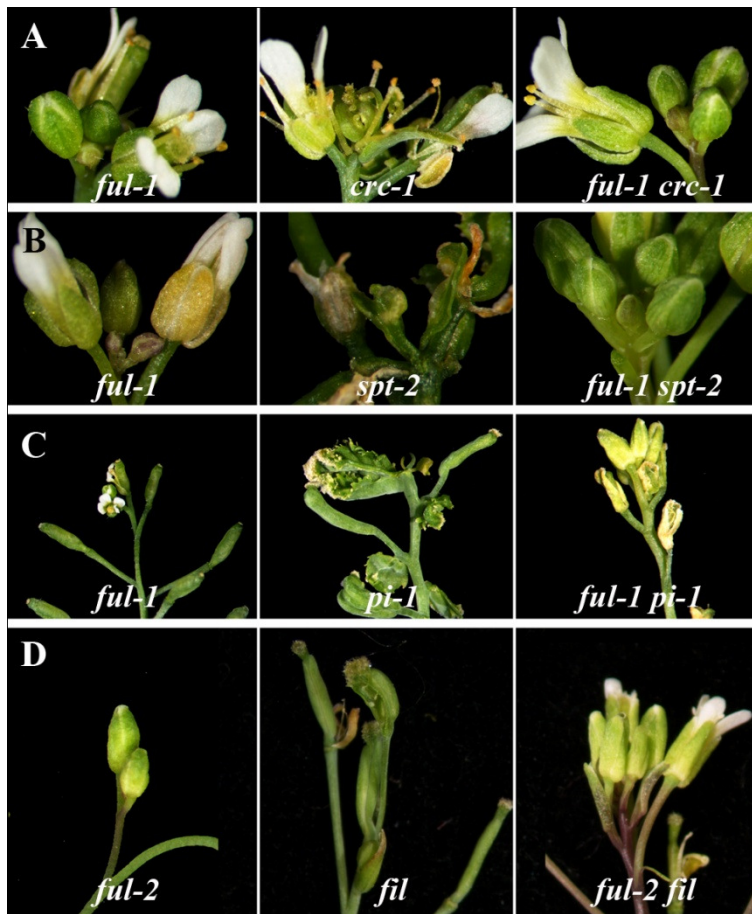


Figura 2-12: La mutación *ful* suprime la formación de la estructura terminal de mutantes estériles o parcialmente estériles. Se muestran los fenotipos desarrollados por el SAM en las etapas finales del desarrollo de la inflorescencia de algunas combinaciones génicas de *ful* con mutantes estériles o parcialmente estériles como *crc-1* (A), *spt-2* (B), *pi-1* (C) o *fil* (D) a sí como el fenotipo presentado por los parentales. En todos los casos la mutación *ful* suprimió la formación de la flor terminal desarrollada por los mutantes sencillos.

La formación de la estructura terminal de naturaleza carpelar, sugería que, posiblemente, algún gen que confiere esta identidad se estuviera expresando ectópicamente en el SAM. Un gen clave en el desarrollo del carpelo, así como en la terminación de los meristemas florales es *AG*, por lo que decidimos analizar la expresión de este gen en plantas a las que se les eliminaban las flores, utilizando una línea deladora *AG::GUS*. En las plantas control no se detectó expresión de *AG* en el SAM en el momento del GPA (Fig. 2-13 A), pero en las plantas donde se eliminaron las flores la expresión de *AG* se detectó, inicialmente, en los flancos del SAM, para después detectarse en toda la zona meristemática y en la estructura terminal resultante (Fig. 2-13 B, C y D). Estos resultados sugerían que la formación de esta estructura terminal podría deberse a la expresión ectópica de *AG*.

Las mutaciones en el gen *AG* generan la pérdida de identidad de los órganos reproductores de la planta, y por tanto, esterilidad, por lo que se decidió observar el desarrollo de la inflorescencia del mutante *ag-1*. Este mutante presentó una producción de flores más prolongada que la de las plantas silvestres, y al igual que la mutación *ful*, no generó una estructura terminal en el momento del GPA. Al generar la combinación de ambas mutaciones se observó que *ag* resultó ser epistático al doble mutante *ful ag* (Fig. 2-13 E) respecto al número de flores producido.

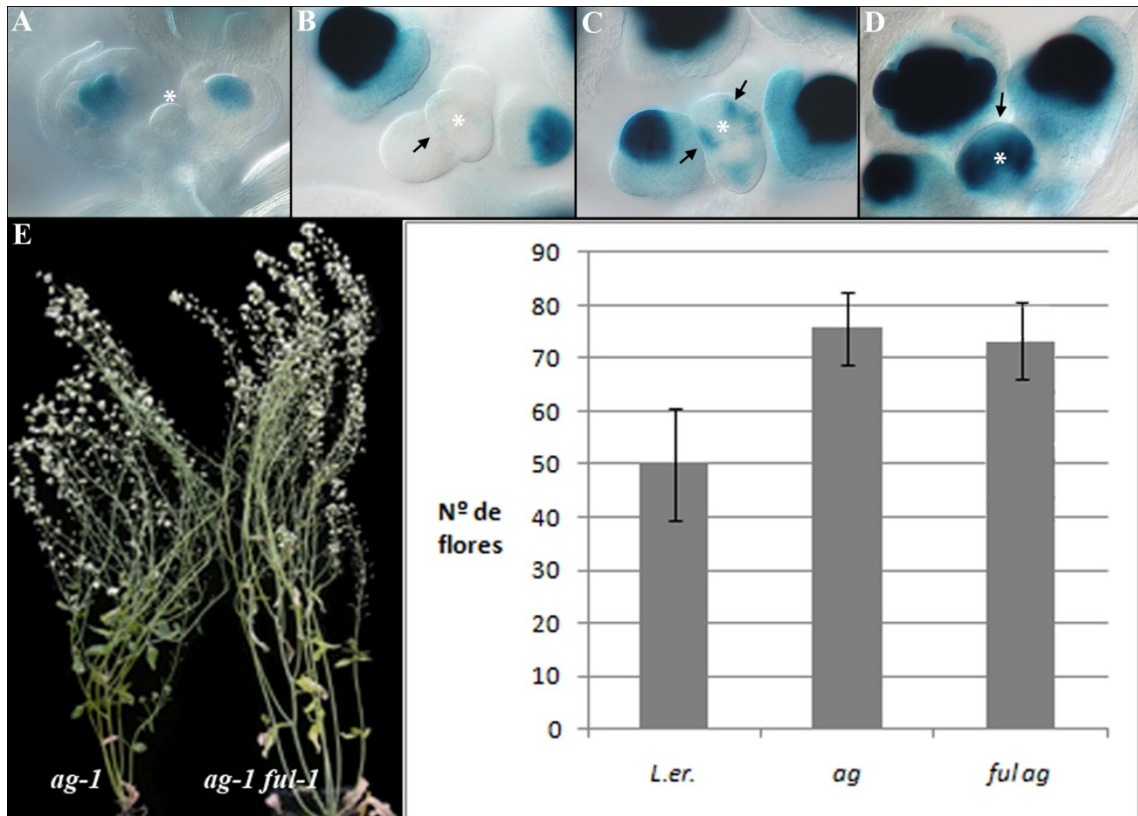


Figura 2-13: AG se expresa ectópicamente en el SAM de las plantas sin frutos. En condiciones normales, las plantas silvestres desarrollan el GPA al final de su desarrollo, manteniendo la expresión de AG controlada (A). Cuando a las plantas se les eliminan las flores de forma continuada no se observa el GPA y se producen más flores hasta que el SAM genera una estructura carpelar terminal, mediada por la expresión ectópica de AG (B a D), que empieza a expresarse levemente en los flancos del SAM (B). Posteriormente se incrementa su expresión en esta zona (C) para acabar por ocupar toda la periferia del SAM (D), lo que media la formación de las estructuras carpelares descritas. Resulta llamativo el incremento del nivel de expresión de AG en las plantas podadas en los momentos previos a la formación de la estructura terminal al compararse con los de las plantas silvestres no podadas. De acuerdo con este razonamiento, el mutante *ag*, a pesar de ser estéril no genera esta estructura carpelar y es epistático a *ful* (E).

Estos resultados sugieren un papel de *FUL* en el control de la actividad meristemática, y más concretamente, en el control del GPA de *Arabidopsis*. El efecto de la ausencia de *FUL* parece ser aditivo al efecto observado en plantas estériles, puesto que las mutaciones en *ful* en condiciones de esterilidad (tanto en plantas mutantes *ful* podadas como en fondos genéticos estériles) retrasan aún más el GPA, prolongando durante más tiempo la producción de flores en estas plantas. Por otro lado, la formación de la estructura terminal parece depender de la presencia de *FUL* y/o de *AG*. El GPA y la formación de la estructura terminal en plantas estériles, se podrían considerar procesos independientes. Nuestros resultados sugieren que *AG* es el responsable de la formación de la estructura terminal de las plantas estériles, pero parece no participar en el GPA ya que no se detectó su expresión en el SAM durante esta fase del desarrollo, mientras que *FUL* parece participar en ambos procesos. Por un lado, *FUL* podría mediar el cese de la actividad meristemática, lo que explicaría el retraso en el GPA del mutante *ful*, y por otro, podría facilitar la expresión de *AG* en el SAM de plantas estériles, lo que explicaría la ausencia de la estructura terminal en las combinaciones de *ful* con mutantes estériles. Esta última posibilidad podría explicarse a su vez de dos modos, o bien *FUL* activaría la expresión de *AG* en el SAM de estas plantas, o bien reprimiría la expresión de algún factor expresado en el meristemo que controlaría finalmente la expresión de *AG*.

***FUL* participa en el GPA mediando la represión de *WUS*.**

Nuestros resultados sugerían que *FUL* participaba en el cese de la actividad del SAM en las últimas etapas del desarrollo. La actividad del SAM depende en gran medida de la actividad del gen *WUS*, responsable de mantener la reserva de células madre del meristemo, y necesario para mantener el meristemo activo. El GPA produce la parada generalizada de la actividad meristemática, aunque el meristemo sigue conservando su estructura (Hensel et al., 1994). Por este motivo decidimos testar qué ocurría con la expresión de *WUS* en el momento del GPA. Para este propósito se utilizó una línea delatora *WUS::GUS*. En los estadios iniciales del desarrollo de la inflorescencia (Fig. 2-14 A y B), así como en estadios posteriores (Fig. 2-14 C y D), no se detectó ninguna diferencia en el patrón de expresión de *WUS* entre las plantas silvestres y las plantas mutantes *ful*, pero en el momento del GPA la expresión de *WUS* desapareció en las plantas silvestres, mientras que en las plantas *ful* se mantenía (Fig. 2-14 E y F). Este resultado sugería que *FUL* podría estar mediando de algún modo la represión observada de *WUS* en las plantas silvestres en el momento del GPA, y de este modo controlar el cese de la actividad meristemática.

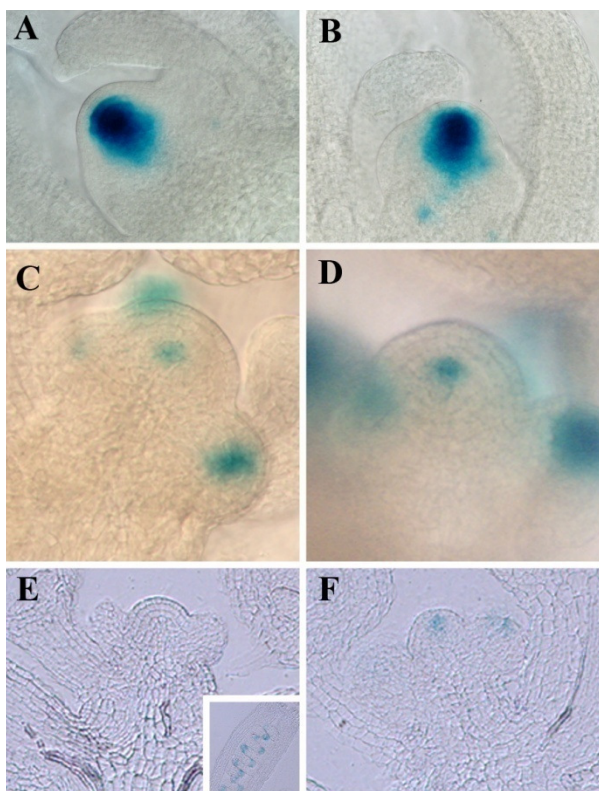


Figura 2-14: La expresión de *WUS* se mantiene durante más tiempo en el SAM del mutante *ful*. Se muestra la expresión de una línea delatora *WUS::GUS* en plantas silvestres (A, C y E) y mutantes *ful* (B, D y F) al inicio de la transición (A y B), y a las tres (C y D) y cinco (E y F) semanas de iniciarse el desarrollo de la inflorescencia. En el momento que se inicia el GPA en las plantas silvestres (E) la expresión de *WUS* desaparece del SAM, aunque todavía se detecta en otras estructuras de la misma planta como los óvulos (detalle en E). En el mismo tiempo la expresión de *WUS* sigue detectándose en el SAM de las plantas *ful* (F).

Nuestros resultados sugerían un papel regulador de *FUL* en la actividad del SAM, posiblemente a través del control de la expresión de *WUS*.

***FUL* actúa redundantemente con otros factores en el control de la determinación del meristemo floral.**

Nuestra hipótesis inicial consistía en que *FUL* pudiera efectuar una función similar en ambos tipos de meristemas, pero a nivel fenotípico sólo habíamos encontrado evidencias de un posible papel regulador de *FUL* en el SAM, controlando su terminación o GPA, y ninguna que relacionara a *FUL* con el control de la actividad del meristemo floral. Una posible explicación

para este hecho sería que *FUL* pudiera estar actuando de forma redundante con otros factores en la regulación de la actividad de este tipo de meristemo. Los meristemos florales, al ser determinados, presentan mecanismos adicionales de control, como la ruta derivada de *AG*, que podrían enmascarar el efecto derivado de la falta de *FUL*.

Para intentar descartar los posibles efectos de redundancia con *FUL* en este proceso, decidimos analizar una línea *pFUL::FUL:VP16* (*FUL:VP16*). Esta línea contiene una construcción que incluye las 4,5 Kb anteriores al ATG del gen, así como la región genómica codificante de *FUL* fusionada, en su extremo 3', a la secuencia del dominio de activación viral VP16 (Cress y Triezenberg, 1991; Triezenberg et al., 1988) (Fig. 2-15 A). El propósito de esta construcción es producir una proteína *FUL* con una actividad transcripcional modificada, que se comporta como un activador transcripcional constitutivo, con el mismo patrón de expresión que la proteína endógena. Este nuevo alelo de *FUL*, al ser un activador dominante de la transcripción, podría permitir desvelar posibles funciones de *FUL* que estuvieran enmascaradas por efectos de redundancia. De este modo, si *FUL* se comportara como un represor, este nuevo alelo funcionaría activando las dianas que *FUL* reprime, y los fenotipos mostrados por esta línea deberían ser similares a los fenotipos mostrados por el mutante *ful* (Fig. 2-15 B). Además, si existieran más factores de transcripción reprimiendo redundantemente estas dianas junto a *FUL*, el efecto dominante del dominio VP16, rompería esta represión y desregularía el gen diana. Por otro lado, si *FUL* se comportara como un activador, el efecto del dominio VP16 podría provocar una mayor activación de sus dianas, generando fenotipos hipermeros (Fig. 2-15 B). Este tipo de abordajes se han utilizado con otros factores de transcripción con resultados satisfactorios (Ng y Yanofsky, 2001; Parcy et al., 1998).

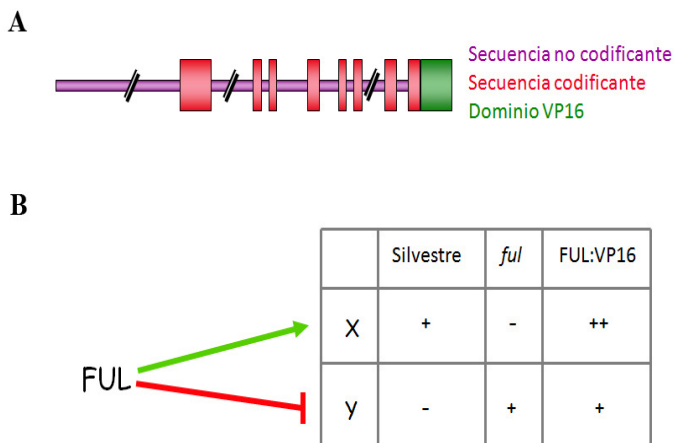


Figura 8: Esquema de la construcción *pFUL:FUL:VP16* y mecanismo de acción.

La línea *FUL:VP16* se construyó mediante la fusión traduccional del dominio de activación viral VP16 al extremo C-terminal de *FUL* (A). Este dominio modifica la actividad del factor de transcripción al que va asociado, de modo que si este es un activador de la transcripción, al poseer el dominio VP16 se comportará como un activador más potente, y si es un represor, lo convertirá en un activador (B), pudiendo mostrarnos fenotipos diferentes respecto al alelo silvestre o el mutante.

La línea *FUL:VP16* presentó un fenotipo característico, que no mostraba similitud ni con la línea mutante ni con la línea silvestre. En las etapas iniciales del desarrollo, las plantas *FUL:VP16* fueron prácticamente indistinguibles de las plantas silvestres. En el momento de la transición floral, cuando *FUL* experimenta un brusco aumento de su expresión, empezaron a observarse grandes diferencias respecto a la línea silvestre. En condiciones de día largo, la línea *FUL:VP16* floreció ligeramente más temprano que la planta control, mientras que el mutante *ful* lo hacía más tarde. La inflorescencia generada por estas plantas desarrolló hojas caulinares mucho más alargadas y estrechas que las generadas por la línea silvestre, mientras que *ful* generó hojas más cortas y anchas. La elongación de los entrenudos en las plantas

FUL:VP16 también estaba afectada, siendo éstos más cortos que los de las plantas silvestres y los mutantes *ful*, por lo que resultaron plantas de menor altura y de aspecto compacto (Fig. 2-16).

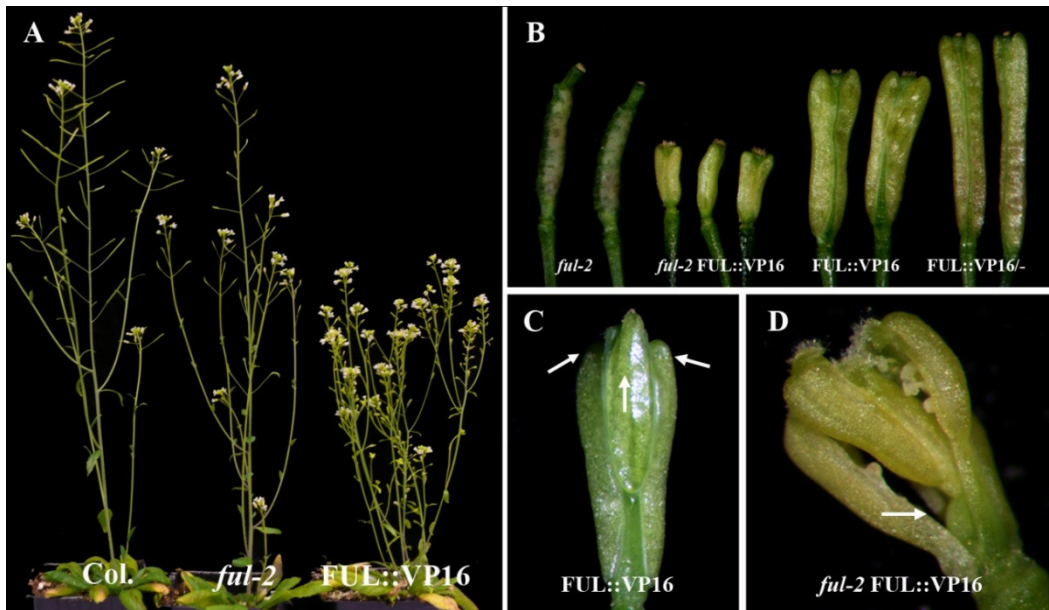


Figura 2-16: Fenotipo de las plantas FUL:VP16. Las plantas FUL:VP16 presentan un porte mucho más compacto que el mutante *ful* o las plantas silvestres (A), debido principalmente al acortamiento de sus entrenudos. Los frutos de las plantas FUL:VP16 también difieren de los del mutante *ful* (B). A pesar de que ambos frutos son más cortos que los de las plantas silvestre, los frutos FUL:VP16 son ligeramente más alargados que los del mutante, y presentan una morfología característica en forma de corazón. El fenotipo de los frutos FUL:VP16 es dependiente de dosis (B, C y D), presentando fenotipos más drásticos en función de la relación entre el número de copias presentes de este alelo y de las copia del alelo endógeno, sugiriendo una competición por sus dianas (B). En presencia del alelo endógeno *FUL*, los frutos FUL:VP16 presentan defectos en la determinación, desarrollando valvas ectópicas (C, las flechas indican las diferentes valvas desarrolladas), pero este efecto es mucho más drástico cuando se eliminan las copias endógenas de *FUL* (D), produciéndose fenotipos fuertes de indeterminación (la flecha en D indica el desarrollo de un nuevo fruto dentro del fruto).

El SAM de la línea FUL:VP16, tras la generación de unas pocas flores, se transformó en un meristemo floral indeterminado: en lugar de generar nuevas flores, inició el desarrollo de estambres con filotaxis espiral, y tras la producción de un número indeterminado de éstos, continuó desarrollando estructuras carpelares, todos ellos siguiendo la distribución en espiral típica de la inflorescencia, y de forma indeterminada (Fig. 2-17).

Las flores desarrolladas por estas plantas inicialmente fueron idénticas a las flores silvestres, pero durante el desarrollo del carpelo y del fruto se observaron grandes diferencias. Los frutos FUL:VP16 presentaron una forma característica acorazonada, que recordaba a los frutos silvestres, pero más alargados que los frutos del mutante *ful* (Fig. 2-16 B). Estos frutos presentaban, con una frecuencia relativamente alta, la formación de valvas extra en el fruto, una característica comúnmente asociada a defectos en la determinación meristemática (Fig. 2-16 C). Este último fenotipo apuntaba que, al igual que en el SAM, *FUL* podría tener una función reguladora en la actividad del meristemo floral. Además, cuando en esta línea eliminábamos el gen *FUL* endógeno (*ful* FUL:VP16), prácticamente todos los gineceos presentaban fenotipos relacionados con la indeterminación de meristemo floral, con nuevos carpelos que surgían del interior del fruto

(Fig. 2-16 D). Del mismo modo, estos fenotipos desaparecían en líneas heterocigotas para *FUL:VP16*, donde los niveles de *FUL* respecto a los de *FUL:VP16* eran superiores, produciéndose además, frutos más largos que los de la línea homocigota donde no se observaban valvas ectópicas (Fig. 2-16 B). De este modo, la línea *FUL:VP16* sugería claramente un papel regulador de *FUL* en el control de la actividad del meristemo floral, y además, que *FUL* se comportaba de forma opuesta a como lo hacía *FUL:VP16*, ya que el fenotipo de indeterminación mostrado por *FUL:VP16* dependía de la cantidad de proteína *FUL* endógena.

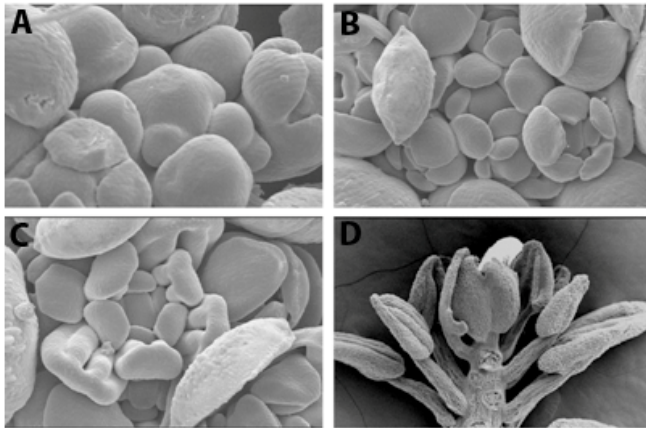


Figura 2-17: Flor terminal de las plantas *FUL:VP16*. El SAM de las plantas *FUL:VP16*, tras producir unas pocas flores (A), inicia la formación de estructuras laminares que se desarrollan como estambres (B y C), siguiendo la misma filotaxis en espiral típica de la inflorescencia. Tras la producción de un número indeterminado de estambres inicia el desarrollo de estructuras carpelares (D),

Mientras que en el meristemo floral la línea *FUL:VP16* mostró un claro fenotipo de indeterminación, los resultados en el SAM eran un tanto contradictorios. Si *FUL* actuara reprimiendo la expresión de genes como *WUS*, la línea *FUL:VP16* incrementaría la indeterminación o la actividad meristemática, y habríamos esperado que el SAM de las plantas *FUL:VP16* hubieran producido más flores que el SAM de las plantas silvestres. Ya que *FUL* es capaz de activar la expresión del gen de identidad floral *LFY* (ver capítulo 1), una posible explicación para este fenotipo sería que *FUL:VP16* estuviera activando a *LFY* en el SAM, provocando que se desarrollara, en parte, como una flor, e impidiendo la formación de nuevas flores. Este nuevo “meristemo floral apical”, sí que mostraba una clara indeterminación, de acuerdo con un efecto regulador de *FUL* de la actividad meristemática.

Nuestros resultados con la línea *FUL:VP16* sugerían que, al igual que en el SAM, *FUL* podría estar regulando la terminación de los meristemos florales. Esta función posiblemente era desempeñada de forma redundante con otros factores que actuaran en el meristemo floral, por lo que sólo se observaba en las plantas *FUL:VP16*. Para comprobar que realmente la línea *FUL:VP16* afectaba a la regulación meristemática, decidimos analizar la expresión de *WUS* mediante hibridación *in situ* durante el desarrollo floral de la línea *FUL:VP16* y *ful* *FUL:VP16*, así como la de *ful* y la línea silvestre.

La expresión de *WUS* en las plantas silvestres se detectó en el centro de los meristemos hasta el estadio 6 del desarrollo floral (Fig. 2-18), y el mismo patrón de expresión se observó en las plantas *ful* (Fig. 2-18). En las plantas *FUL:VP16* la expresión de *WUS* se detectó en ocasiones en un estadio de desarrollo posterior (estadio 7), mientras que en las flores de las plantas *ful* *FUL:VP16* se detectó siempre hasta estadios posteriores de desarrollo (estadios 8 y 9) (Fig. 2-18). Estos resultados confirmaban nuestra idea de que *FUL* podía participar en la regulación meristemática, y que posiblemente lo hacía reprimiendo la expresión de *WUS*.

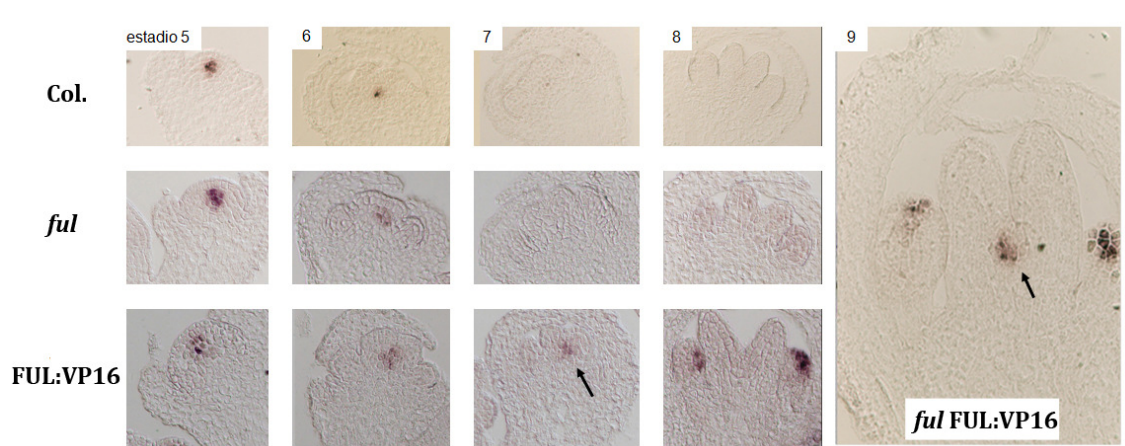


Figura 10: *WUS* se expresa ectópicamente en la línea *FUL:VP16*. Mientras que en las flores silvestres y mutantes *ful* la expresión de *WUS* no se detecta durante el estadio 7, en flores *FUL:VP16* todavía puede observarse durante este estadio, indicando un ligero retraso en su apagado. Este retraso es mucho más evidente en las flores *FUL:VP16* en ausencia de *FUL*, donde la expresión de *WUS* se puede detectar claramente en estadios posteriores.

Interacciones genéticas de *FUL* en el control de la actividad meristemática.

Nuestros resultados mostraban que *FUL* podía estar regulando, de algún modo la expresión del gen *WUS*, contribuyendo a su represión final, tanto en el SAM como en los meristemos florales, aunque en estos últimos, posiblemente actuaba redundantemente con otros factores. Por este motivo, y para esclarecer su participación en las rutas conocidas de regulación de *WUS*, decidimos observar el fenotipo mostrado por *ful* al combinarlo con mutantes descritos previamente e implicados en este proceso, tanto en el SAM como en el meristemo floral.

wus

Para comprobar si el efecto de *FUL* sobre la actividad de los meristemos podría explicarse únicamente por la regulación de *WUS* generamos el doble mutante *ful wus*. En el mutante *wus*, al no poder mantenerse la población de células madre, los meristemos generados se consumen con la producción de unos pocos órganos. Durante el desarrollo vegetativo, el SAM del mutante *wus* se agota tras la producción de unas pocas hojas. Este comportamiento se repite con la formación de nuevos meristemos a partir de las axilas de las hojas producidas, confiriendo un aspecto desorganizado a la roseta. Con la transición floral se inicia el desarrollo de la inflorescencia que repite el patrón de desarrollo observado durante el desarrollo vegetativo, dando lugar a la formación de pequeñas rosetas en la inflorescencia que en ocasiones desarrollan algunos meristemos florales (Fig. 2-19). Al igual que los meristemos vegetativos, éstos se agotan con la producción de unos pocos órganos, normalmente 4 sépalos, 3-4 pétalos y 1-2 estambres (Laux et al., 1996).

El doble mutante *ful wus* resultó ser idéntico al mutante *wus*, no observándose ningún efecto de la mutación *ful* en estas plantas (Fig. 2-19), ni en el número de flores producidas, ni en el número de órganos producidos por estas flores. La epistasia de *wus* sobre *ful wus* indicaba que la función de *FUL* en la regulación de la actividad meristemática dependía de la presencia de *WUS*, y podría apoyar la hipótesis de que *FUL* actuaría sobre la función meristemática mediante la regulación de *WUS*.



Figura 2-19: *wus* es epistático sobre *ful wus*, Indicando que FUL podría estar actuando sobre WUS.

clv3

La ruta CLV media la represión de *WUS*, delimitando la zona donde este gen se expresa. Las mutaciones en esta ruta generan un incremento en la expresión de *WUS* que se traduce en el establecimiento de meristemas más grandes, que generan más órganos. Estas mutaciones también afectan a la terminación del meristemo floral, mostrando, además de un incremento en la cantidad de órganos florales y carpelos, defectos en la terminación del meristemo.

Para comprobar si FUL podría estar regulando a *WUS* indirectamente al afectar la regulación de la ruta CLV generamos la combinación *ful clv3*. Si FUL reprimiera a *WUS* mediante la regulación de los niveles o la actividad de *CLV3*, o sus receptores, el doble mutante *ful clv3* debería ser idéntico a *clv3*. Sin embargo, en el doble mutante *ful clv3* se observó un incremento del fenotipo mostrado por el mutante *clv3*, presentando un SAM mucho más grande que el del mutante *clv3* (Fig. 2-20). Durante el desarrollo floral no se observaron incrementos en el número de órganos producidos (Fig. 2-20), ni un incremento de la indeterminación floral. Sin embargo, en FUL:VP16 *clv3* si se observaron incrementos notables en la indeterminación del meristemo floral, presentando un fenotipo extremo de repeticiones de fruto dentro de fruto (Fig. 2-20). En estas plantas, la estructura terminal desarrollada por el SAM también presentaba un tamaño superior al del SAM del mutante *clv3*.

El diferente efecto de la ausencia de *FUL* en fondo *clv3* en el desarrollo del SAM (sinérgico) y el meristemo floral (epistasia de *clv3*) de nuevo indica que el SAM es más sensible a la ausencia de *FUL* que el meristemo floral. El fenotipo del meristemo floral *ful clv3* se podría explicar de nuevo si *FUL* funcionara redundantemente con otros factores, y como se deduce del fenotipo del SAM, de forma independiente a la ruta CLV. Otra explicación podría ser que *FUL* actuara a través de la ruta CLV en el control de la actividad meristemática del meristemo floral, pero esta hipótesis no explicaría el fenotipo mostrado por la línea FUL:VP16 *clv3*, que presentó un fuerte fenotipo de indeterminación. De este modo, nuestros resultados sugerían que FUL podría estar regulando a *WUS* de forma independiente de la ruta CLV

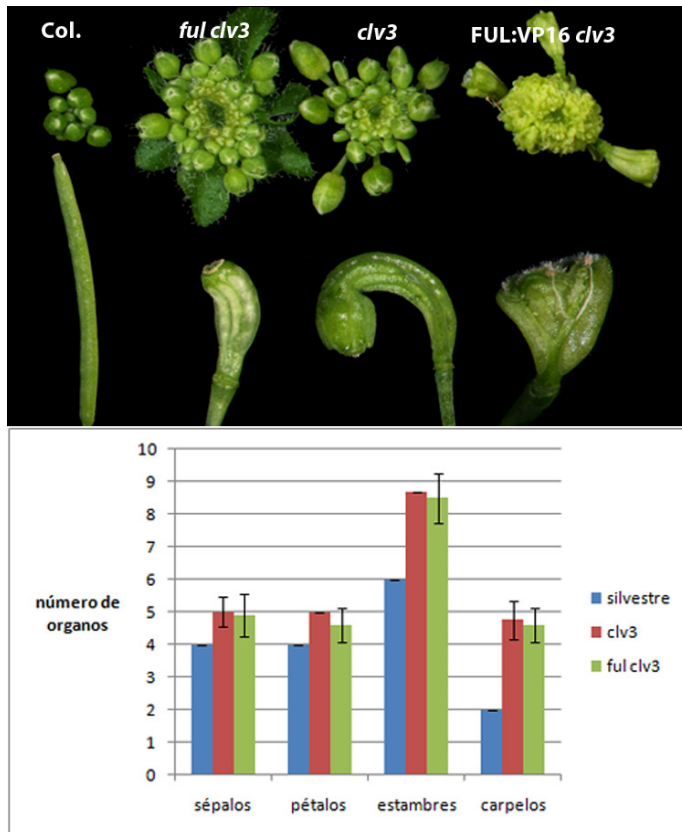


Figura 2-20: *ful* incrementa la indeterminación en el SAM de los mutantes *clv3*. Tanto el mutante *ful* como la línea FUL:VP16 incrementan la indeterminación generada por la ausencia de CLV3 en el SAM, sugiriendo que podrían estar actuando en la regulación de *WUS* de forma independiente. Mientras que la línea FUL:VP16 sí que potenció la indeterminación del fruto al combinarse con el mutante *clv3* (panel superior derecha), el mutante *ful* no modificó el fenotipo del fruto *clv3* (panel superior centro y grafica)

ag

Un gen clave para la regulación de *WUS* en el meristemo floral, y que actúa de forma independiente a la ruta CLV, es *AG*. *AG*, además de especificar la identidad de los estambres y el gineceo, media la represión final de *WUS* en el meristemo floral estableciendo su terminación. Por este motivo, el mutante *ag* desarrolla meristemas florales completamente indeterminados. Los niveles de *AG* son importantes para la correcta regulación del meristemo floral, ya que plantas heterocigotas para la mutación *ag* presentan fenotipos relacionados con la determinación meristemática, como la presencia de valvas ectópicas en los frutos.

El doble mutante *ful ag* resultó ser idéntico al mutante *ag*, no observándose diferencias respecto a la terminación del meristemo floral ni a su tamaño (Fig. 2-21 A). Este hecho ocurrió también en la combinación FUL:VP16 *ag* (Fig. 2-21 A). La epistasia de *ag* sobre *ful ag* y sobre FUL:VP16 sugería la posibilidad de que el papel regulador de *FUL* se pudiera ejercer a través de *AG*.

FUL y AG son capaces de interactuar a nivel de proteína en ensayos de dos híbridos en levadura (de Folter et al., 2005), y además su expresión solapa en el centro del meristemo floral, por lo que una posible explicación sería que *FUL* actuara dimerizando con *AG*, y juntos actuaran en la represión de *WUS*. Por este motivo decidimos testar si la interacción entre *FUL* y *AG* ocurría *in vivo* mediante un experimento de BiFC, observando que la interacción ocurría y que el dímero se localizaba en el núcleo de las células (Fig. 2-21 B). Esta interacción explicaría el papel de *FUL* en el control de la terminación de los meristemas florales, pero no explicaría el papel de *FUL* en el control de la actividad meristemática del SAM, ya que en condiciones normales *AG* no se expresa, al menos a niveles detectables, en el SAM.

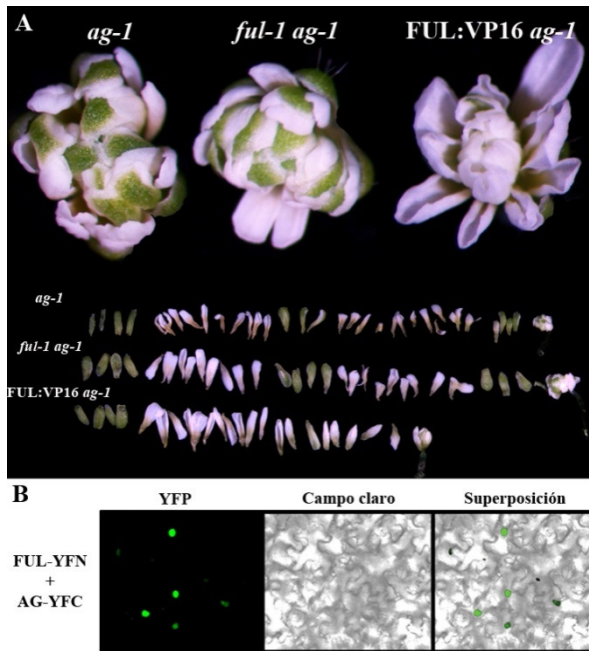


Figura 2-21: *ag* es epistático a *ful ag*. Se muestran las flores producidas por el mutante *ag* y las combinaciones *ful ag* y *FUL:VP16 ag*. Los dobles mutantes muestran fenotipos similares al de *ag*, indicando que *FUL* pudiera mediar la regulación de *WUS* a través de *AG* o junto a él (A). De acuerdo con esta última posibilidad observamos que *FUL* y *AG* son capaces de interactuar físicamente (B).

Como hemos comentado, la mutación *ag* es haploinsuficiente respecto a su efecto en la determinación del meristemo, aunque es recesiva respecto al establecimiento de la identidad de los órganos reproductivos. Muchos mutantes con defectos leves en la determinación del meristemo floral presentan fuertes efectos sinérgicos cuando se elimina una de las copias funcionales del gen *AG*, mientras que en estas mutaciones en un fondo *ag* homocigoto, se observa la epistasia de *ag*, es decir, presentan fenotipos idénticos al mutante *ag*. Por este motivo decidimos observar los fenotipos mostrados por plantas *ful ag/+* y *FUL:VP16 ag/+*. La combinación *ful ag/+*, respecto al fenotipo de indeterminación, resultó ser, de nuevo, similar a *ag/+*, observándose ocasionalmente la formación de valvas ectópicas (Fig. 2-22 A).

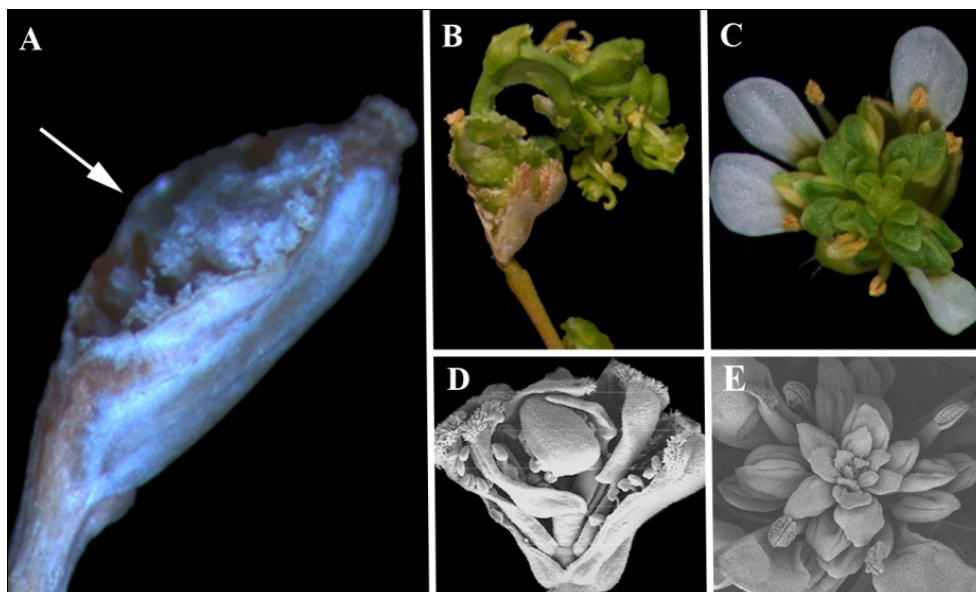


Figura 2-22: Combinaciones con *ag/+*. Mientras que la combinación de *ful* con el heterocigoto *ag* muestra de nuevo fenotipos similares a los de *ag/+*, con la aparición de alguna valva ectópica adicional (A), la combinación de *FUL:VP16* con *ag* presenta fuertes alteraciones en el control de la determinación, encontrando diferentes fenotipos, desde el desarrollo de frutos dentro de fruto (B y D) a el desarrollo de flores con un desarrollo de estambres indeterminado, que recuerda a la flor terminal desarrollada por el SAM de las plantas *FUL:VP16* (C y E).

Sin embargo, en la línea FUL:VP16 *ag/+*, se observó un fuerte incremento de la indeterminación. Todas las flores de estas plantas presentaban fenotipos evidentes de indeterminación del meristemo floral. Algunas de las flores, tras la formación del fruto, continuaban desarrollando nuevos frutos en el interior (Fig. 2-22 B y D) o iniciaban el desarrollo de estructuras similares a inflorescencias que desarrollaban flores aberrantes (Fig. 2-22 B). El resto de flores producidas por estas plantas estaban indeterminadas (Fig. 2-22 C y E). El perianto de estas flores tenía una apariencia silvestre pero los dos verticilos internos estaban alterados, generándose un número indeterminado de estambres y estructuras carpelares, ordenados siguiendo una filotaxis en espiral. Estas flores eran prácticamente idénticas a las estructuras terminales desarrolladas por el SAM de la línea FUL:VP16 (Fig. 2-16 C), salvo por la presencia de los sépalos y pétalos.

La epistasia de *ag* y *ag/+* sobre *ful ag* y *ful ag/+* sugería que *FUL* pudiera estar actuando a través de *AG* en el control de la determinación de los meristemos florales, pero los fenotipos de las plantas FUL:VP16 *ag/+* indicaban la posibilidad de que *FUL* también pudiera estar afectando a este proceso de un modo independiente a *AG*.

Con el propósito de entender mejor la relación funcional de *FUL* y *AG*, decidimos testar la interacción de *FUL* con *KNU*, un gen activado por *AG* que posteriormente dirige la represión de *WUS* (Payne et al., 2004; Sun et al., 2009). Tanto la combinación de *ful* como de FUL:VP16 con *knu* mostraron un incremento del fenotipo indeterminado del mutante *knu* (Fig. 2-23). El resultado obtenido sugería que *FUL* y *KNU* funcionaban de forma independiente en el control de la terminación del meristemo floral, por lo que *FUL* podría estar funcionando en paralelo a la ruta *AG-KNU*, o bien, si *FUL* y *AG* funcionaban de forma conjunta, podrían regular la expresión de *WUS* por un mecanismo independiente de *KNU*.



Figura 2-23: Combinaciones con *knu*. Tanto el mutante *ful* como la línea FUL:VP16 incrementaban la indeterminación provocada por el mutante *knu*, indicando que posiblemente estuvieran trabajando a través de rutas independientes.

crc* y *spt

Ya que *FUL* parecía actuar en la represión de *WUS* en paralelo a las rutas *CLV* y *AG/KNU*, decidimos testar la relación de *FUL* con otros genes que previamente se había descrito que afectaban a la determinación del meristemo floral, en concreto *CRC* y *SPT*. Ambos genes, además de tener afectado el desarrollo del carpelo (Fig. 2-24 A, D), presentan fenotipos en la regulación de los meristemos florales, mostrando ligeros defectos en su terminación y la formación ocasional de alguna valva ectópica, aunque los mecanismos y dianas moleculares implicados son esencialmente desconocidos. La combinación de *ful* y *spt* presentó fenotipos aditivos respecto al desarrollo del carpelo pero no se observó ningún fenotipo relacionado con la determinación del meristemo floral (Fig. 2-24 B). En la combinación de la mutación *spt* con la línea FUL:VP16 sí que se observó un claro incremento de la indeterminación, ya que los frutos

de estas plantas presentaron el crecimiento reiterativo de nuevas estructuras carpelares dentro del primer fruto generado (Fig. 2-24 C).

La combinación tanto de *ful* (Fig. 2-24 E) como de FUL:VP16 (Fig. 2-24 F) con la mutación *crc* presentó fuertes incrementos de la indeterminación del meristemo floral, observándose de nuevo la reiteración del desarrollo de carpelos dentro de carpelos descrita en otras combinaciones génicas anteriores.

Estos resultados sugerían que *FUL* podría estar actuando de forma independiente a como lo hacían *SPT* y *CRC*.



Figura 2-24: Combinaciones de *spt* y *crc*. Los mutantes sencillos *spt* (A) y *crc* (D) no presentan fenotipos evidentes de indeterminación, pero cuando se combinan con la línea FUL:VP16 se produce la indeterminación del meristemo floral, produciéndose desarrollo de tejido carpelar en el interior del fruto (C y D). Las combinaciones de estos mutantes con *ful* presentan alteraciones diferentes respecto a la indeterminación. Al combinarse con *ful* con *spt* no se detecta ningún fenotipo relacionado con la terminación del meristemo floral (B), pero al combinarse con *crc*, el fruto de estas plantas se vuelve indeterminado. Los defectos de la determinación observados sugieren que estos genes podrían estar funcionando en rutas independientes.

sup

El mutante *sup* presenta defectos en la determinación del meristemo floral aunque diferentes a los descritos para los mutantes anteriores. En el mutante *sup* está afectado el correcto establecimiento del número de estambres, ya que genera una cantidad superior a la que se produce en las flores silvestres. El incremento del número de estambres se produce a expensas del desarrollo carpelar, por lo que se ha propuesto que *SUP* participa en el establecimiento de la frontera o separación entre estos dos verticilos. Por otro lado, el incremento en el número de órganos producidos también se ha relacionado con un incremento de la expresión de *WUS*.

Tanto *ful sup* como FUL:VP16 *sup* presentaban un incremento del fenotipo mostrado por *sup*, aumentando el número de estambres producidos por las flores (Fig. 2-25 A y B). Puesto que el incremento en el número de estambres del mutante *sup* se ha asociado a un mayor nivel de la expresión de *WUS* y el retraso de su apagado, la sinergia observada en los dobles mutantes

podría sugerir que *FUL* y *SUP* actuarían en paralelo en el control de la expresión de *WUS*, y por tanto, de la determinación del meristemo floral

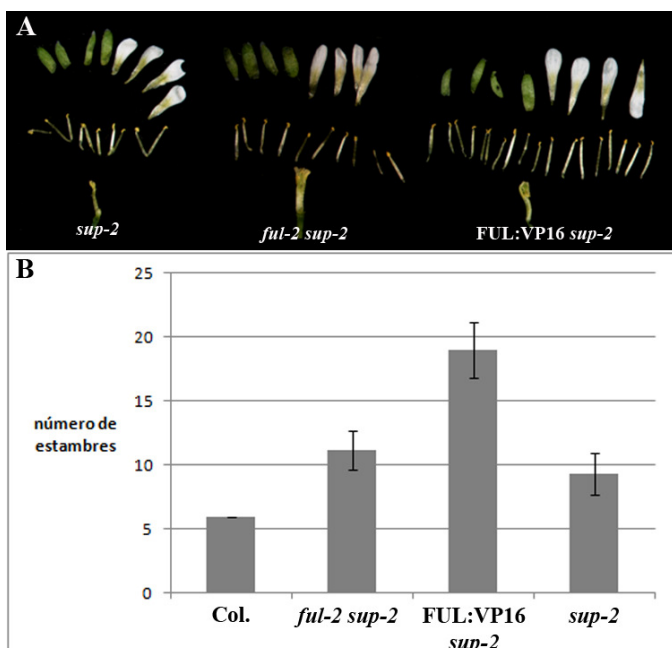


Figura 2-25: Combinaciones con *sup*. Las combinaciones de nuestros alelos con el mutante *sup* incrementó los defectos observados en el mutante *sup* (A), produciéndose un mayor número de estambres en los dobles mutantes que en el mutante sencillo *sup* (B).

Búsqueda de nuevos mutantes implicados en el control de la actividad meristemática.

Los análisis realizados indicaban que *FUL* tenía un papel en la regulación de la actividad meristemática tanto en el SAM como en el meristemo floral. Nuestra hipótesis sugería que *FUL* era capaz de regular la expresión de *WUS*, aunque no parecía hacerlo a través de ninguna de las rutas conocidas que controlan su expresión. En la determinación del meristemo floral, *FUL* actuaba de forma redundante con otros factores, pudiendo actuar junto con *AG* en la represión de *WUS* independientemente de la vía establecida por *KNU*. Sin embargo, la regulación de *WUS* por *FUL* en el SAM debería ser independiente de *AG*, puesto que este gen no se expresa en este tejido.

Una posibilidad que explicara la regulación de *WUS* por *FUL* tanto en el SAM como en el meristemo floral sería que *FUL* actuara a través de alguna ruta no contemplada clásicamente en la regulación de *WUS* y diferente a las testadas en este trabajo. Nuestro laboratorio disponía de un mutante identificado por C. Ferrándiz en el escrutinio de una población *ful-1* mutagenizada con EMS que presentaba defectos severos en la determinación del meristemo floral, por lo que decidimos caracterizarlo e identificar el gen afectado.

La mutación *bolita* presenta defectos de indeterminación

Los frutos de este mutante identificado en fondo *ful* presentaban una forma esférica (Fig. 2-26 B), por lo que inicialmente se le denominó *bolita* (*bol*). Esta forma esférica de los frutos se debía a la proliferación de nuevos carpelos en el interior del fruto, que ocasionalmente se rompían por una de sus valvas debido a la proliferación reiterativa de los nuevos carpelos de su interior (Fig. 2-26 C). Estos nuevos carpelos interiores se originaban a partir de la base de la parte interior del fruto, indicando un fallo en la terminación del meristemo floral. Como hemos comentado este tipo de fenotipos se asocia a fallos en la determinación del meristemo,

normalmente debido a una expresión continuada del gen *WUS*, por lo que el gen afectado por la mutación *bol* podría estar implicado en el control de la expresión de *WUS*. Para comprobar esta hipótesis analizamos la expresión de *WUS* en estas plantas mediante hibridación *in situ*. En plantas silvestres y en el mutante *ful*, la expresión de *WUS* desaparece del meristemo floral durante el estadio 6 de desarrollo. En los meristemos florales de estas plantas la expresión de *WUS* se mantenía durante más tiempo, detectándose durante estadios de desarrollo muy posteriores, causando la aparición de un meristemo residual en el interior del fruto que continuaba desarrollando nuevos órganos (Fig. 2-27).

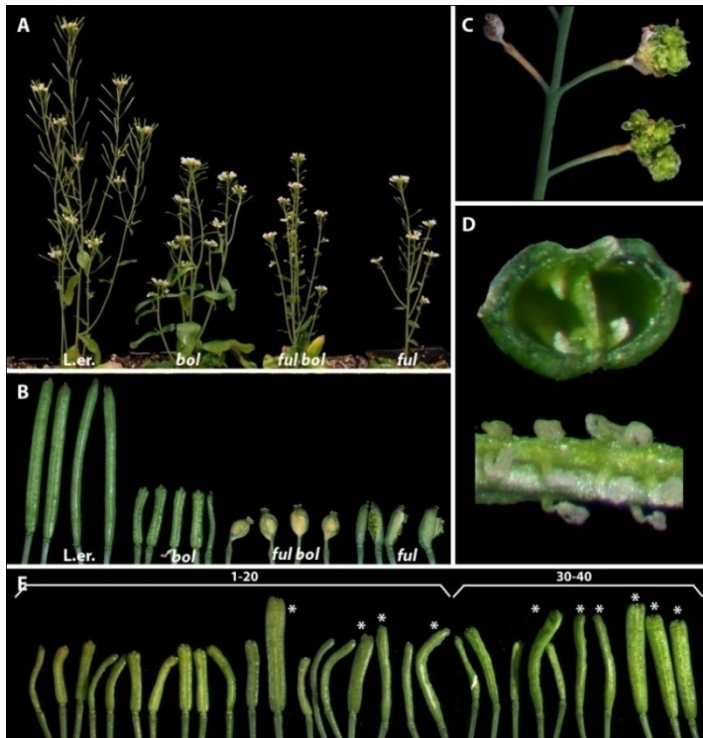


Figura 2-26: Fenotipos del mutante *bol*.

En el panel A se muestran el fenotipo de las plantas *bol*, *ful* y *ful bol*, así como el del ecotipo en el que se encuentran las mutaciones. Estas plantas desarrollaron frutos muy diferentes (B). La combinación *ful bol* presentaba frutos redondeados que en ocasiones se rompían debido al crecimiento ectópico de tejido carpelar dentro del fruto (C). La mutación *bol* por sí sola, una vez separada de la mutación *ful*, no generaba este tipo de fenotipo, pero sus frutos eran mucho más cortos que los de las plantas silvestres (B), y presentaban desarrollo partenocárpico, ya que estos frutos se desarrollaban en ausencia de semillas (D). La partenocarpia observada era facultativa, y dependía de la existencia de polinización. Cuando esta ocurría los frutos se desarrollaban con normalidad (E).

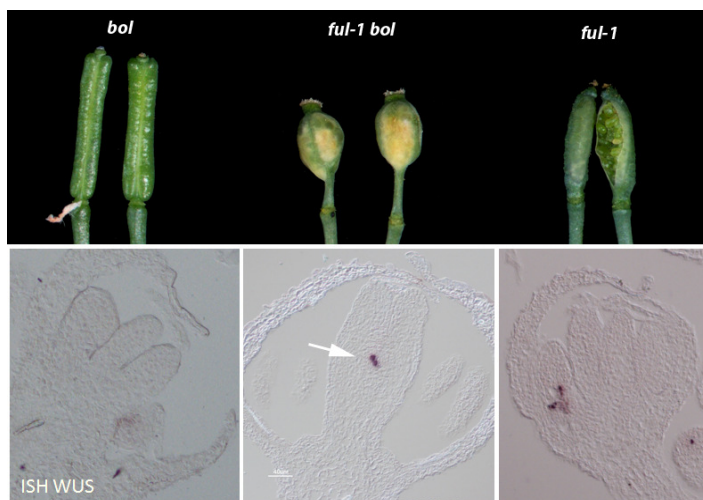


Figura 2-27: Expresión de *WUS*. En el doble mutante *ful bol WUS* se expresaba ectópicamente en la base del carpelo generando una especie de meristemo residual.

Tras la identificación de esta línea se procedió a la realización de retrocruces con la línea original, el mutante *ful-1*, para eliminar otras posibles mutaciones. Un cuarto de las plantas sembradas en la F2 del retrocruce mostró el fenotipo descrito anteriormente, y no se identificó ningún otro fenotipo en estas poblaciones segregantes, indicando que la indeterminación

observada se debía posiblemente a una única mutación que se comportaba de forma recesiva. La línea seleccionada se cruzó entonces por una línea silvestre, para eliminar la mutación *ful*. Sorprendentemente, a excepción de los fenotipos *ful bol* descritos anteriormente, no se observó ningún fenotipo relacionado con la regulación meristemática entre la población segregante, donde deberíamos encontrar el mutante *bol*.

El único fenotipo que se observó entre la población segregante fue una reducida fertilidad en un grupo de plantas que segregaban en una proporción similar a como lo debía hacer el mutante sencillo *bol* y que poseían el alelo silvestre de *FUL*. El fenotipo de esterilidad observado parecía depender de las condiciones de crecimiento, y cuando aparecía, los frutos de estas plantas se desarrollaban sin semillas (Fig. 2-26 D), aunque nunca alcanzaron el tamaño de los frutos silvestres (Fig. 2-26 B). Este fenotipo no presentaba una penetrancia total en la planta, desarrollándose en ocasiones frutos polinizados, sobre todo en las últimas etapas de la vida de la planta (Fig. 2-26 E).

La observación detallada de las flores del mutante *bol* que presentaban este fenotipo mostró que el motivo de la esterilidad parecía deberse a una falta de elongación de los filamentos de los estambres, por lo que no llegaba a estar en contacto el polen con las papilas estigmáticas del estilo (Fig. 2-28 A). Cuando estos frutos se polinizaban manualmente con polen de la misma planta se desarrollaban con normalidad (Fig. 2-28 C). La combinación *ful bol* no presentaba estos problemas de polinización, ya que aunque los estambres de estas plantas eran más cortos que los silvestres, el hecho de tener frutos tipo *ful*, que son también más cortos, corregían el defecto de los estambres (Fig. 2-28 B). El hecho de que los frutos *bol* fueran capaces de desarrollarse tanto en presencia de semillas como en ausencia de ellas indicaba que estos frutos eran partenocárpico facultativos.

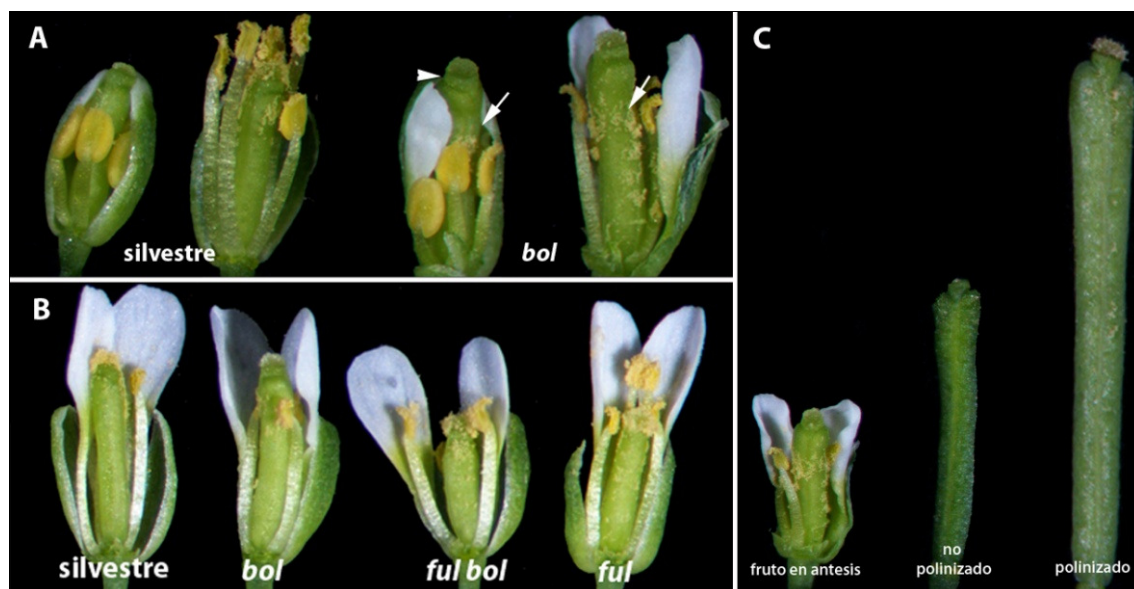


Figura 2-28: El mutante *bol* presenta partenocarpia facultativa. El mutante *bol* podría tener defectos en la autopolinización de sus frutos (A), bien porque sus estambres maduran prematuramente (flecha), o bien por un exceso de elongación del gineceo (punta de flecha), quedándose el polen adherido a las paredes del carpelo en lugar de entrar en contacto con el estigma. Al combinarse con *ful* este fenotipo no ocurre, ya que el reducido tamaño de los carpelos *ful* provoca que los estambres sí que contacten con el estigma (B). Los frutos *bol* elongan y se desarrollan en ausencia de polinización, aunque no alcanzan el tamaño de los frutos polinizados (C).

El mutante *bolita* es un nuevo alelo de *AP2*

La identificación del gen que estaba afectado por la mutación *bol* se realizó mediante mapeo cromosómico, en colaboración con el Servicio de Cartografía Génica dirigido por la Dra. María Rosa Ponce y el Dr. José Luis Micol en la División de Genética del Campus de Elche. Para este propósito se cruzó nuestra línea *ful bol*, en el fondo genético *L.er.*, por el mutante *ful-2*, en el fondo genético *Col.*, y se enviaron muestras de material biológico de ambos parentales, la línea F1 resultante del cruce entre ellas, y de 50 plantas de la F2 que mostraban el fenotipo observado en el escrutinio inicial de la mutagénesis. Un primer análisis reveló que la mutación se encontraba en el brazo largo del del cromosoma 4 de *Arabidopsis*. Para un mapeo más detallado se volvieron a enviar 450 muestras más de plantas fenotipo *ful bol* obtenidas de la F2. Tras este último mapeo se acotó la zona donde estaba la mutación a una región de 109 Kb del cromosoma 4 ubicada entre los marcadores *cer448356* y *cer448311*, que comprendía 21 genes, desde el AT4G36780 hasta el AT4G36980 (Fig. 2-29). De estos 21 genes, 6 eran factores de transcripción, 5 codificaban proteínas de función desconocida, y los 11 restantes codificaban proteínas implicadas en diferentes procesos del desarrollo y metabolismo de la planta.

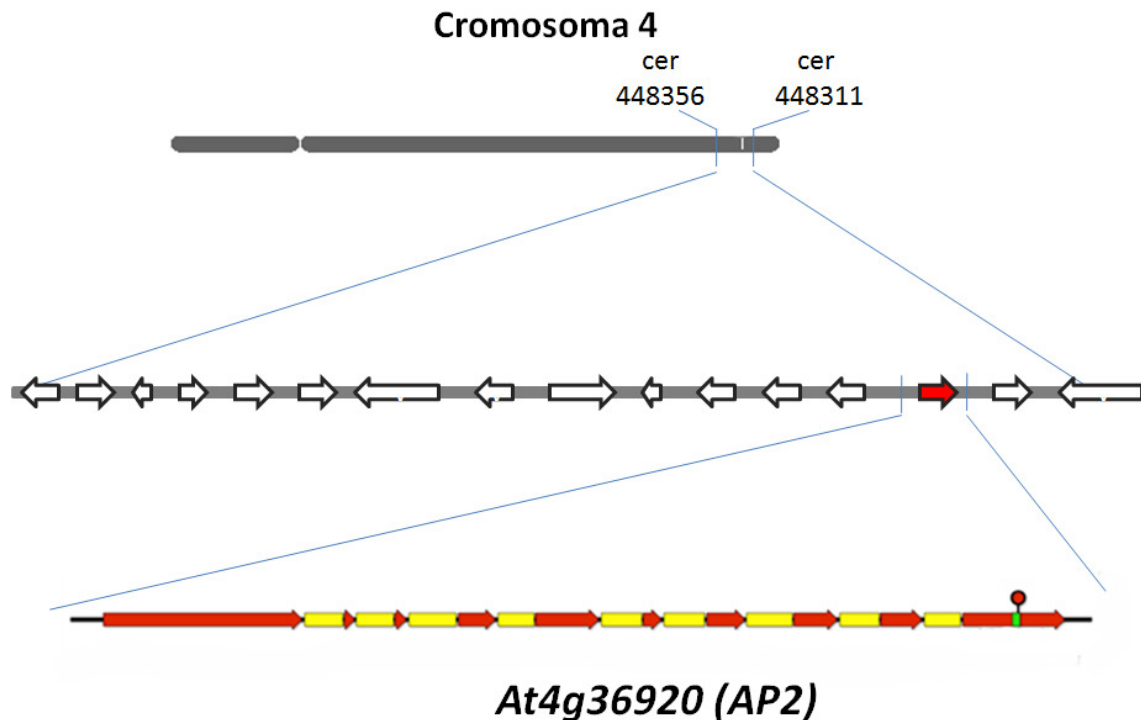


Figura 2-29: Región del cromosoma 4 de *Arabidopsis thaliana* donde inicialmente se ubicó la mutación *bolita*. La secuenciación de las regiones genómicas de estos genes nos permitió identificar una mutación en el gen *At4g36920* (*AP2*).

De los 21 genes incluidos en esta región los candidatos más probables para participar en la regulación de la actividad meristemática eran los 6 factores de transcripción. Entre estos 6 genes habían 3 altamente interesantes, bien porque se habían propuesto como reguladores de la actividad meristemática, como *SPT* y *AP2*, o bien porque se expresaban en meristemas, como *BELL LIKE HOMEODOMAIN 2* (*BLH2*). La secuenciación de la región genómica de los 6 factores de transcripción no reflejó diferencias en ninguno de ellos excepto en el gen *AP2*

(*At4g36920*) (Fig. 2-29 y 2-30), indicando que *AP2* podría albergar la mutación que confería los fenotipos descritos.

AP2 es un gen homeótico floral de clase A, para cuya proteína se ha propuesto también una función como reguladora de la actividad meristemática, a través de la regulación del gen *WUS*. *AP2* está regulado entre otros factores por la acción del miR172. El miR172 regula tanto los niveles de RNA de *AP2* como la traducción de éste, contribuyendo a la existencia de bajos niveles de *AP2*.

La mutación encontrada en *AP2* consistía en un único cambio de base en la posición +2037, de guanina a adenina, común en las mutagénesis realizadas con EMS. Este cambio de base generaba a su vez un cambio de aminoácido en la proteína, de glicina, un aminoácido apolar, a glutámico, un aminoácido polar de carga negativa (Fig. 2-30). Este cambio de aminoácido podría generar una alteración en la función de la proteína. Por otro lado, la mutación se encontraba justo en la región donde, al transcribirse a RNA, se une el miR172. La mutación identificada se encontraba en la zona de reconocimiento del miR172, en la región 3', y cercana a la zona de corte descrita para este gen. Mutaciones cercanas al extremo 3' de la secuencia de reconocimiento de los miRNAs, así como los cambios de secuencia que se encuentran cerca del sitio de corte, producen grandes alteraciones en la regulación ejercida por estos (Schwab et al., 2006). Al realizar una simulación de la interacción entre el RNA de *bol* y el miR172 mediante un software que predice este tipo de interacciones (Weigelworld bioinformatics portal), se observó que la mutación encontrada podría estar afectando el apareamiento del miR172 (Fig. 2-30), lo cual podría estar afectando a la regulación de gen.

Este análisis preliminar sugería que los cambios observados en las plantas *bol* se podrían deber a la mutación puntual del gen *AP2*. El cambio de base producido generaba un cambio de aminoácido que podría afectar a la función de *AP2*, a la vez que alteraba el sitio de reconocimiento del miR172, que podría afectar a su regulación.

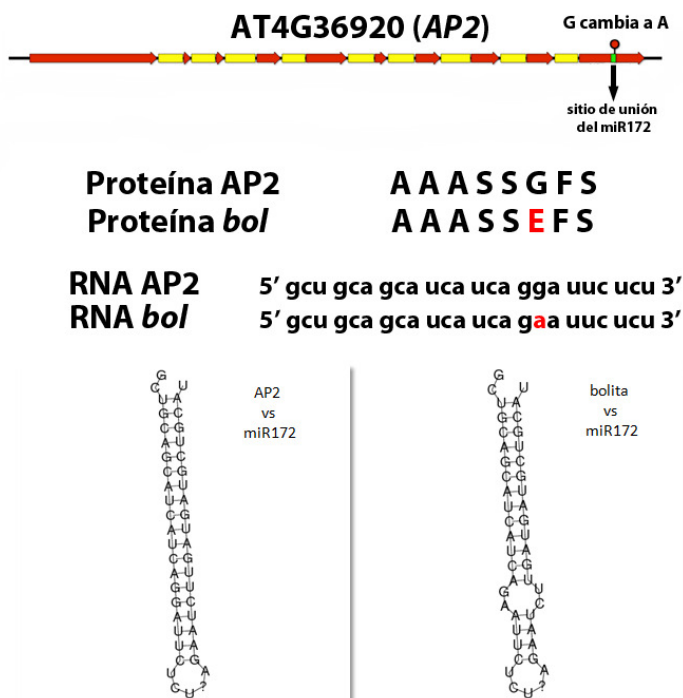


Figura 2-30: La mutación *bolita*. El mutante *bol* presenta un único cambio de base en el gen *AP2* (G a A) que genera un cambio de aminoácido en la proteína (G a E). La base mutada en *bol* se sitúa en una región importante para la regulación de este gen afectando a la hibridación del mensajero de *AP2* con el miR172.

El mutante *bol*, a excepción de las ocasiones donde se observaba la partenocarpia, no presentaba otros fenotipos relacionados con la pérdida de función de *AP2*, lo que sugería que si la mutación responsable del fenotipo *bol* estaba en *AP2*, la proteína podría ser funcional. La pérdida de función de *AP2* provoca defectos durante el desarrollo floral, y en estos mutantes, los sépalos y pétalos de las flores pierden su identidad desarrollándose como estructuras carpelares debido a la expresión ectópica de *AG*. Para comprobar que la proteína codificada por el alelo de *AP2* identificado en el mutante *bol* era funcional decidimos comprobar si era capaz de complementar el mutante *ap2-1*. Las plantas resultantes de este cruce, *ap2-2/bol*, presentaron un fenotipo silvestre, no apreciándose ningún defecto durante el desarrollo floral (Fig. 2-31 A), y en esta ocasión, ningún defecto en la fertilización de las plantas (Fig. 2-31 B), indicando que la proteína era funcional y capaz de rescatar el fenotipo de pérdida de función del mutante *ap2-2*. La única diferencia de estas plantas respecto a las silvestres fue que los frutos eran ligeramente más cortos, siendo similares a los obtenidos en la línea *bol* polinizados.

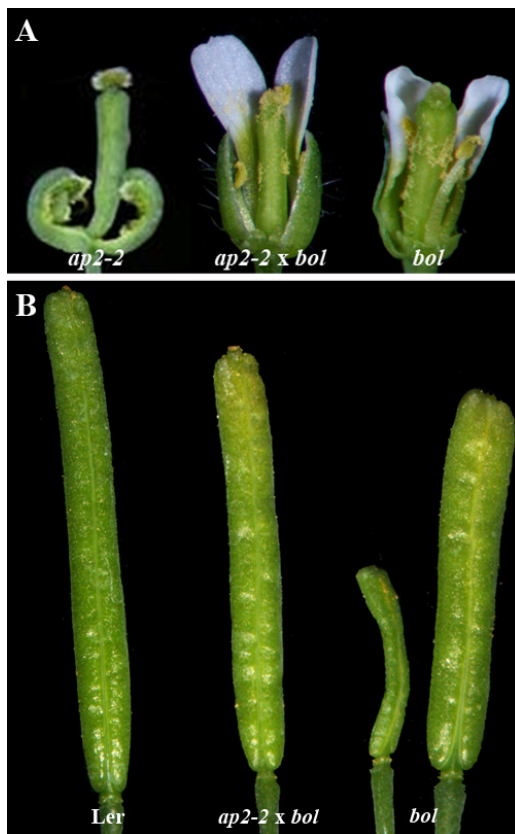


Figura 2-31: El alelo de *AP2* del mutante *bol* produce una proteína funcional, y rescata el fenotipo de mutantes de pérdida de función de *AP2*. En el panel A se muestra el fenotipo de flor de un mutante de pérdida de función *ap2* y el de una flor *bol*, entre ellas esta una flor desarrollada por la planta resultante de su cruce. El desarrollo de los frutos producidos por estas plantas es normal (B).

Puesto que la proteína codificada por el alelo de *AP2* identificado en *bol* parecía ser funcional, el fenotipo observado en las plantas *ful bol* podría deberse a problemas en la regulación de su mensajero, como predecía el análisis de su secuencia. Para comprobar si esta posibilidad explicaba los fenotipos observados decidimos sobreexpresar tanto el alelo silvestre de *AP2* como el alelo identificado en las plantas *bol*, utilizando el promotor 35S del virus del mosaico del tabaco.

Cuando se compararon las plantas obtenidas se observó que el 20% de las plantas que sobreexpresaban el alelo de *AP2* de las plantas *bol* presentaban fenotipos relacionados con la indeterminación de los meristemos florales, como la presencia de valvas ectópicas y el

crecimiento de órganos ectópicos dentro del fruto, mientras que las plantas que sobreexpresaban el alelo silvestre de *AP2* no presentaron ninguno de estos fenotipos (Fig. 2-32 A). Ya que la proteína codificada por el alelo de *AP2* del mutante *bol* parecía ser equivalente a nivel funcional a *AP2*, una posible explicación a la diferencia de fenotipos observados en la sobreexpresión de ambos genes podría residir en la regulación por el miR172. La sobreexpresión de *AP2* puede ser controlada por el miR172 presente en la planta (Chen, 2004), pero la del nuevo alelo, al presentar defectos en la hibridación del miR172, podría no estar bien controlada, de forma que los altos niveles de expresión se tradujeran en altos niveles de la proteína que desregularan la expresión de *WUS*.

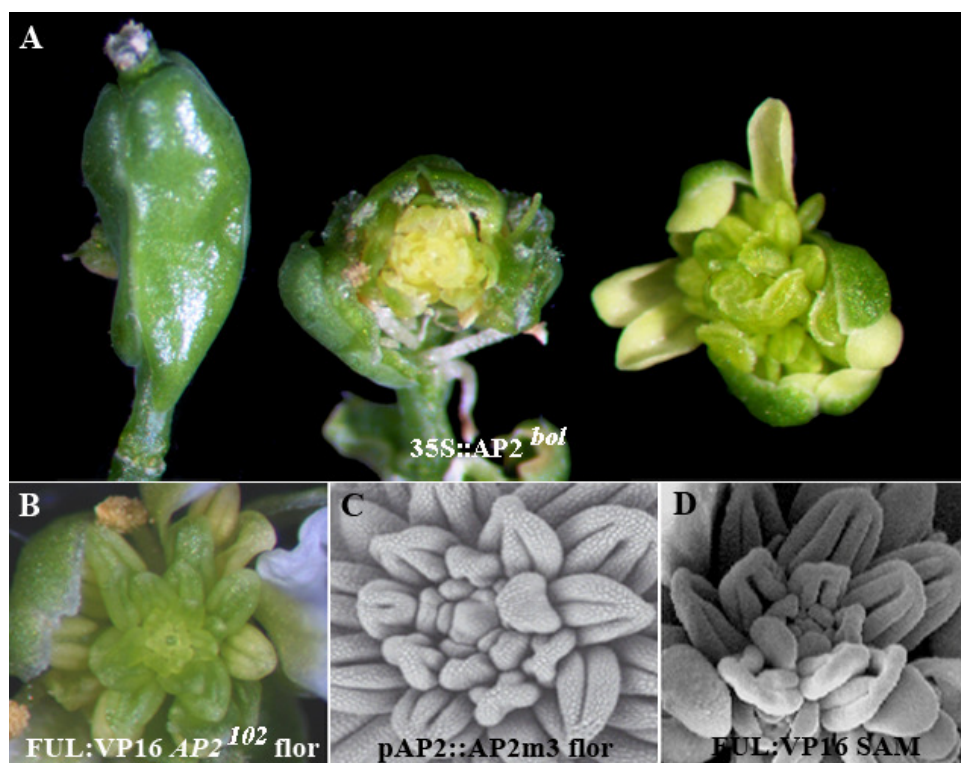


Figura 2-32: La sobreexpresión del alelo de *AP2* del mutante *bol* provoca fenotipos de indeterminación. Niveles altos de expresión de *AP2*^{I02} generan fenotipos relacionados con la pérdida de la determinación floral, como la producción de valvas ectópicas, crecimiento de tejido de ectópico dentro del fruto o desarrollo floral con sobreproducción de estambres (A). Algunos de los fenotipos obtenidos mimetizan los producidos por la expresión de formas resistentes de *AP2* a la regulación por el miR172 (C). A su vez estos fenotipos son similares a los que se generan en las flores terminales de la línea FUL:VP16 (D). Al cruzar la línea FUL:VP16 por *AP2*^{I02}, todas las flores desarrolladas por la planta, presentaban estos mismo fenotipos (B).

Los fenotipos observados en las plantas que sobreexpresaban el alelo de *AP2* identificado en *bol* eran similares a los desarrollados por formas resistentes de *AP2* a la regulación ejercida por el miR172 (Chen, 2004; Zhao et al., 2007). Estos alelos de *AP2* se generaron modificando al menos tres bases de la región que aparea con el mir172. Cuando Zhao et al. (2007) expresaron estos alelos bajo el control de un promotor constitutivo, o bajo el control del propio promotor de *AP2*, obtuvieron la pérdida de la determinación del meristemo floral, obteniéndose flores que producían dominios extra de estambres y carpelos de forma indefinida (Fig. 2-32 B). Este tipo de fenotipo fue obtenido entre nuestras líneas que sobreexpresaban el alelo de *AP2* identificado en el mutante *bol* (Fig.2-32 A), sugiriendo que este nuevo alelo de *AP2* parecía funcionar de forma similar a los alelos resistentes producidos por Zhao et al. (2007).

Estos resultados indicaban que el alelo de *AP2* identificado en el mutante *bol* era una forma parcialmente resistente a la regulación ejercida por el miR172.

Tras este análisis, asumimos que los fenotipos descritos en el mutante *bol* se debían a la mutación encontrada en *AP2*. Puesto que la mutación se encontraba en un gen ya descrito decidimos renombrarla como *AP2*¹⁰²

FUL podría regular la expresión de *AP2*.

El fenotipo de indeterminación identificado en el escrutinio de la mutagénesis tan sólo se observó cuando la mutación se encontraba en un fondo genético *ful* o cuando se sobreexpresaba el nuevo alelo. Durante la serie de cruces realizados para eliminar posibles mutaciones secundarias en la línea mutante seleccionada se observó que las plantas *AP2*¹⁰² *ful*/+ presentaban ligeros defectos de indeterminación, similares a los observados en plantas heterocigotas para la mutación *ag*, con la aparición de algunos frutos que presentaban valvas ectópicas (Fig. 2-33).



Figura 2-33: La indeterminación generada por el alelo *AP2*¹⁰² depende de los niveles de *FUL*, incrementándose la indeterminación según eliminamos la presencia de *FUL*. En plantas heterocigotas *ful* en un fondo *AP2*¹⁰² se desarrollan valvas ectópicas indicando la desregulación de *WUS*.

Estos resultados sugerían que el fenotipo de indeterminación observado podría depender de la dosis de *FUL*, de modo que a menor cantidad de *FUL*, mayor efecto de la mutación *AP2*¹⁰². Puesto que *AP2* está implicado en el control de la actividad meristemática favoreciendo la expresión del gen *WUS*, y que el fenotipo de indeterminación observado depende de los niveles de *FUL*, podríamos pensar que *FUL* estaría regulando la actividad meristemática, y en concreto la expresión del gen *WUS*, a través de la regulación de *AP2*. Asumiendo que el fenotipo observado dependía de un fallo en la regulación ejercida por el miR172, y que *FUL* pudiera participar en la regulación de *AP2*, el fenotipo observado podría explicarse si en el mutante *ful* los niveles de *AP2* fueran más altos. Esta desregulación podría explicarse de dos modos; una posibilidad sería que existiera un efecto represor de *FUL* sobre la regulación de *AP2*, por lo que, en ausencia de *FUL*, aumentarían los niveles de *AP2*. El incremento en los niveles de este alelo resistente al miR172, provocaría un incremento de la proteína *AP2* funcional, generándose la indeterminación de los meristemas (Fig. 2-34 A 1). La otra opción implicaría un efecto indirecto de *FUL* sobre *AP2*, a través de la regulación del miR172. *FUL* podría actuar como un activador de la expresión de los miR172, por lo que en un mutante *ful* existirían niveles bajos de este miRNA. Niveles bajos de miR172, junto con la resistencia parcial de este nuevo alelo, podrían desencadenar un incremento de los niveles de *AP2* activo,

produciendo los fenotipos dependientes de *FUL* descritos anteriormente (Fig. 2-34 A 2). En ambos casos, el resultado final sería niveles altos de *AP2*.

Para intentar averiguar cuál de estas opciones era la correcta, decidimos utilizar la línea *FUL:VP16*. Si *FUL* funcionara activando la expresión del *miR172*, la línea *FUL:VP16* debería mostrar mayores niveles de este miRNA, y por lo tanto, disminuir la cantidad de *AP2* (Fig. 2-34 B 1). Por otro lado, si *FUL* fuera capaz de reprimir la expresión de *AP2*, en la línea *FUL:VP16* deberíamos obtener mayores niveles de *AP2* y un mayor efecto en la indeterminación de los meristemas (Fig. 2-34 B 2). Nuestros resultados previos con la línea *FUL:VP16* mostraban fenotipos evidentes de indeterminación. Además, la flor terminal que desarrollaban las plantas *FUL:VP16* (Fig. 2-32 D) mostraba una gran similitud con las flores obtenidas con los alelos resistentes de *AP2* (Fig. 2-32 C), sugiriendo que *AP2* podría estar presente a altos niveles en el SAM de estas plantas.

Estos datos favorecían la opción de la regulación directa de *AP2* como la más plausible.

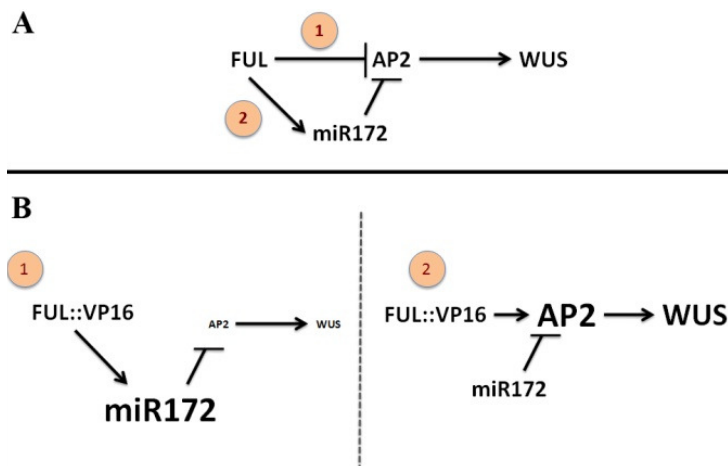


Figura 2-34: Modelo que explica los posibles mecanismos de acción seguidos por *FUL* en la regulación de *AP2*. *FUL* puede regular a *AP2* de dos modos, bien de forma directa, reprimiendo su expresión (A1), o bien de forma indirecta, por ejemplo a través del *miR172* (A2). La utilización de la línea *FUL:VP16* (B1 y B2), un activador dominante de la transcripción, muestra que la opción más probable sea la regulación directa de *FUL* sobre *AP2*

De acuerdo con este razonamiento, en la línea *FUL:VP16* deberían existir mayores niveles de la proteína *AP2*, que originarían los fenotipos descritos de indeterminación. De este modo, la combinación de la línea *FUL:VP16* con el alelo *AP2¹⁰²* debería mostrar fenotipos más severos. La combinación genética de la línea *FUL:VP16* con el alelo *AP2¹⁰²* mostró un aspecto similar a la línea *FUL:VP16*, pero todas las flores desarrolladas por estas plantas presentaban fuertes fenotipos de indeterminación. Todas las flores producidas por la línea *FUL:VP16 AP2¹⁰²* (Fig. 2-32 B) fueron idénticas a las producidas por los alelos resistentes de *AP2* descritas por Zhao et al. (2007) (Fig. 2-32 C) y a algunas de las líneas que sobreexpraban *AP2¹⁰²* (Fig. 2-32 A derecha). Estos resultados apuntaban de nuevo a una regulación de *AP2* por *FUL*, independiente de la regulación del *miR172*.

Para testar esta hipótesis decidimos también cruzar la línea *FUL:VP16* por un mutante *ap2*. Si los fenotipos de indeterminación dependían de la desregulación de *AP2*, deberíamos observar la supresión de estos fenotipos. Las plantas *FUL:VP16 ap2* presentaron un fenotipo aditivo, desarrollando los frutos característicos de la línea *FUL:VP16* y a la vez que los fenotipos típicos de la mutación *ap2*, como la conversión de sépalos a carpelos, pero de acuerdo con nuestra hipótesis, se suprimieron los fenotipos relacionados con la indeterminación de los meristemas

de la línea FUL:VP16: La flor terminal que producían estas plantas no estaba indeterminada, produciendo un fruto similar al producido por el resto de flores (Fig. 2-35 C), al igual que tampoco se detectó ningún tipo de indeterminación en los frutos (Fig. 2-35 A y B).



Figura 2-35: Las mutaciones en AP2 corrigen los defectos de indeterminación observados en la línea FUL:VP16. Entre los frutos producidos en la inflorescencia principal de las plantas FUL:VP16 (A) se observan frutos con defectos de indeterminación, como la presencia de valvas ectópicas (punta de flecha). En los frutos producidos en las plantas FUL:VP16 *ap2-1* (B) no se observaron estos defectos. Además la indeterminación de las flores terminales característica de las plantas FUL:VP16 (Fig. 2-17) desapareció en un fondo genético *ap2* (C).

Estos resultados indicaban que los fenotipos de indeterminación mostrados en la línea FUL:VP16 dependían de la presencia de AP2.

AP2 y el GPA

Nuestros resultados indicaban que *FUL* controlaba el GPA regulando el mantenimiento de la expresión de *WUS*, y que a su vez, *FUL* podría estar regulando la expresión de *AP2*. Ya que se había propuesto que *AP2* estaba implicado en la regulación de *WUS* (Wurschum et al., 2006), decidimos comprobar si *AP2* estaba también implicado en el GPA mediando el efecto de *FUL* sobre *WUS*.

Con este propósito decidimos estudiar si existían diferencias en el GPA del mutante *ap2-12* respecto a las plantas silvestres y al mutante *ful-2*. El mutante *ap2-12* presenta una inserción de T-DNA en el quinto intrón del gen *AP2*, y de los alelos disponibles de *AP2*, parece ser el de mayor pérdida de función (se expresa unas 16 veces menos que el silvestre)(Yant et al., 2010). El mutante *ap2-12* presenta los defectos típicos de los mutantes *ap2*, como la conversión de los sépalos a estructuras carpelares, y defectos en el desarrollo de los pétalos. Además, presenta esterilidad parcial, probablemente ocasionada por una disminución del número de estambres presentes en la flor, pero los frutos que se polinizan se desarrollan con normalidad. Tanto las plantas silvestres como el mutante *ap2-12* generaron un número de flores similar en la inflorescencia principal, $43,4 \pm 3,5$ las plantas silvestres y $44,8 \pm 2,7$ las plantas *ap2-12*, mientras que el mutante *ful-2* produjo $63,1 \pm 4,3$ (Fig. 2-36 C). La diferencia observada entre estas plantas fue que mientras las plantas silvestres experimentaban un GPA normal, las plantas *ap2-12* formaban una estructura carpelar terminal (Fig. 2-36 A), al igual que lo hacían numerosos mutantes estériles con baja producción de semillas. La esterilidad del mutante *ap2-12*, podría explicar la aparición de esta flor terminal, pero sorprendentemente, no se observó un incremento en el número de flores producidas por estas plantas al compararlas con las plantas silvestres. Para establecer si esta flor terminal se originaba en las plantas *ap2-12*, al

igual que en los mutantes estériles, por la expresión ectópica de *AG*, decidimos analizar la expresión de una línea delatora *AG:GUS*. En el mutante *ap2-12*, al igual que en los mutantes estériles y que en las plantas silvestres a las que eliminamos las flores, *AG* se detectó ectópicamente en el SAM durante las últimas etapas del desarrollo de la inflorescencia (Fig. 2-37).

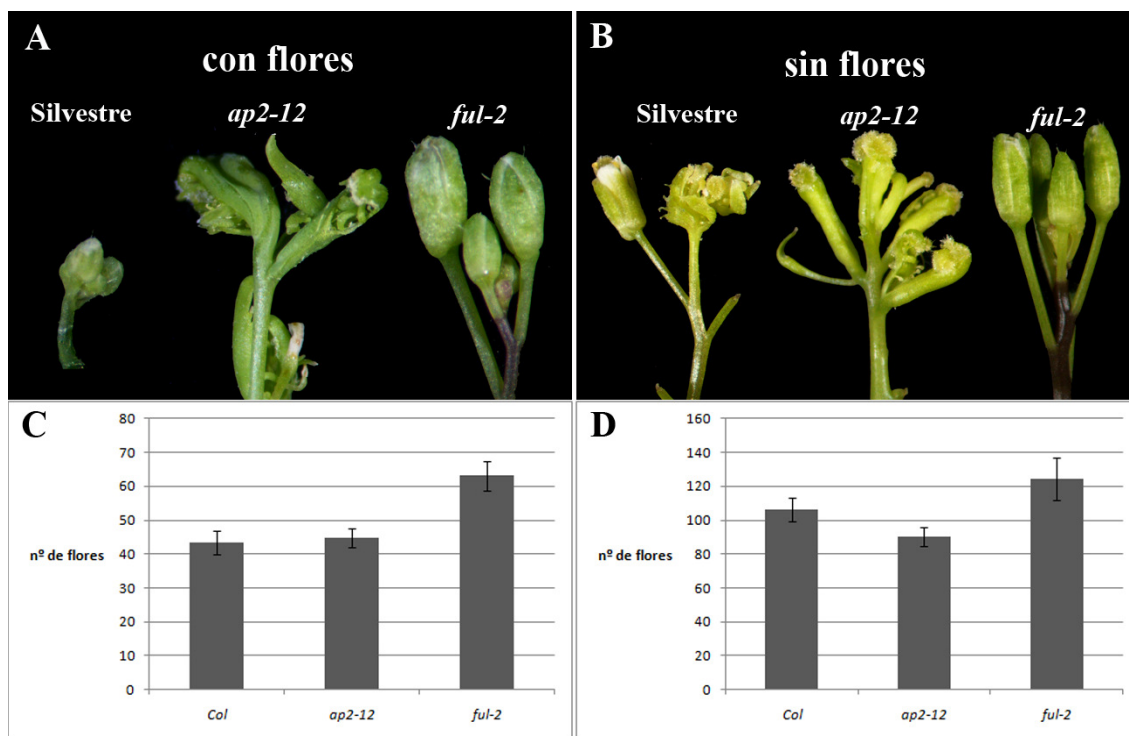


Figura 2-36: El mutante *ap2-12* presenta un GPA alterado. El mutante *ap2-12* produce el mismo número de flores que una planta silvestre (C) pero no desarrolla GPA, terminando el desarrollo de la inflorescencia con la formación de una flor terminal (A). Para establecer si las diferencias se podrían deber a la esterilidad de este mutante decidimos realizar el mismo experimento eliminando todas las flores producidas por las plantas. El mutante *ap2-12* respondió al estímulo generado por la falta de semillas, pero generó la flor terminal antes que las plantas silvestres (B), habiendo producido menos flores que las plantas silvestres (D).

Para determinar si la esterilidad parcial de *ap2-12* podría causar estos fenotipos decidimos provocar la falta de semillas eliminando progresivamente las flores producidas por el SAM del mutante *ap2-12*, comparándolo de nuevo con las plantas silvestres y *ful*. En este experimento también se eliminaron todas las coflorescencias producidas por las plantas. Tras 14 semanas, tanto las plantas silvestres como las plantas *ap2-12*, produjeron la estructura terminal carpelar tras la producción de $106,4 \pm 6,8$ y $90,2 \pm 5,8$ flores respectivamente, mientras que el mutante *ful* no desarrolló esta estructura terminal, presentando un SAM funcional que había producido $124,1 \pm 12,5$ flores en el momento que se detuvo el experimento (Fig. 2-36 B, D). Así, el mutante *ap2-12* respondió a la eliminación de las flores, incrementando el número de flores producidas por el SAM y retrasando la formación de la estructura terminal carpelar, pero menos que las plantas silvestres sometidas al mismo tratamiento.

Estos resultados sugerían que *AP2* podría estar implicado de algún modo en el control del GPA y en el mantenimiento de la identidad del SAM en las últimas etapas del desarrollo de la inflorescencia. Estas funciones de *AP2* podrían desempeñarse de dos modos diferentes: *AP2*

actuaría manteniendo la expresión de *WUS* en el SAM, y a la vez podría estar evitando la expresión ectópica de *AG* en este tejido, impidiendo su determinación.

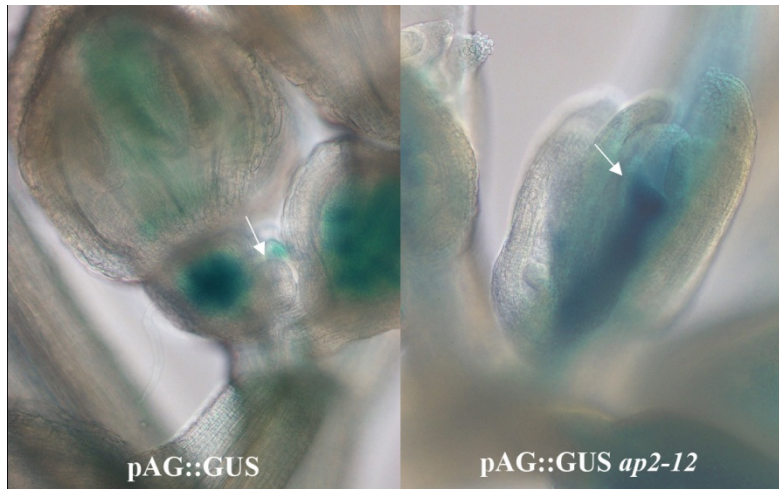


Figura 2-37: La flor terminal producida por el mutante *ap2-12* se origina por la expresión ectópica de *AG* en el SAM. Las flechas indican las posiciones de los SAM.

Puesto que *FUL* controlaba el GPA regulando la expresión de *WUS*, y a la vez podría estar regulando la expresión de *AP2*, una existía la posibilidad de que *FUL* controlara el GPA a través de la regulación de *AP2*.

Por estos motivos decidimos analizar también el GPA en el mutante *AP2¹⁰²* y en su combinación con *ful*. Si *FUL* promoviera el GPA a través de la regulación de *AP2*, el alelo *AP2¹⁰²*, parcialmente resistente a la regulación ejercida por el *miR172*, podría presentar defectos en el GPA similares a los presentados por *ful*, y opuestos a los mostrados por el mutante *ap2*. Del mismo modo, en la combinación *ful AP2¹⁰²*, deberíamos encontrar un efecto aún mayor, ya que nuestra hipótesis establece que deberían existir mayores niveles de *AP2*. Al realizar este experimento se observó que las plantas silvestres produjeron una media de $38,7 \pm 4,3$ flores, mientras que las plantas *AP2¹⁰²*, *ful* y *ful AP2¹⁰²* produjeron una media de $65,3 \pm 7,4$, $70,8 \pm 8,2$ y $104,3 \pm 7,1$ flores respectivamente (Fig. 2-38). Estos resultados mostraban un efecto de la mutación *AP2¹⁰²* en el mantenimiento del SAM, que al igual que *ful*, generaba un incremento del número de flores producidas por la planta. La combinación *ful AP2¹⁰²* mostraba una mayor producción de flores que ambas líneas por separado, además de presentar los fenotipos de indeterminación de meristemo floral descritos previamente. Estos resultados apoyaban nuestra hipótesis, donde *FUL* podría regular el GPA a través de *AP2*.

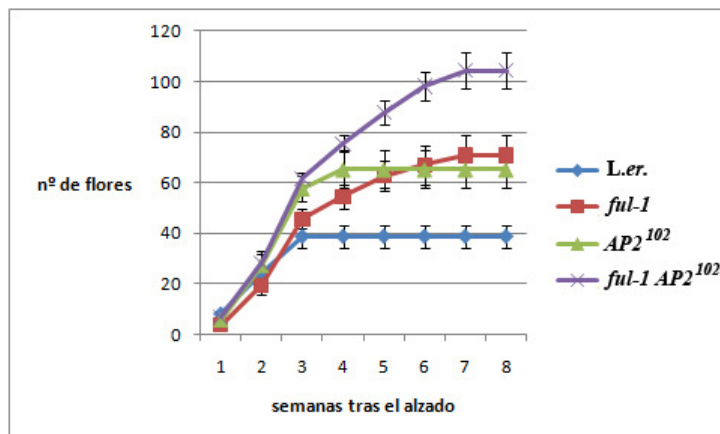
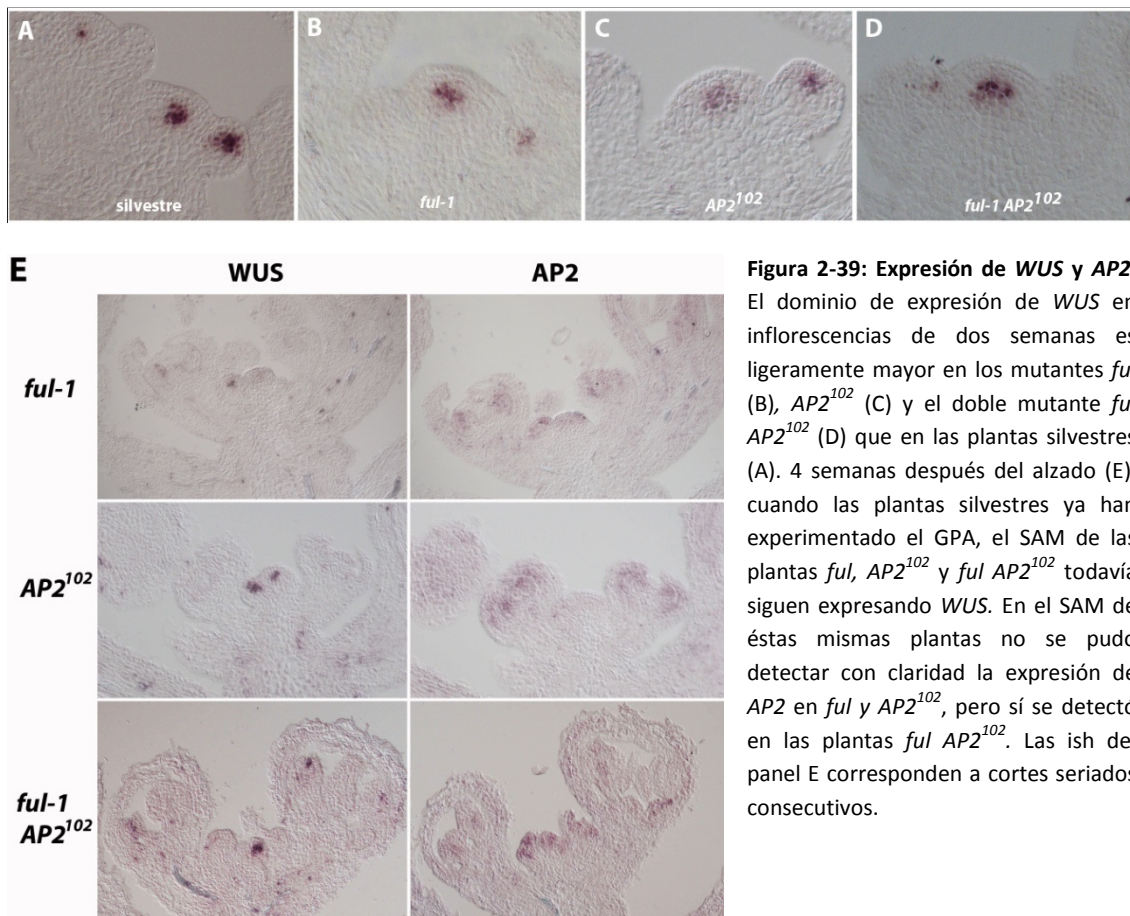


Figura 2-38: *FUL* y *AP2* controlan el GPA. Tanto el mutante *ful* como el alelo *AP2¹⁰²* producen más flores que las plantas silvestres. La combinación de ambos mutantes provocan un gran retraso del GPA.

El hecho de que la línea *AP2¹⁰²* no presentara fenotipos de indeterminación en el meristemo floral mientras que sí que lo hiciera en el SAM nos sugería la posibilidad de que el papel de AP2 en la regulación de *WUS* podría tener una importancia relativa diferente en ambos tipos de meristemas. Por otro lado, también podríamos pensar que el SAM podría ser más sensible a los niveles de AP2 de forma que mientras que un pequeño incremento de los niveles de AP2 no tendría un efecto claro en el meristemo floral, sí que lo podría tener en el SAM.

Al monitorizar la expresión de *WUS* en el SAM de estas plantas se observó que los niveles de *WUS*, dos semanas después del alzado de la inflorescencia, parecían ligeramente superiores en los SAM de las líneas *ful-1*, *AP2¹⁰²* y *ful AP2¹⁰²* al compararlos con los de las plantas silvestres (Fig. 2-39), indicando que su efecto en la longevidad o incremento en la producción de flores podría estar mediado por este incremento en los niveles de *WUS*.



Cuatro semanas después de alzado de la inflorescencia, cuando las plantas silvestres ya habían experimentado el GPA, todavía se detectó expresión de *WUS* en el SAM de las plantas *ful*, *AP2¹⁰²* y *ful AP2¹⁰²* (Fig. 2-39 E).

La expresión de *AP2* no se detecta en el SAM de las plantas silvestres mediante la técnica de ISH, aunque si se detecta su proteína (Wollmann et al., 2010), indicando que se expresa a niveles inferiores al umbral de detección de esta técnica. En los mismos apices utilizados en la detección de *WUS* a las 4 semanas del alzado, y de acuerdo con los datos encontrados en la bibliografía, no se pudo detectar la expresión de *AP2* en el SAM de las plantas *ful-1* y *AP2¹⁰²* (Fig. 2-39 E), pero sí que se detectó en las plantas *ful-1 AP2¹⁰²* (Fig. 2-39 E). El hecho de no

detectar expresión de AP2 en el SAM de *ful-1* y *AP2¹⁰²* podría deberse a que el posible incremento en la expresión de AP2 esperado todavía estuviera por debajo de los niveles de detección de la técnica empleada, pero la desregulación ocurrida en la combinación de ambas líneas sí que pudo ser detectada en el SAM, indicando una cierta desrepresión de AP2 en las plantas *ful AP2¹⁰²*.

FUL se une al promotor de AP2

Ya que FUL parecía estar regulando la expresión de AP2, decidimos comprobar si esta regulación podría ser directa, mediante un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina. Mediante este experimento pudimos determinar que FUL se unía a la región promotora de AP2 en dos regiones diferentes, ambas ubicadas en la región promotora en 5', aproximadamente a 1,8 Kb y 4,2 Kb del inicio del gen, obteniendo enriquecimientos del orden de 8 y 5 veces respecto a las plantas control respectivamente (Fig. 2-40).

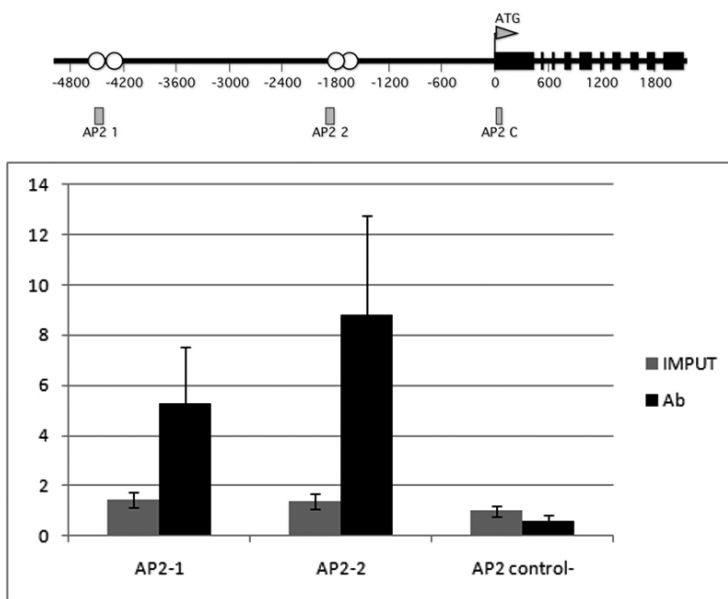


Figura 2-40: Experimento de ChIP sobre el promotor de AP2. FUL se une a la región promotora de AP2 en dos regiones diferentes ubicadas a 1,8 y 4,2 Kb del ATG de AP2.

Estos resultados apoyarían la hipótesis de una regulación directa de AP2 por FUL, y que la acción conjunta de FUL y el miR172 controlarían los niveles de AP2 tanto en el SAM como en los meristemas florales.

ful ap2-12

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaban que FUL controlaba el GPA dirigiendo el apagado de la expresión de WUS. Esta regulación de WUS posiblemente estaba mediada por la represión directa del gen AP2. Una forma de testar esta hipótesis era mediante la realización de la combinación genética *ful ap2-12*. En este doble mutante, si los fenotipos relacionados con la indeterminación del SAM se debían a la presencia de AP2, éstos deberían desaparecer, tal y como ocurrió en las plantas *FUL:VP16 ap2-2*. Al analizar los fenotipos de las plantas *ful ap2-12* se observó que *ap2-12* no era 100% epistático a *ful ap2-12*. Estas plantas presentaban los defectos característicos del mutante *ap2-12* durante el desarrollo floral (Fig. 3-41 A y B), pero la inflorescencia principal producía un número de flores similar al producido por las plantas *ful*, aunque en ocasiones el SAM de estas plantas terminaba con la formación de una estructura terminal de tipo carpelar (Fig. 3-41 C). Este resultado sugería que, aunque FUL podía controlar el GPA a través de AP2, éste no debía ser el único modo existente. Puesto que AP2

forma un clado junto con *TOE1*, *TOE2*, *TOE3*, *SMZ* y *SNZ*, con los que muestra similitudes tanto en su secuencia como en su regulación y función (Aukerman y Sakai, 2003; Mathieu et al., 2009; Schmid et al., 2003; Yant et al., 2010), podríamos pensar que en ausencia de *FUL* algunos de los genes pertenecientes a este clado estuvieran reemplazando a *AP2* en el SAM.

Nuestro laboratorio ha tenido acceso a los resultados preliminares de un experimento de ChIP-seq realizado por el laboratorio de G. Angenent (Wageningen, Holanda). Este experimento muestra que *FUL*, además de unirse al promotor de *AP2* en las regiones descritas, también lo hace en los promotores de 3 genes más incluidos en el clado de *AP2*, en concreto a *SNZ*, *TOE1* y *TOE3*, por lo que *FUL* podría estar mediando también la represión de estos genes. De este modo, en el mutante *ful*, además de existir niveles altos de *AP2*, también podrían estar elevados el resto de miembros de este clado, interfiriendo en el GPA.



Fig. 3-41: *ful ap2-12*. Las plantas *ful ap2-12* (B) presentaban los defectos típicos de los mutantes *ap2* (A), con la conversión de pétalos y sépalos en estructuras carpelares. las plantas *ful ap2-12* producen un número similar de frutos a los producidos por las plantas *ful*, pero en ocasiones, los SAM de las plantas *ful ap2-12* se determinaban produciendo una flor terminal de naturaleza carpelar, de la que se muestran dos ejemplos (C), al igual que lo hacen las plantas *ap2*.

Discusión

En este capítulo de tesis se ha identificado una nueva función del gen *FUL* en el control de la longevidad del SAM de *Arabidopsis thaliana*, a través de la regulación indirecta del gen de identidad meristemática *WUS*. Nuestros resultados indican que *FUL* participa en el control temporal de la expresión de este gen en el SAM, estableciendo así el final de la actividad meristemática y el subsiguiente GPA.

FUL se expresa tanto en el SAM como en los meristemas florales, solapando su expresión con la de *WUS* (Fig. 3-42 A), pero su requerimiento en el control de la terminación meristemática parece ser diferente en cada tipo de meristemo.

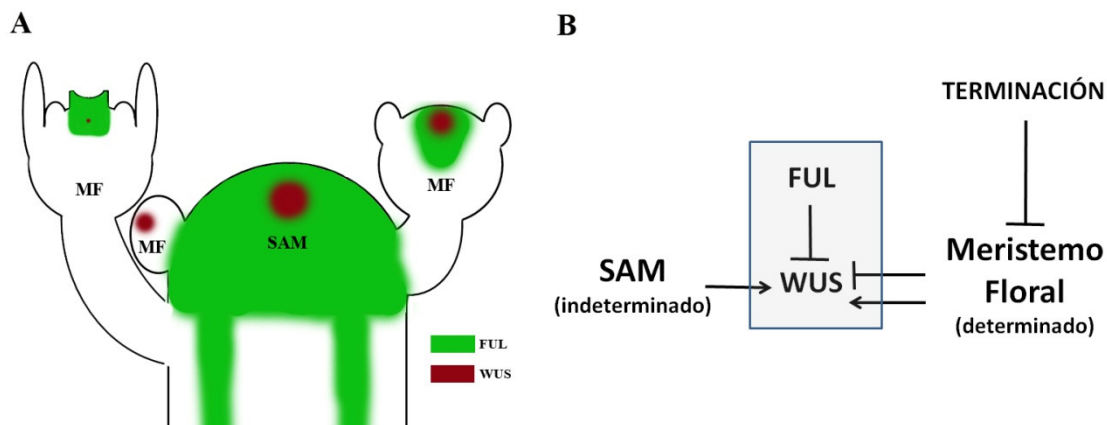


Figura 2-42: La expresión de *FUL* y *WUS* se solapan en el centro del SAM y del meristemo floral (MF) (A). La principal diferencia entre el SAM y los meristemas florales es la determinación. EL SAM es un meristemo indeterminado que produce continuamente nuevos órganos, mientras que los meristemas florales son determinados, produciendo un número concreto de órganos antes de agotar la población de células meristemáticas. *FUL* regula la función de ambos tipos de meristemas participando en la regulación de *WUS* (B), pero el efecto de su ausencia sólo es apreciable en el SAM.

Mientras que el mutante *ful* presenta un claro fenotipo en el SAM, que se mantiene durante más tiempo activo, es afenotípico en el meristemo floral, no presentando ningún defecto en la terminación de estos meristemas. La razón de esta diferencia puede estar en la naturaleza de cada meristemo. El SAM, por definición, se considera un meristemo indeterminado ya que no se diferencia y mantiene su identidad hasta el final de la vida de la planta, mientras que los meristemas florales son determinados, diferenciándose en estructuras finales concretas que agotan las células meristemáticas disponibles (Fig. 2-42 B). Aunque ambos tipos de meristemas comparten mecanismos de regulación, donde el gen *WUS* es imprescindible, el hecho de que los meristemas florales sean determinados implica una regulación adicional frente al SAM. Los meristemas florales deben estar activos el tiempo suficiente como para proporcionar un número de células necesario que asegure el desarrollo de los diferentes órganos que compondrán la flor. A su vez, la actividad meristemática debe pararse en el momento adecuado para no alterar el desarrollo de los últimos órganos que se producen durante el desarrollo floral, los carpelos. Las alteraciones en el desarrollo de los carpelos comprometen la supervivencia de la planta ya que en ellos se desarrollarán los óvulos que originarán las semillas. Por este motivo, la terminación de los meristemas florales debe estar altamente regulada y controlada, por lo que posiblemente existan mecanismos adicionales que aseguren el correcto apagado de la expresión de *WUS*. En este contexto, *FUL* podría participar en el control de la actividad meristemática de ambos tipos de meristemas, reprimiendo la expresión

de *WUS* (Fig. 2-42 B), pero mientras que en el meristemo floral funcionaría redundantemente con otros genes, que serían capaces de suplir su ausencia, en el SAM su función sería posiblemente más importante, donde su ausencia si provoca alteraciones en la regulación meristemática.

***FUL* tiene un papel en el control de la determinación del meristemo floral.**

Un gen clave en el control de la determinación del meristemo floral es *AG* (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001) que reprime la expresión de *WUS* en el meristemo floral a través de *KNU* (Sun et al., 2009). Además se han identificado diferentes genes que participan en este proceso cuyas pérdidas de función retrasan o impiden la terminación del meristemo floral (Prunet et al., 2009). Muchas de estas mutaciones, al igual que *ful*, no presentan fenotipo por si solas en la terminación de los meristemas florales, indicando la existencia de posibles mecanismos de regulación redundantes implicados en la determinación del meristemo floral. Muchos de estos mutantes presentan fenotipos de indeterminación severos cuando se reducen los niveles de *AG* (como en el plantas *ag/+*), indicando que o bien participan en la regulación de *AG*, contribuyendo a que existan niveles suficientes de este regulador, o bien que participan en paralelo a *AG* y su papel es mas evidente en ausencia de niveles optimos de *AG*. El mutante *ful*, a diferencia de estos mutantes, no incrementa la indeterminación del heterocigoto *ag*, pero sí que lo hace al combinarse con ellos. Estos resultados sugieren que la función de *FUL* en el control de la terminación del meristemo floral podría depender de *AG*.

FUL* controlaría la determinación del meristemo floral junto a *AG

Además, el mutante *ag* resultó ser epistático al doble mutante *ful ag*, lo que podríamos interpretar como si *FUL* actuara aguas arriba de *AG* en la determinación de los meristemas florales, y que por lo tanto, podría participar en su regulación. Sin embargo, la opción de una posible regulación directa de *AG* por *FUL* se puede descartar a partir de los resultados obtenidos con el alelo *FUL:VP16* en combinación con *ag*. La línea *FUL:VP16* en un fondo *ag* heterocigoto presentó severos defectos en la terminación del meristemo floral. Si *FUL* regulara directamente a *AG* para que se alcanzaran los niveles adecuados de expresión de *AG* en el meristemo floral, en la línea *FUL:VP16* esperaríamos una mayor activación de *AG* que pudiera corregir los defectos presentados por las plantas heterocigotas para *AG*.

Cuando la línea *FUL:VP16* se hallaba en un fondo *ag*, obteníamos de nuevo la epistasia de *ag*. La epistasia de *ag* en *ful ag* y *FUL:VP16 ag* sugiere que es necesaria la presencia de *AG* para el papel de *FUL* en la terminación del meristemo floral, bien por que funcionarían en un mismo complejo, bien porque la presencia de *AG* proporcionara en ambiente adecuado para la función de *FUL*, por ejemplo activando la expresión de otros genes necesarios para su actividad.

La opción de que *FUL* y *AG* formaran parte de un mismo complejo regulador estaría respaldada por la existencia de interacción entre ambas proteínas, que participarían en la represión de *WUS*. Sin embargo, los datos genéticos de los que disponemos sugieren que *FUL* participa en una ruta diferente a la descrita para *AG*. Al combinar el mutante *ful* con el mutante *knu*, obtuvimos un fenotipo más fuerte que el mostrado por el mutante *knu* por sí solo. Ya que *KNU* es un efector de la represión de *WUS* mediada por *AG*, el incremento de fenotipo observado en el doble mutante apunta a un papel de *FUL* independiente de esta ruta, sugiriendo la

posible existencia de una ruta paralela independiente de *KNU* donde estarían implicados *FUL* y posiblemente *AG*. Los fenotipos observados en las plantas *FUL:VP16 ag/+* serían pues el reflejo de una escasa activación de *KNU* debida a los bajos niveles de *AG* y de la acción conjunta de *FUL:VP16* y *AG* sobre otro gen diana.

Por otro lado, se podría considerar que el dímero *FUL-AG* detectado en este trabajo podría estar simplemente implicado en otros procesos del desarrollo, como el desarrollo del gineceo. Esta hipótesis sugeriría un papel de *FUL* completamente independiente de *AG* en la regulación de la determinación del meristemo floral, pero de ser cierta, deberíamos observar un incremento de la indeterminación del meristemo floral en las plantas *FUL:VP16 ag*, como se observa en otras combinaciones de *ag* con mutantes que participan en otras rutas independientes como podría ser *ag clv3* (Clark et al., 1993).

La explicación más plausible sería que *FUL* participara redundantemente en la regulación negativa de algún gen implicado en el mantenimiento del meristemo. Esta última hipótesis estaría de acuerdo con todos los resultados genéticos obtenidos; en *ful* no observaríamos fenotipos en la terminación del meristemo floral al quedar enmascarado por otros factores redundantes en la regulación de su gen diana. Esta función de *FUL* podría depender de *AG*, pero participaría en una ruta diferente a la establecida por *KNU* ya que la ausencia de *FUL* incrementa el fenotipo de indeterminación del mutante *knu*. El incremento del fenotipo de indeterminación observado en la línea *FUL:VP16 ag/+* se debería a un efecto sinérgico en el incremento de la expresión del gen diana de *FUL* y a la escasa activación de *KNU* (Fig. 2-43).

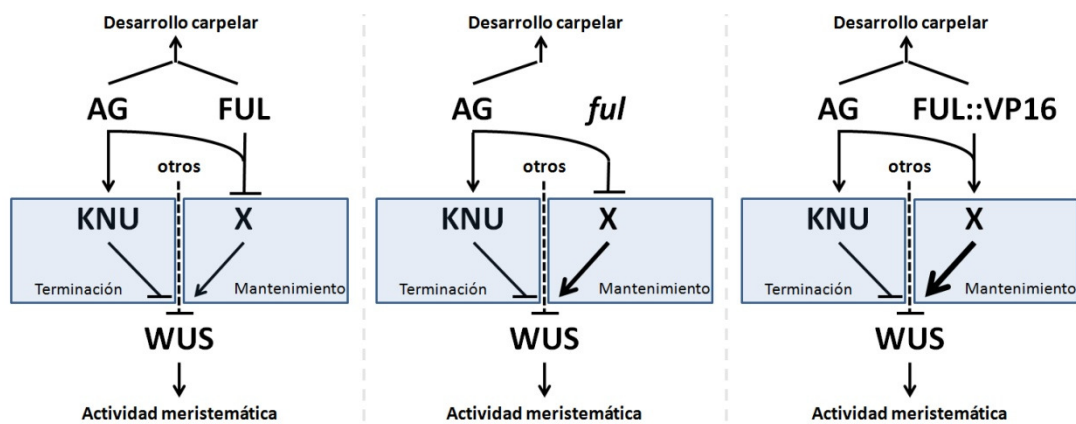


Figura 2-43: FUL controla la actividad del meristemo floral regulando negativamente los procesos que mantiene activa la expresión de *WUS*. El dímero *FUL-AG* regularía la expresión de *WUS*, aunque a través de una ruta diferente a la establecida por *KNU*. Esta interacción podría ser relevante en otros procesos del desarrollo también. La hipótesis en la que *FUL* se comporta como un represor de los procesos de mantenimiento de la expresión de *WUS* concuerda perfectamente con los fenotipos observados en el mutante *ful* y la línea *FUL:VP16*.

FUL regula la expresión de *AP2* en el meristemo floral

El trabajo realizado durante esta tesis con el nuevo alelo de *AP2*, *AP2¹⁰²*, ha permitido establecer que *AP2* podría ser una diana directa de *FUL*, y que *FUL* participaría en su represión durante la terminación de los meristemos florales, entre otros procesos. Como hemos comentado, en los meristemos florales deben existir dos tipos de estímulos: uno que promueva la actividad del meristemo para asegurar una cantidad de células adecuada y otro final que termine con esta actividad y asegure la correcta determinación de éste. *AG* y *AP2*

juegan un papel clave en la regulación de la actividad del meristemo floral. *AG* es un gen homeótico responsable de la identidad de estambres y carpelos, que participa en la represión de *WUS* (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001), y *AP2*, que también está considerado un gen homeótico implicado en el desarrollo de sépalos y estambres, participa en el mantenimiento de la expresión de *WUS* (Wurschum et al., 2006). *AP2*, dentro del modelo ABC propuesto para explicar el desarrollo floral, pertenece al grupo de genes de tipo A mientras que *AG* constituye el único gen descrito en *Arabidopsis* de tipo C (Fig. 2-44 A). Este modelo establece que los genes de tipo A, *AP2*, y de tipo C, *AG*, se autoexcluyen espacialmente, de forma que *AP2*, que se expresa en los dominios exteriores del primordio floral, reprime la expresión de *AG*, y *AG*, que se expresa en los dominios interiores reprime la expresión de *AP2* (Fig. 2-44). Puesto que *FUL* participa en la regulación de *WUS* en el meristemo floral, posiblemente en un proceso dependiente de *AG*, y que tanto *FUL* como *AG* reprimirían la expresión de *AP2*, que actúa activando la expresión de *WUS*, podríamos completar el modelo propuesto anteriormente incluyendo al factor de transcripción *AP2* en él. (Fig. 2-44 B).

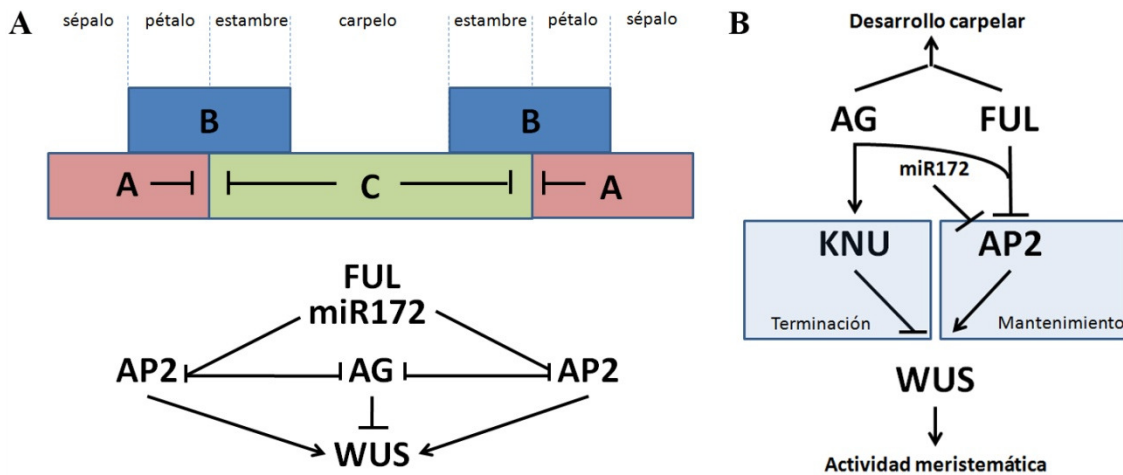


Figura 2-44: La acción conjunta de *FUL* y el *miR172* controlan los niveles de *AP2*. La regulación ejercida por *FUL* sobre *AP2* podría, además de controlar la expresión de *WUS*, limitar la expresión de *AP2* en los dominios centrales del meristemo floral. El modelo ABC explica cómo tiene lugar la compartimentación y adquisición de identidades de los diferentes órganos florales. En el establecimiento del dominio central que dará lugar al carpelo, la expresión de los genes de tipo A, como *AP2*, está reprimida. En este proceso participa el *miR172*. Puesto que *FUL* se expresa justo en este dominio central del meristemo floral podría estar controlando junto al *miR172* la perfecta compartimentación del primordio del carpelo restringiendo la expresión de *AP2* a los dominios exteriores del meristemo floral, permitiendo la acción de *AG*.

Este modelo sugiere además un papel de *FUL* en el correcto establecimiento del cuarto verticilo del meristemo floral al participar en la exclusión de *AP2* en este dominio (Fig. 2-44 A).

FUL* actúa redundantemente con el *miR172* en la represión de *AP2

La represión de *AP2* en los dominios centrales del meristemo floral por *AG* y *FUL* contribuiría al correcto apagado de *WUS* de dos modos: evitando la activación de *WUS* por *AP2* y permitiendo que *AG* se exprese al nivel adecuado para que medie la terminación del meristemo (Zhao et al., 2007).

El *miR172* juega un papel clave en el control de los niveles de *AP2*, ya que es capaz de restringir la expresión de *AP2* incluso en ausencia de *AG* (Chen, 2004; Wollmann et al., 2010; Zhao et al., 2007) (Fig. 2-44). Además, la represión de *AP2* en los dominios centrales del

meristemo floral requiere de la presencia de este miRNA, ya que formas resistentes de *AP2* a la regulación ejercida por este miRNA presentan defectos severos de indeterminación en el meristemo floral en presencia de *FUL* y *AG* (Zhao et al., 2007). De este modo, la acción conjunta de la regulación mediada por *FUL* y por el miR172 podría ser la responsable de limitar la expresión de *AP2* a los verticilos exteriores del meristemo floral, permitiendo la determinación. La ausencia de fenotipos de indeterminación en el mutante *ful* se ha explicado mediante la posible existencia de una regulación redundante de sus dianas. Uno de estos factores redundantes podría ser el miR172 (Fig. 2-44 B), como sugiere el fenotipo de los mutantes *AP2*¹⁰² y su combinación con los alelos de *FUL*. La dependencia de los fenotipos de indeterminación en el meristemo floral de la ausencia de *FUL* o del cambio de actividad de *FUL* apoya esta idea, indicando que ambos tipos de regulación, transcripcional y postranscripcional, constituyen un robusto control en la determinación del meristemo floral. *FUL* controlaría la expresión de *AP2* reprimiéndolo, mientras que el miR172 podría estar regulando los niveles *AP2*, bien por degradación del mensajero, o bien impidiendo su traducción (Fig. 2-44 B).

***FUL* controla la longevidad del SAM**

Naturaleza del SAM en Arabidopsis

El SAM de Arabidopsis es indeterminado, por lo que aparentemente no existen rutas reguladoras que controlen su terminación. De hecho, el SAM de Arabidopsis no sufre un proceso en el que se agoten todas las células meristemáticas, si no que experimenta un proceso de parada conocido como GPA (Hensel et al., 1994). El GPA, en Arabidopsis, está altamente relacionado con la producción de semillas de la planta, ya que el momento en que se produce depende de si se ha conseguido un número determinado de semillas que aseguren el éxito reproductivo (Hensel et al., 1994). Si no se alcanza esta cantidad de semillas, como en mutantes estériles o parcialmente estériles, el SAM continuara produciendo flores, aunque ya no de forma indefinida. Curiosamente, en estas condiciones el SAM se vuelve determinado, consumiéndose el reservorio de células meristemáticas en la formación de una estructura terminal de naturaleza carpelar, que como hemos mostrado en los resultados de esta tesis, implica la expresión ectópica de *AG* en el SAM.

Estas observaciones sugieren que tal vez el SAM de Arabidopsis podría no ser realmente un meristemo indeterminado. Evolutivamente se considera que las inflorescencias abiertas o indeterminadas aparecieron a partir de meristemas determinados donde se produjo la represión de los genes de identidad floral (Coen y Nugent, 1994; Prusinkievitz et al., 2007). *Arabidopsis thaliana*, un ejemplo clásico de inflorescencia indeterminada, podría retener todavía un SAM determinado, cuya naturaleza quedaría oculta por el GPA, que provoca el cese de toda actividad meristemática. En plantas esteriles, donde el GPA no se establece y el meristemo continua con su actividad acabaríamos observando la determinación del SAM. De este modo, la estrategia seguida por Arabidopsis para adquirir una inflorescencia indeterminada podría haber sido retrasar la determinación del SAM, incrementando así su producción de semillas.

***FUL* y *AP2* modulan el GPA**

Además de la posible regulación del GPA por la producción de semillas, existen evidencias de que el GPA podría estar controlado genéticamente. Así, dentro de un mismo ecotipo de

Arabidopsis se produce una cantidad similar de frutos/semillas por planta, que es característico de ese ecotipo en concreto (Hensel et al., 1994). A partir de estudios en diferentes especies se ha propuesto que el GPA, y en general, la senescencia monocárpica, podría estar mediada por diferentes causas, aunque ninguna de ellas se ha demostrado y aceptado de forma general. Entre las causas más aceptadas destacan dos, la disponibilidad y movilización de nutrientes, donde los frutos actuarían como fuertes sumideros de recursos provocando la muerte de la planta, y la posible existencia de una “hormona de la muerte” que dirigiría este proceso (para una explicación más detallada ver Wilson, 1997; Bleecker y Patterson, 1997), donde las citoquininas podrían jugar un papel relevante, ya que se han relacionado con el retraso de la senescencia monocárpica (Nooden et al. 1990) y además juegan un papel clave en el mantenimiento del SAM. La gran mayoría de trabajos existentes en este campo son estudios fisiológicos, que se llevaron a cabo en diferentes especies, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, encontrándose evidencias a favor y en contra para cada una de las dos opciones mencionadas. A pesar de que este tema se ha abordado durante largo tiempo, no existe hasta la fecha ninguna aproximación genética ni modelo molecular que explique cómo se desencadena y regula este proceso.

Durante este trabajo de tesis se ha observado que las mutaciones en el gen *FUL*, así como el alelo *AP2*¹⁰², provocan un claro fenotipo en el SAM, ya que se mantiene durante más tiempo activo al retrasarse el GPA. Además, también se ha observado que la ausencia de *AP2* provoca la determinación del SAM con la formación de una estructura terminal carpelar similar a la producida cuando el SAM se determina por ausencia de semillas, pero sin experimentar el incremento en el número de flores producido en condiciones de esterilidad.

Como hemos visto en esta tesis, el GPA ocurre cuando *WUS* deja de expresarse en el SAM, y la formación de la estructura terminal observada en condiciones de esterilidad o en el mutante *ap2* ocurre cuando se expresa ectópicamente *AG* en el SAM. Ya que *FUL* y *AP2* participan en la regulación de los niveles de *WUS* y afectan al GPA, podríamos pensar que al igual que en el meristemo floral, *FUL* estaría controlando la expresión de *WUS* y la actividad del SAM a través de la regulación de *AP2*, estableciendo de este modo el momento del GPA (Fig. 2-45 A). *AP2*, además de mantener la expresión de *WUS* en el SAM, estaría reprimiendo la expresión de *AG* en este meristemo impidiendo su determinación precoz (Fig. 2-45 A). Las relaciones entre estos 4 genes estarían estableciendo la identidad del SAM: la actividad de *AP2* mantendría activo el meristemo activando a *WUS* a la vez que lo mantendría indeterminado reprimiendo la expresión de *AG*. *FUL* controlaría los niveles de *AP2*, consiguiendo reducirlos hasta provocar el cese de la activación de *WUS*, provocando el GPA (Fig. 2-45 B). En situaciones donde los niveles de *AP2* fueran extremadamente bajos, *AG* podría expresarse en el SAM provocando su determinación y la formación de una estructura carpelar terminal. (Fig. 2-45 C).

Al igual que en el meristemo floral, la regulación de *AP2* en el SAM dependería también del miR172, ya que una ligera resistencia de *AP2* a la regulación ejercida por el miR172 fue capaz de retrasar el GPA. Tanto la regulación ejercida por *FUL* como la ejercida por el miR172 sobre *AP2* serían importantes en el control de la actividad del SAM, ya que en la combinación *ful AP2*¹⁰² se observó un retraso mucho mayor del GPA que en los mutantes simples. Las plantas *ful AP2*¹⁰², a pesar de tener la fertilidad seriamente afectada debido a los defectos generados

por la indeterminación de los meristemos florales, no generaron ninguna estructura terminal, indicando que a pesar de la esterilidad el SAM se mantenía indeterminado.

El GPA como fase final del desarrollo de *Arabidopsis*

Las relaciones propuestas entre estos genes podrían explicar tanto el establecimiento del GPA como de la formación de la estructura terminal, pero no explican el momento en el que se dan estos eventos. *FUL* se expresa fuertemente en el momento de la transición floral, aunque en ese momento no es capaz de detener la actividad del SAM. Del mismo modo *AP2* disminuye su expresión también en el momento de la transición floral, aunque esto no provoque que se detenga la actividad del SAM ni se exprese ectópicamente *AG* en él.

Tanto *FUL*, *AP2* como el miR172 se expresan en el SAM, solapando su expresión con la de *WUS*, pero sus niveles varían en función de las etapas de desarrollo de la planta. Los niveles de estos genes están regulados por una ruta endógena que media los cambios asociados a la edad (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009) a través de la relación existente entre dos miRNA, el miR156 y el miR172. El miR156 regula a un grupo de genes pertenecientes a la familia SPL, mientras que el miR172 regula a un grupo de genes pertenecientes a la familia de AP2 (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009). En los estadios iniciales de desarrollo los niveles del miR156 son elevados, mientras que los del miR172 son muy bajos. A lo largo de la vida de la planta este balance se invierte progresivamente, de forma que durante la etapa de desarrollo reproductivo los niveles de miR156 son bajos mientras que los del miR172 son altos, provocando que existan niveles elevados de las proteínas SPL y bajos de las proteínas AP2 (Fig. 2-46 B). La regulación entre estos miR y sus dianas es compleja, ya que existen ciclos de retroalimentación entre ellos. Las proteínas SPL activan al miR156 que las reprime y a su vez activan al miR172, mientras que las proteínas AP2 actúan activando la expresión del miR156 y, según la proteína, también activan o reprimen al miR172, lo que confiere una regulación fina de estos equilibrios (Fig. 2-46 A). De las proteínas tipo AP2 que regulan al miR172, *AP2* funciona reprimiendo su expresión. De este modo, el balance miR156/miR172 controla los cambios de fase en el desarrollo, es decir, controlan el paso entre las diferentes etapas de la vida de la planta (Poethig, 2003; Schwarz et al., 2008; Shikata et al., 2009). Los cambios de fase establecidos por esta ruta se producirán a través de los cambios en la expresión que deben mediar las proteínas AP2 y SPL. Una de las principales dianas de las proteínas SPL es *FUL*, que podría estar mediando en parte los cambios asociados a las proteínas SPL. De acuerdo con el modo de acción de esta ruta endógena de la edad los niveles de expresión de *FUL*, *AP2* y el miR172 irán cambiando paulatinamente con el paso del tiempo, sugiriendo que su efecto en el GPA pudiera depender de unos valores de expresión determinados o la proporción existente entre ellos.

Como hemos razonado anteriormente, el GPA debe estar controlado genéticamente, además de que existe una clara relación entre GPA y edad. En este contexto, tanto *FUL*, *AP2* como el miR172, que hemos identificado como controladores del GPA, actuarían como integradores de ésta ruta endógena de la edad, por lo que el GPA podría considerarse como la última fase de desarrollo de las plantas anuales. Durante esta fase final característica de las plantas monocárpicas, la planta detiene el crecimiento y destina los recursos que posee a finalizar el desarrollo de las semillas producidas antes de la llegada de las condiciones adversas, asegurando así la supervivencia de su descendencia.

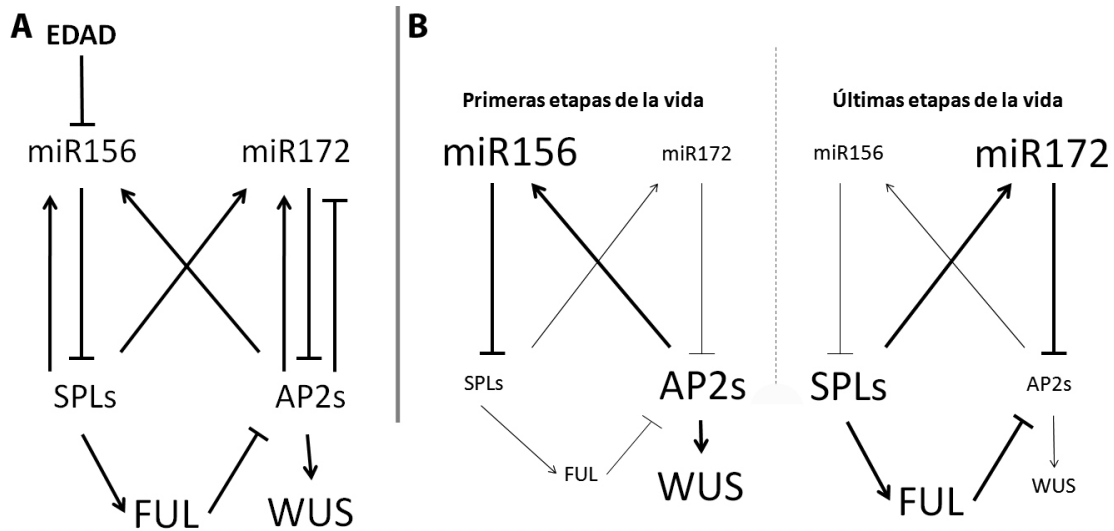


Figura 2-46: La ruta endógena de la edad controla los niveles de *FUL* y *AP2*. La edad de la planta controla el equilibrio entre el miR156, que favorecen estadios juveniles de desarrollo, y el miR172, que favorece el desarrollo reproductivo. La regulación de estos miRNAs afecta a los niveles de los genes que regulan, los *SPL* y los *AP2* (A). Según este modelo, durante las etapas iniciales del desarrollo los niveles de *AP2* serán elevados (B), e irán disminuyendo progresivamente con la edad de la planta, hasta tener niveles muy bajos en las últimas etapas de desarrollo.

Basándonos en las observaciones anteriores, proponemos el siguiente modelo:

Durante las últimas etapas de la vida de *Arabidopsis*, el SAM presenta altos niveles de las proteínas *SPL*. Los altos niveles de *SPLs* facilitan la existencia de altos niveles de *FUL* y del miR172. *FUL* reprimiría la expresión de *AP2* mientras que el miR172 eliminaría los RNA mensajeros de *AP2* o impediría su traducción, provocando una disminución de los niveles de *AP2*. Además de *AP2*, en este proceso, *FUL* podría estar regulando a 3 genes más también regulados por el miR172: *TOE1*, *TOE3* y *SNZ*. La disminución de los niveles de *AP2* en el SAM afectaría a su vez a la expresión de *WUS*, que también disminuiría sus niveles (Fig. 2-47 A). En un contexto temporal, tanto el aumento de las proteínas *SPLs*, de *FUL* y del miR172, como la disminución de *AP2*, se iría produciendo de forma paulatina, cambiándose de forma progresiva sus proporciones. De este modo, en el momento que los niveles de *AP2* estuvieran por debajo de un determinado umbral, observaríamos el GPA (Fig. 2-47 A).

En el mutante *ful* se produciría un retraso en la caída de los niveles de *AP2*, retrasándose así el GPA (Fig.2-47 B). Las mutaciones resistentes a la regulación por el miR172 generarían un efecto similar, al retrasarse también la reducción de *AP2* (Fig.2-47 C).

En el mutante *ap2-12* deberíamos observar una parada de la actividad del meristemo temprana, pero lo que observamos es la formación de una estructura terminal de naturaleza carpelar, similar a la observada en mutantes estériles o cuando se induce la esterilidad (Fig. 2-47 D, E). Esta flor terminal se origina tras la expresión ectópica del gen homeótico *AG*. Además de conferir identidad de carpelo, *AG* participa en la represión de *WUS*. Interesantemente *AG* es una diana directa de *AP2*, que reprime su expresión. *AP2*, además de participar en el mantenimiento de la expresión de *WUS* en el SAM, podría estar evitando que *AG* se expresara ectópicamente en este tejido, contribuyendo de este modo a mantener el SAM indeterminado. Si el SAM de *Arabidopsis* realmente fuera un meristemo inflorescente determinado, con el

transcurso de la vida de la planta, *AG*, como como gen de identidad de órgano floral y como principal efector de la terminación de los meristemos florales, acabaría expresándose en el SAM provocando su determinación.

Esta hipótesis también explicaría la formación de las estructuras terminales carpelares observadas en los mutantes estériles o en las plantas donde eliminamos las flores. La ausencia de semillas provoca que el SAM se mantenga activo más tiempo independientemente de la presencia de la regulación ejercida por *FUL* y *AP2* (Fig. 2-47 A). El hecho de prolongar la vida de la planta permitiría o provocaría una reducción mayor de los niveles de *AP2* suficiente como para permitir la activación de la expresión de *AG* en el SAM, que en condiciones normales no observaríamos (Fig. 2-47 E).

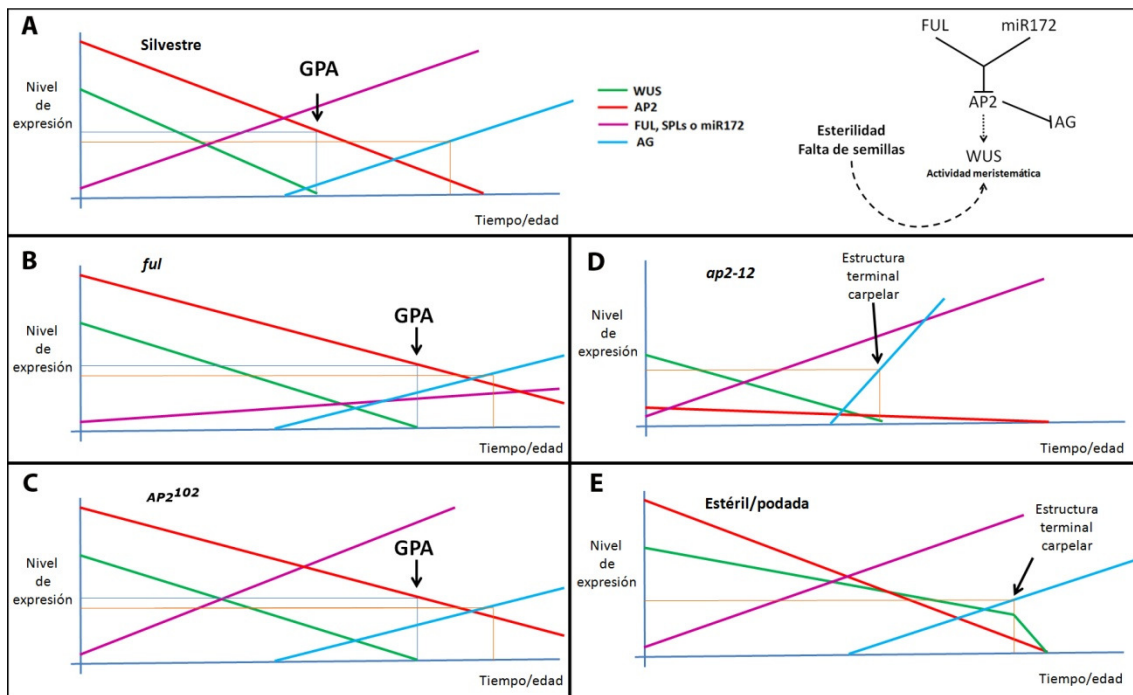


Figura 2-47: Modelos propuestos que explican los fenotipos observados en diferentes condiciones y genotipos. En A se muestra un diagrama de los principales eventos de regulación implicados en el GPA así como una representación de la posible expresión de estos genes durante el desarrollo en las plantas silvestres con el paso de la edad: *WUS* (verde), *AP2* (rojo), *FUL* (morado) y *AG* (azul). Los fenotipos observados en el mutante *ful* (B), *ap2-12* (D), *AP2¹⁰²* (C) o en plantas estériles (E) se explican introduciendo su efecto en el modelo.

La naturaleza del GPA y el origen de la señal relacionada con la producción de semillas es desconocida. Esta señal debe actuar en el SAM, afectando a la regulación de *WUS*. Tanto *ful* como *AP2¹⁰²* retrasan el GPA, y por lo tanto estos genes podrían estar integrando las señales derivadas de las semillas. Sin embargo, estos genes no serían los únicos responsables de integrar éstas señales ya que los mutantes *ful* y *ap2* son capaces de responder al efecto provocado por la ausencia de semillas, por lo que una posibilidad podría ser que parte de esta señal pudiera afectar a la regulación de *WUS* de forma independiente. Por otro lado, la reducida respuesta observada en el mutante *ap2-12* respecto a plantas silvestres, podría indicar cierta participación de este gen en el incremento de la producción de flores. La presencia del resto de miembros del clado AP2, y su posible redundancia en este proceso podría enmascarar el papel de *AP2* (o este clado) en este tipo de respuesta. Si esta hipótesis

fuera cierta, la señal derivada de la producción de semillas podría estar integrada a nivel del miR172. Las semillas estimularían la expresión de este miRNA que reduciría, junto a *FUL* los niveles de proteínas AP2 provocando el GPA. La ausencia de semillas provocaría la existencia de niveles bajos de este miRNA, con el consecuente aumento de las proteínas AP2 y el mantenimiento de la actividad de *WUS*.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

-FUL participa en la regulación de la actividad meristemática, tanto en el SAM como en los meristemas florales, controlando la expresión de *WUS*. Esta regulación la ejerce probablemente mediante la regulación negativa directa del gen *AP2*.

-La regulación de los niveles de *AP2* está controlada de forma conjunta por el miR172, que puede reducir los niveles de su RNA y la traducción de la proteína, y por FUL, que reprime directamente la expresión del gen. Esta acción conjunta contribuye a la regulación de los niveles de la proteína AP2 tanto en el SAM como en el meristemo floral,

-La acción de *FUL* es clave en el establecimiento del hábito de vida anual monocárpico de *Arabidopsis thaliana*, participando activamente en el proceso del GPA. Nuestros resultados suponen la primera evidencia molecular sobre la existencia de un control genético de este proceso observado en multitud de especies vegetales, entre las que se encuentran muchas de interés agronómico. En este proceso FUL podría reprimir de forma gradual la expresión de *AP2* en el SAM, provocando un descenso progresivo de la expresión de *WUS*. Cuando *WUS* deja de expresarse se detiene el desarrollo de la inflorescencia y se produce el GPA.

CAPÍTULO 3: Funciones de FUL durante el desarrollo del fruto

Introducción

Los frutos de las angiospermas son responsables en gran medida del éxito evolutivo de este tipo de plantas, ya que son los responsables de albergar y proteger las semillas durante su desarrollo a la vez que aseguran su dispersión. Por otra parte, presentan un alto interés económico, ya que constituyen una parte muy importante de nuestra alimentación, además de ser la base de numerosos productos secundarios como aceites, fibras o vino.

El fruto se desarrolla principalmente a partir del gineceo, el órgano reproductivo femenino de la flor, y en ocasiones incorpora también otros tejidos u órganos de la flor, en un proceso denominado fructificación, que se inicia con la fertilización de las semillas. El desarrollo del fruto y la formación de las semillas son procesos coordinados que se inician cuando llegan al ovario una serie de señales desencadenadas por la polinización del gineceo y la posterior fertilización de los óvulos (Gillaspy et al., 1993; Vivian-Smith y Koltunow, 1999). Durante la fructificación se produce un aumento general de tamaño y la diferenciación de nuevas estructuras. Este crecimiento se alcanza generalmente mediante una fase inicial donde predominan las divisiones celulares y una fase posterior de expansión celular.

Los frutos presentan una gran diversidad de formas, colores y texturas, que van desde los frutos blandos y frescos, hasta los secos y duros. Los frutos frescos normalmente son dulces, con colores brillantes y generalmente están adaptados para ser ingeridos por vertebrados que se encargaran de dispersar las semillas. Los frutos secos presentan mecanismos de dispersión diferentes, donde el viento, el agua o la fuerza generada por la apertura de los frutos media la dispersión de las semillas.

Los frutos secos se clasifican en dehiscentes e indehiscentes. En los frutos dehiscentes las paredes del ovario se abren para dispersar las semillas al medio, mientras que en los indehiscentes las semillas se mantienen encerradas dentro del fruto y éste se separa de la planta.

El fruto de *Arabidopsis thaliana*

El fruto de *Arabidopsis thaliana* es un fruto seco y dehiscente denominado silicua, similar al de muchas plantas de interés agronómico como el guisante, las judías, las lentejas, la soja y la colza. Se ha propuesto que el fruto ancestral del que habría divergido toda la variedad actual de frutos en las angiospermas sería un fruto seco y dehiscente (Scutt et al., 2006), por lo que el estudio del desarrollo del fruto en *Arabidopsis* resulta de gran interés, tanto para entender los mecanismos básicos que controlan el desarrollo de los diferentes tipos de fruto, como para obtener información que podría ser de aplicación directa en plantas de interés agronómico.

En un gineceo maduro de *Arabidopsis*, a partir del cual se desarrollará el fruto, se pueden distinguir en un eje apical-basal, de arriba hacia abajo, el estigma, compuesto de numerosas células epidérmicas alargadas que se denominan papilas estigmáticas; el estilo, que aparece como un cilindro corto y sólido; el ovario, compuesto por dos valvas conectadas externamente por los repla y dividido internamente en el plano medio por el septum y que forma una cámara bilocular dentro de la cual se encuentran los óvulos; y el ginóforo, que conecta la zona basal del fruto a la base de la flor (Fig. 3-1 A).

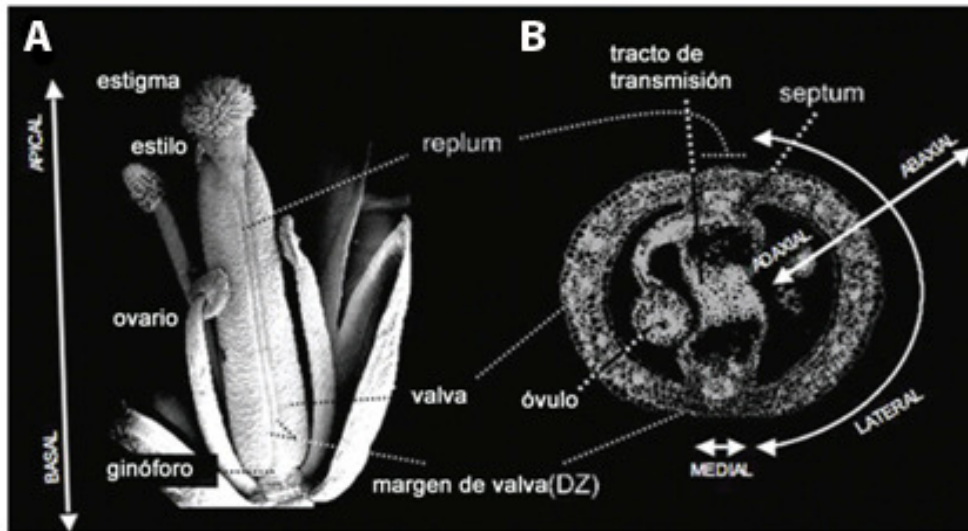


Figura 3-1: Micrografía electrónica de barrido del gineceo de *Arabidopsis* en antesis (A) y sección transversal del ovario (B). Se indican los ejes de polaridad y los distintos tejidos. Modificado a partir de Balanzá *et al* (2006)

En una sección transversal del ovario se puede observar la distribución de tejidos en el eje medio-lateral (Fig.3-1 B). En posición lateral encontramos las valvas, que corresponden a las dos paredes de los carpelos. Dentro de la valva se pueden distinguir varias capas de células: el exocarpo o epidermis externa, que comprende una línea única de células; el mesocarpo, constituido por tres capas de células del clorénquima; y por último el endocarpo, que consiste en dos capas de células diferenciadas: una capa de epidermis interna (*ena*) y una capa de pequeñas células subepidérmicas (*enb*) (Sessions y Zambryski, 1995; Spence *et al.*, 1996). Las valvas acaban en una columna de células pequeñas, que forman una depresión longitudinal denominada margen de valva. En las posiciones mediales del ovario se encuentran el replum (lado abaxial del septum), el septum, la placenta y los óvulos que de ella derivan. Los tejidos marginales muestran polaridad abaxial/adaxial. Las posiciones abaxiales están ocupadas por el replum, y las adaxiales por el septum, el tracto de transmisión, la placenta y los óvulos (Balanza *et al.*, 2006).

Tanto el desarrollo floral como el desarrollo del gineceo en *Arabidopsis* han sido descritos en detalle, dividiéndose este proceso continuo en 20 etapas (Roeder *et al.*, 2005; Smyth *et al.*, 1990). El desarrollo temprano de la flor comprende desde la aparición del meristemo floral (estadio 1) hasta la antesis (estadio 13), momento en el que ocurre la polinización del gineceo. En el estadio siguiente, cuando se produce la fertilización de los óvulos contenidos en el gineceo (estadio 14) (Fig. 3-2), se inicia del desarrollo del fruto. En este momento están presentes todos los tipos celulares que conformaran el fruto maduro.

El desarrollo temprano del fruto en *Arabidopsis* se caracteriza principalmente por su aumento de tamaño, especialmente en longitud (estadios 15 a 17) (Fig. 3-2). Los óvulos recién fecundados inician el desarrollo de las semillas, que a su vez estimulan el crecimiento del fruto. Ambos procesos deben estar sincronizados ya que el crecimiento del fruto proporciona el espacio necesario para que las semillas se desarrollen con normalidad, protegiéndolas hasta que se completa su desarrollo. El crecimiento del fruto tiene lugar mediante procesos de expansión celular principalmente, donde predomina la elongación en dirección apical-basal.

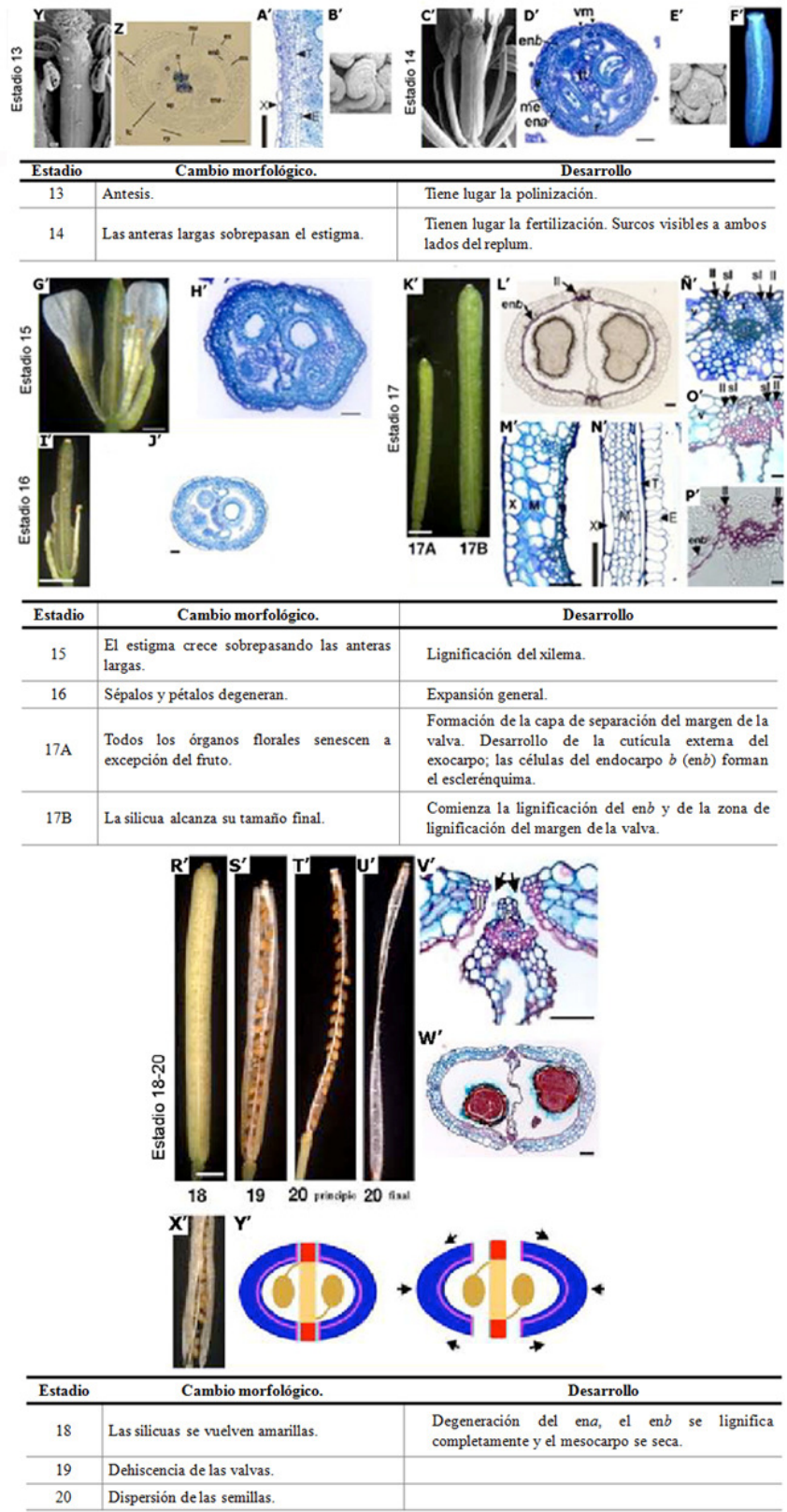


Figura 3-2: Estadios de desarrollo del gineceo de Arabidopsis. Se muestran micrografías electrónicas de barrido, cortes histológicos, fotografías *in vivo* y fotografías en campo oscuro de los distintos estadios de desarrollo del gineceo de *Arabidopsis* con los marcadores morfológicos que caracterizan el inicio de cada estadio. Adaptado de Roeder et al. (2005).

Además del crecimiento, durante el desarrollo del fruto también tiene lugar la diferenciación final de las células del margen de la valva y de la capa *enb*, así como la desintegración de la capa *ena* (estadio 17) (Fig. 3-2). En el margen de valva se definen dos nuevas capas, la capa de lignificación (CL), que al igual que la capa *enb* se lignifica, y la capa de separación (CS), contigua a la CL pero sin apenas acumulación de lignina. La diferenciación de estos tejidos es esencial para que tenga lugar la dehiscencia y dispersión de las semillas. La lignificación de la CL y la *enb*, junto al secado del fruto proporcionan la tensión mecánica necesaria para que las valvas se separen del replum al romperse la CS, dejando expuestas las semillas a la acción del viento que libera y dispersa las semillas (estadios 18 a 20) (Fig. 3-2).

Bases genéticas del desarrollo del fruto.

La mayor parte de los tejidos presentes en el fruto maduro de *Arabidopsis* se diferencian durante el desarrollo del gineceo, del que se tiene una visión bastante detallada gracias al trabajo realizado durante los últimos 20 años.

El primer paso en la formación del gineceo es la adquisición de identidad de órgano reproductivo femenino, que esta mediada por la acción de los genes tipo MADS *AG* y *SEP* (*SEP1*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4*) (Ditta et al., 2004; Honma y Goto, 2001; Pelaz et al., 2000; Yanofsky et al., 1990). Mientras que los genes *SEP* tienen una función general en la especificación de todos los órganos florales, la función de *AG* se limita únicamente al desarrollo de los órganos reproductivos, y en su ausencia, tanto estambres como carpelo se desarrollan como pétalos. Pero *AG* no es el único responsable en especificar el desarrollo del gineceo. En un fondo mutante *ag* todavía se pueden desarrollar tejidos carpelares, aunque sólo con identidad de tejido marginal (Bowman et al., 1991), indicando la posibilidad de una ruta independiente de *AG* en la especificación de la identidad del carpelo. Esta ruta independiente podría deberse a la acción de los genes redundantes, también tipo MADS, *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) y *SHP2*. Los genes *SHP*, implicados en el establecimiento del margen de valva (Liljegren et al., 2000), están estrechamente relacionados con *AG* y se ha descrito que son prácticamente equivalentes a *AG* al nivel funcional, difiriendo únicamente en sus patrones de expresión (Pinyopich et al., 2003). Otros dos genes responsables de la formación de tejido marginal en ausencia de *AG* son *SPATULA* (*SPT*) (Heisler et al., 2001) y *CRABS CLAW* (*CRC*) (Bowman y Smyth, 1999), que posiblemente estén actuando por debajo de los genes *AG* y *SHP*. Mutaciones en estos genes afectan al desarrollo de los tejidos marginales del fruto.

Gran parte de los mecanismos que controlan el desarrollo del gineceo y que concluyen en la diferenciación de los diferentes tejidos que conforman el fruto han sido esclarecidos en los últimos años. En estos procesos participan numerosos genes que a su vez también actúan durante el desarrollo de las hojas, de acuerdo con la idea de que los frutos no son más que hojas modificadas (Goethe, 1790; Honma y Goto, 2001; Pelaz et al., 2001).

El primer paso adoptado en el desarrollo del gineceo, al igual que en el desarrollo de cualquier órgano, es el establecimiento de los ejes adaxial-abaxial y medio lateral. En el establecimiento de esos ejes están implicados los genes de la familia *YABBY* (*YAB*) (Bowman y Smyth, 1999; Eshed et al., 1999; Siegfried et al., 1999), los genes *KANADI* (*KAN*) (Eshed et al., 1999; Kerstetter et al., 2001) y los *AUXIN RESPONSE FACTOR* (*ARF*) *ARF3* y *ARF4* (Pekker et al., 2005; Sessions et al., 1997) que confieren carácter adaxial y los genes *HD-ZIPIII* (class III

homeodomain-leucine zipper) (Alvarez et al., 2006; McConnell et al., 2001; McConnell y Barton, 1998) y *JAGGED* y *NUBBIN* (Dinneny et al., 2006) que confieren carácter adaxial. En el eje medio-lateral se diferencian los tejidos mediales, de donde se desarrollan el estilo, el estigma, la placenta y los óvulos, y los tejidos laterales, que constituirán las valvas y el margen de valva.

Para establecer la distribución de estos tejidos la planta parece haber adoptado el mecanismo regulador que funciona en la separación entre los tejidos diferenciados de los órganos laterales emergentes y los tejidos indiferenciados de la población de células madre del SAM. (Alonso-Cantabrana et al., 2007; Dinneny et al., 2005). Así, en la zona medial se expresan genes pertenecientes a la familia KNOX, como *STM*, *BREVIPEDICELUS (BP)*, *KNAT2* y *KNAT6* (Long et al., 1996; Ori et al., 2000; Pautot et al., 2001), y de la familia BELL, como *REPLUMLESS (RPL)* (Roeder et al., 2003), que están implicadas en el mantenimiento de la función del SAM (Bhatt et al., 2004; Byrne et al., 2003; Smith y Hake, 2003). Por otra parte, en las zonas laterales del gineceo se expresan genes como *AS1* y *AS2* (Byrne et al., 2000; Semiarti et al., 2001). Los genes *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* y *AS2* que participan en la exclusión de los genes *KNOX* de los nuevos primordios desarrollados a partir del SAM (Hay et al., 2006; Ori et al., 2000; Semiarti et al., 2001). La relación antagonista entre los genes *KNOX* y los factores *AS* (Byrne et al., 2000; Byrne et al., 2002) también se observa en el gineceo entre los tejidos mediales y los laterales, regulando el establecimiento de su eje medio lateral (Alonso-Cantabrana et al., 2007; Dinneny et al., 2005; Ragni et al., 2008).

Una vez establecidos los ejes de simetría se inicia el desarrollo de los diferentes tejidos que conformarán el fruto. Los mismos genes que participan en el establecimiento de los ejes de simetría inician la diferenciación de estos tejidos. Se ha propuesto que *FIL*, *YAB3* y *JAG* activan la expresión de *FUL* y *SHP* (Dinneny et al., 2005) en función de su concentración: Niveles altos de estos genes activan a *FUL* mientras que niveles bajos de estos activan a *SHP*. *FUL* se expresa en el tejido que dará lugar a las valvas mientras que los genes *SHP* se expresan en la zona del margen de valva. Posteriormente, *FUL* restringe la expresión de los genes *SHP* a la zona de margen de valva. Por otro lado *RPL* impide la expresión de *SHP* en la zona del replum al reprimir a los genes *FIL* y *YAB3* que activan su expresión. La regulación entre estos genes permite el establecimiento de los diferentes tejidos encontrados en el eje medio lateral: *FUL* contribuye al establecimiento de las valvas, los genes *SHP* al establecimiento del margen de valva y *RPL* al establecimiento del replum. En la zona del margen de valva, *SHP* activa la expresión de *INDEHISCENT (IND)* y *ALCATRAZ (ALC)*, que participan en la formación de la zona de dehiscencia, formada por la CL y la CS. (Fig. 3-3).

A partir de los tejidos mediales se desarrollan todos los tejidos marginales: replum, septum, estigma, estilo, tracto de transmisión y placenta. Al igual que ocurre con el establecimiento de los ejes de simetría, muchos de los genes implicados también participan en el desarrollo de otras partes de la planta, como los genes *LEUNIG (LUG)*, *AINTEGUMENTA (ANT)* *SEUSS (SEU)* o *FIL* (Azhakanandam et al., 2008; Chen et al., 2000; Chen et al., 1999; Franks et al., 2006; Krizek et al., 2000; Liu et al., 2000; Nole-Wilson y Krizek, 2006). *LUG*, *ANT* y *SEU* genes están implicados en el desarrollo de prácticamente todos los tejidos marginales. Por debajo de ellos estarían funcionando otros genes como los *STYLISH (STY)* (Kuusk et al., 2002; Sohlberg et al., 2006) o los *NGATHA (NGA)* (Alvarez et al., 2009; Trigueros et al., 2009), implicados

principalmente en el desarrollo del estilo y estigma; los *HECATE* (Gremski et al., 2007), que participan en el desarrollo del tracto de transmisión, septum y estigma; *SPT* importante en la formación del tracto de transmisión y otros tejidos marginales como el estilo, estigma y replum; o *NON TRANSMICTING TRACT (NTT)* (Crawford et al., 2007) que afecta exclusivamente a la formación del tracto de transmisión. Muchos de estos genes a su vez, presentan una clara relación con la hormona vegetal Aux, ya que los fenotipos de sus mutantes o bien recuerdan a mutantes afectados en esta hormona, o bien son rescatados con tratamientos que afectan a los niveles de esta hormona (Staldal et al., 2008).

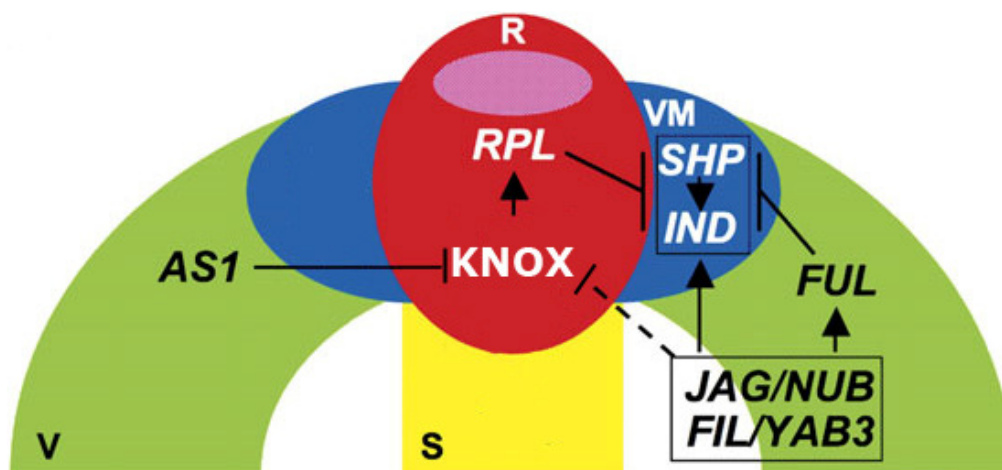


Figura 3-3: Rutas genéticas en el eje medio-lateral del gineceo. Genes asociados al meristemo como *los KNOX* y *RPL* se expresan en la región medial del replum (rojo), antagónicamente a los genes *AS*, *JAG* y *YAB* que se expresan en la valva (verde). Estableciendo el límite entre valva y replum, se expresan los genes de la zona de dehiscencia *SHP* e *IND*. (VM) margen de la valva. (V) valva. (S) septum. (R) replum Las líneas continuas indican interacciones genéticas que se han demostrado y las discontinuas posibles interacciones. Modificado de (Girin et al., 2009)).

Control hormonal del desarrollo del fruto.

Desarrollo del gineceo

La hormona Aux, tiene un papel clave en el desarrollo del gineceo y en el establecimiento del eje de simetría apical-basal. Las mutaciones en *ETTIN (ETT)/ARF3* y *ARF4*, genes de respuesta a auxinas, presentan fuertes alteraciones en el establecimiento de este eje, con un aumento de las regiones apicales (estilo/estigma) y basales (ginóforo) y un ovario muy reducido (Hunter et al., 2006; Pekker et al., 2005; Sessions et al., 1997; Sessions y Zambryski, 1995). Por otro lado, mutantes afectados en el transporte o en la señalización de auxinas como *pinoid (pid)* o *pinformed (pin)*, en la biosíntesis de la hormona, como los genes *yucca (yuc)*, así como la inhibición del transporte polar de auxinas mediante la aplicación de sustancias químicas, como el ácido naftilftalámico (NPA), transforman el gineceo en una estructura similar a un cilindro, con simetría radial y regiones apicales y basales alargadas y ovarios reducidos (Bennett et al., 1995; Cheng et al., 2006; Nemhauser et al., 2000; Okada et al., 1991). Además, muchos de los genes que participan en el desarrollo de los tejidos marginales están a su vez implicados en el establecimiento del eje apical-basal, y como hemos comentado anteriormente están afectados por los niveles de la hormona auxina. Todas estas observaciones apoyan el modelo presentado por Nemhauser et al. en el año 2000 (Nemhauser et al., 2000). Este modelo explica el establecimiento del eje apical basal del gineceo basándose en la existencia de un posible gradiente de auxinas: Las auxinas se sintetizarían en el extremo apical del gineceo y se

transportarían basipétalmente formando un gradiente decreciente. De acuerdo con esta hipótesis, niveles elevados de auxinas inducirían la diferenciación del estilo y estigma, niveles intermedios formarían el ovario y niveles bajos el ginóforo basal (Fig. 3-4). La inhibición del transporte en el gineceo provocaría la acumulación de auxinas en las zonas de síntesis, hipotéticamente las zonas apicales, y la disminución de las mismas en las regiones basales (Nemhauser *et al.*, 2000).

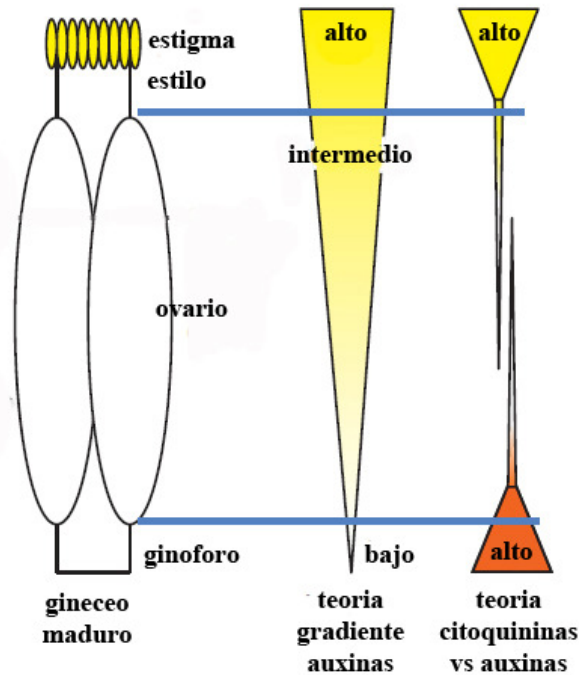


Figura 3-4: Hormonas y morfología del gineceo. Se muestran los diferentes modelos propuestos que explican el establecimiento de la polaridad apical-basal durante el desarrollo del gineceo. El modelo del gradiente de auxinas propone la existencia de tres regiones con niveles diferentes de auxinas, una zona con niveles altos de auxina que dará lugar al estigma y al estilo, una zona con niveles intermedios de auxinas que dará lugar al ovario, y una zona con niveles bajos de auxinas que dará lugar al ginóforo. El modelo del doble gradiente, establece la existencia de las mismas tres regiones pero delimitadas por los niveles de auxinas y citoquininas. En la zona apical tendríamos niveles altos de auxina que dirigirían el desarrollo de estigma y estilo, en la región central niveles bajos de auxinas y citoquininas que dirigirían el desarrollo del ovario, y en la región basal niveles altos de citoquininas que dirigirían la formación del ginóforo. Adaptado de (Sundberg y Ostergaard, 2009).

Se ha descrito que ciertos genes implicados en la biosíntesis de Auxinas se expresan en los tejidos apicales del gineceo, como *YUC2* y *YUC4* (Cheng *et al.*, 2006). Como hemos comentado anteriormente, sus mutaciones afectan severamente a la morfología del gineceo (Cheng *et al.*, 2006). Algunos de los genes importantes para el desarrollo de los tejidos marginales de la zona apical, como los genes *STY* y los *NGA*, son necesarios para la activación de estos genes de biosíntesis (Alvarez *et al.*, 2009; Kuusk *et al.*, 2006; Sohlberg *et al.*, 2006; Trigueros *et al.*, 2009), regulando redundantemente su expresión. También se ha sugerido que *SPT* y *HEC* responden a altos niveles de auxinas o mediarían su transporte (Gremski *et al.*, 2007). Además, también se ha propuesto que *ETT* estaría respondiendo a niveles medios de auxina (Nemhauser *et al.* 2000), estableciendo así la formación del ovario al regular negativamente la expresión de genes que dirigen la formación de los tejidos apicales, como *SPT* (Heisler *et al.*, 2001) y los genes *HEC* (Gremski *et al.*, 2007).

Recientemente se ha propuesto una variación del modelo de Nemhauser. La observación de líneas deladoras de respuesta a auxinas, que indican la localización de las auxinas de forma indirecta, indica que las auxinas se acumulan en la zona apical del fruto, pero no se detectan en la zona del ovario (Aloni *et al.*, 2006; Benkova *et al.*, 2003), sugiriendo la existencia de solamente dos dominios con diferentes niveles de auxinas, la región del estigma y estilo donde existirían niveles altos de esta hormona, y el resto del fruto donde existirían niveles bajos.

Puesto que las citoquininas están normalmente implicadas en funciones antagonistas a las de las auxinas (Shani *et al.*, 2006), se ha propuesto que las citoquininas tendrían una concentración máxima en la base del gineceo (Ostergaard, 2009), estableciéndose tres territorios hormonales distintos donde niveles altos de auxinas y bajos de citoquininas promueven el desarrollo de los tejidos apicales, niveles bajos de auxinas y de citoquininas especifican el ovario y niveles bajos de auxinas y altos de citoquininas serían necesarios para la formación del ginóforo en la base (Fig. 3-4), aunque los estudios que apoyan este modelo son, por ahora, muy escasos.

Desarrollo del fruto

En el momento de la iniciación del desarrollo del fruto ya se han establecido todos los tipos celulares y tejidos que constituirán el fruto maduro, y se inicia un proceso de crecimiento y diferenciación que está asociado al desarrollo de las semillas. La finalidad de este proceso es proporcionar protección y un ambiente adecuado para que las semillas maduren, y finalmente, asegurar la dispersión de éstas.

El desarrollo del fruto está altamente relacionado con la acción de las hormonas. Numerosos estudios fisiológicos y genéticos han demostrado la importancia del papel de diferentes tipos de hormonas, como las auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno, durante esta etapa en un gran número de especies (Gillaspy *et al.*, 1993; King, 1947; Ozga *et al.*, 2002; Vivian-Smith y Koltunow, 1999; Wittwer *et al.*, 1957).

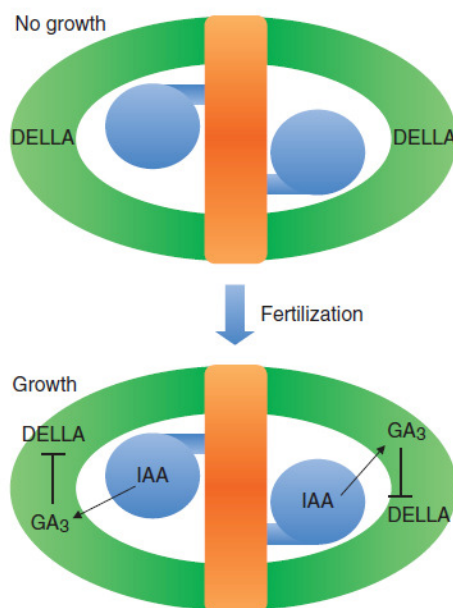


Figura 3-5: Modelo propuesto para explicar el inicio del desarrollo del fruto. Tras la fertilización se inicia el desarrollo de las semillas. Las semillas en desarrollo se comportan como potentes fuentes de auxinas que se movilizan hacia el replum y las valvas. La presencia de las auxinas provoca la activación en la síntesis de GA, que dirige la eliminación de las proteínas DELLA, consideradas represoras del crecimiento. Tomado de (Sundberg y Ostergaard, 2009)

La fertilización de las semillas es el desencadenante del desarrollo del fruto. Cuando ésta no se produce el fruto no se desarrolla e inicia un programa senescente (Dorcey *et al.*, 2009; Goetz *et al.*, 2006; Vivian-Smith *et al.*, 2001). Al igual que en otras especies, tanto la aplicación de auxinas como la aplicación de giberelinas son capaces de inducir el desarrollo del fruto independientemente de la fertilización de los óvulos en *Arabidopsis*. Se ha propuesto que una vez que el óvulo se fertiliza se convierte en una fuente de auxinas. Las auxinas generadas en las semillas en desarrollo se transportan a la valva, donde estimulan la síntesis de giberelinas. Una vez las giberelinas están presentes, dirigen la degradación de las proteínas DELLA,

consideradas como represoras del crecimiento (Achard y Genschik, 2009; Jiang y Fu, 2007), permitiendo de este modo el desarrollo del fruto (Dorcey et al., 2009; Marti et al., 2007; Ozga et al., 2009; Sundberg y Ostergaard, 2009) (Fig. 3-5). Apoyando el papel de las auxinas en el inicio de la fructificación en *Arabidopsis*, se ha identificado un mutante de pérdida de función en un gen de respuesta a auxinas, *arf8*, que da lugar a la formación de un fruto partenocárpico (Goetz et al., 2006; Vivian-Smith et al., 2001), estableciéndose una relación directa entre la respuesta a auxinas y la iniciación del desarrollo del fruto.

A excepción del papel que desempeñan las auxinas y las giberelinas durante el desarrollo del fruto de *Arabidopsis*, poco se sabe de los procesos y mecanismos moleculares que controlan su desarrollo, ni del posible papel que otras hormonas pueden desempeñar durante esta etapa del desarrollo.

FUL en el desarrollo del fruto

FUL se expresa inicialmente en todo el gineceo, y a partir del estadio 9 de desarrollo su expresión se restringe a las valvas y a la vasculatura del estilo, donde se mantiene hasta el final del desarrollo del fruto. A partir de los estudios iniciados con la identificación del mutante *ful-1* (Gu et al., 1998) conocemos en detalle su papel durante la especificación del margen de la valva y la formación de la zona de dehiscencia, procesos que han sido ampliamente estudiados y revisados durante los últimos años (Dinneny y Yanofsky, 2005; Ferrandiz, 2002; Girin et al., 2009). Pero además de su papel en el establecimiento del margen de valva, *FUL* podría desempeñar otras funciones. Por ejemplo, se ha sugerido un papel de *FUL* en la iniciación del desarrollo del fruto, puesto que en su ausencia, el desarrollo del fruto del mutante partenocárpico *arf8*, desaparece (Vivian-Smith et al., 2001). Otra posible función de *FUL* estaría relacionada con el desarrollo y elongación del estilo, ya que se ha descrito que en fondos genéticos distintos a Landsberg *erecta*, los mutantes *ful* desarrollan estilos más largos que los estilos de los frutos silvestres (Ferrándiz et al., 2000a).

Durante el establecimiento del margen de valva, *FUL* actúa reprimiendo la expresión de los genes *SHP*, que son los responsables de la adquisición de identidad de este tejido. La acción conjunta de *FUL*, en la valva, y de *RPL*, en el replum, limitan la expresión de estos genes a la zona del margen de valva (Ferrandiz et al., 2000b; Gu et al., 1998; Roeder et al., 2003). En el margen de la valva, compuesto por 3-4 capas de células, *SHP* activa a *IND* y *ALC* (Fig.3-6), factores de transcripción tipo bHLH, ambos necesarios para la formación de la zona de dehiscencia (Liljegren et al., 2000; Liljegren et al., 2004; Rajani y Sundaresan, 2001). En el doble mutante *shp1 shp2* no se forma la zona de dehiscencia y el fruto maduro no se abre (Liljegren et al., 2000). Fenotipos similares se observan en plantas en que los genes *IND* o *ALC* han sido inactivados (Liljegren et al., 2004; Rajani y Sundaresan, 2001), al igual que cuando se expresa ectópicamente el gen *FUL* (Ferrándiz et al., 2000b). En el mutante *ful*, *SHP*, *IND* y *ALC* se expresan ectópicamente en la valva y, como resultado, pequeñas células lignificadas, que normalmente son específicas de la zona de dehiscencia, se desarrollan en este dominio. Como consecuencia, las valvas de los frutos *ful* no elongan y se rompen de forma prematura. La mutación *ful* no afecta a la elongación de las células del replum, que al crecer, adoptan una disposición en zigzag. El fenotipo de fruto en un mutante *ful* se rescata casi por completo cuando se combina progresivamente con mutantes de *SHP*, *IND* y *ALC*. La mutación que suprime en mayor medida el fenotipo de *ful* es *ind*. La sobreexpresión de *IND* mimetiza el

fenotipo de fruto de los mutantes *ful* (Liljegren et al., 2004), cosa que no ocurre al sobreexpresar los genes *SHP* (Ferrándiz et al., 2000b) Además, *IND* se expresa ectópicamente en las valvas del mutante *ful* incluso en ausencia de los genes *SHP*. Estos resultados sugieren un papel de *FUL* en el control de la expresión de *IND* independientemente de la regulación de los genes *SHP* (Ferrándiz et al., 2000b) (Fig.3-6).

Además de su papel en la especificación del margen de valva, *FUL* también participa en la lignificación de la capa *enb*. Como hemos comentado, en ausencia de *FUL*, las valvas del fruto desarrollan células pequeñas que adoptan identidad de células de la zona de dehiscencia, y que finalmente acaban lignificándose. Cuando se elimina *IND*, las células de la valva recuperan su aspecto silvestre y desaparece la lignificación, pero la capa *enb* se desarrolla con normalidad. La eliminación sucesiva de *SHP* y *ALC* afecta ligeramente a la elongación de las células de la valva provocando un incremento de la longitud del fruto, pero además, provoca que la capa *enb* no se lignifique. Puesto que en el cuádruple mutante *shp1 shp2 ind alc* la capa *enb* si se lignifica, *FUL* podría tener un papel en el establecimiento y desarrollo de esta capa celular clave para el proceso de dehiscencia (Liljegren et al., 2004).

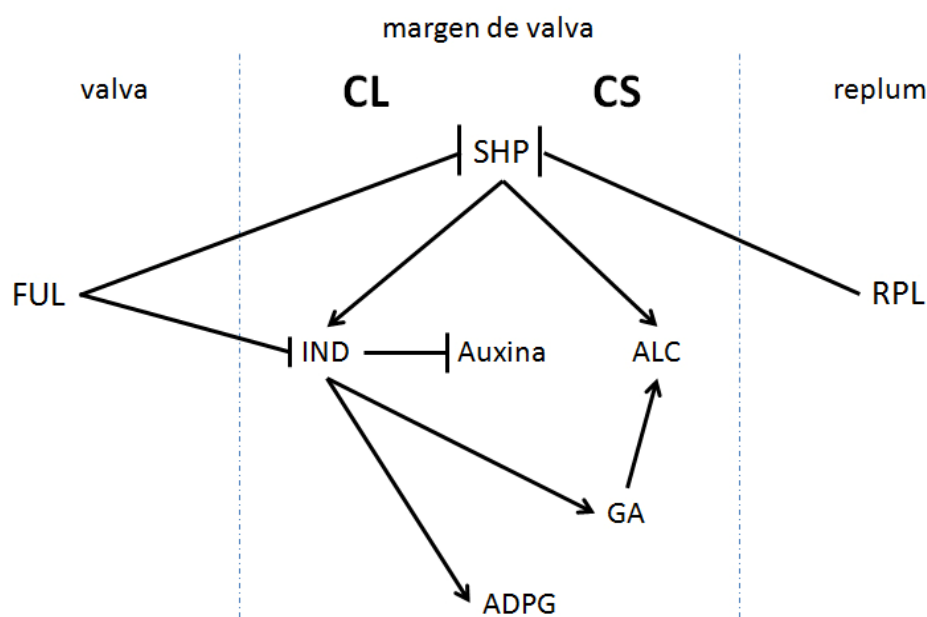


Figura 3-6: Modelo que explica el establecimiento y diferenciación de la zona del margen de valva durante el desarrollo del fruto. *FUL*, expresado en la valva y *RPL*, expresado en el replum, limitan la expresión de *SHP* donde se unen estos tejidos. *SHP* a su vez activa la expresión de los genes *IND* y *ALC*, que especifican, dentro de la zona del margen de valva la capa de lignificación (CL) y la capa de separación (CS) respectivamente. *IND* media en la exclusión de las auxinas de esta zona, generando un mínimo local de auxinas que dirige la formación de este tejido, a la vez que estimula la síntesis de giberelinas. Los niveles altos de giberelinas permiten que la proteína *ALC* sea activa y dirija la formación de la capa de separación. Existen evidencias de que *FUL* también podría controlar la expresión de *IND* independientemente de *SHP*.

Recientemente se ha mostrado que para la correcta diferenciación de la zona de dehiscencia en el fruto de *Arabidopsis* es necesario el establecimiento de un mínimo de auxina local en esta zona (Sorefan et al., 2009). *IND* está implicado en la formación de este mínimo de auxinas al controlar la dirección del transporte de auxinas mediante la relocalización del transportador de auxinas *PIN*. Esto lo hace regulando directamente la expresión de *PID* y *WAG2*, dos

proteínas quinasa implicadas en la localización de los genes *PIN* (Michniewicz et al., 2007; Sorefan et al., 2009) (Fig.3-6). *IND*, además de mediar la generación de un mínimo de auxinas en esta zona, activa directamente la síntesis de las giberelinas, regulando de forma directa la expresión del gen *GA3ox1* que cataliza el último paso de la síntesis de GAs (Talon et al. 1990). Las GA actúan mediando la degradación de las proteínas DELLA que actúan reprimiendo la respuesta a esta hormona. *ALC* pertenece a la familia de factores de transcripción tipo bHLH denominados *PHITOCROME INTERACTING FACTOR (PIF)* que median la respuesta a las GA y que interaccionan con las proteínas DELLA (de Lucas et al. 2008; Feng et al. 2008). Del mismo modo que con las proteínas PIF, las DELLA interaccionan físicamente con *ALC*, impidiendo su acción reguladora. La acción de las giberelinas mediada por *IND* libera a *ALC*, permitiendo la formación de la zona de separación (Arnaud et al., 2010) (Fig.3-6).

El papel de la pared celular en la elongación celular.

La pared celular de las plantas, además de proteger y mantener la forma de las células, es clave en múltiples procesos del desarrollo, siendo una estructura dinámica que varía su composición y estructura durante toda la vida de la célula. Por ejemplo, la elongación celular está altamente relacionada con modificaciones de la estructura de la pared celular. Normalmente la elongación celular se produce por un incremento de la turgencia de las células que distiende la pared celular, estirándola. Para que una célula elongue es necesario que la pared celular pierda rigidez y adquiera propiedades elásticas que permitan el crecimiento celular (Buchanan et al., 2000; Hopkins y Hüner, 2008). Del mismo modo, una vez la célula ha elongado, la pared celular ha de volver a adquirir la rigidez adecuada para no volver a su tamaño inicial. Del mismo modo, la pared celular juega un importante papel en procesos de dehiscencia, como el que tiene lugar durante la apertura de los frutos de *Arabidopsis*. En estos casos, las paredes celulares, que se encuentran íntimamente cohesionadas, han de separarse para permitir la abscisión o dehiscencia del órgano o estructura correspondiente. En estos procesos de nuevo ocurren modificaciones de la pared celular que permiten la separación (Mitsuda y Ohme-Takagi, 2008).

La pared celular vegetal está compuesta por una red de carbohidratos y proteínas estructurales embebidos en una matriz gelatinosa compuesta por otros carbohidratos y proteínas. En la pared celular se pueden diferenciar dos capas, la pared primaria, presente en todas las células y compuesta por 3 o 4 capas de celulosa, el polisacárido más abundante de esta estructura, y la pared secundaria, que sólo se forma en algunas células que han detenido su crecimiento asociado a procesos de especialización, y que está compuesta por celulosa y lignina o suberina.

Como hemos comentado el principal componente de la pared celular es la celulosa. La celulosa es un polisacárido fibrilar que se organiza en microfibrillas. Las microfibrillas de celulosa se encuentran atadas por carbohidratos no fibrilares a los que se denomina genéricamente hemicelulosa y que están compuestos principalmente por xiloglicanos (XiGs) glucuronarabinoxilanos (GAXs). Otro componente importante de las paredes celulares es la pectina, un polisacárido no fibrilar heterogéneamente ramificado y muy hidratado, cuyos componentes mayoritarios son los homogalacturonanos (HGA) y los ramnogalacturonanos I (RG I). La lignina y la suberina son polímeros complejos compuestos por fenilpropanoides y alcoholes aromáticos que se acumulan en algunas paredes secundarias y, en casos

excepcionales, en paredes primarias. Además, la pared celular vegetal también está compuesta por proteínas estructurales generalmente de estructura fibrilar y que se inmovilizan mediante enlaces covalentes entre ellas o con carbohidratos (Buchanan et al., 2000; Hopkins y Hüner, 2008).

Un trabajo reciente ha puesto de manifiesto la importancia de la regulación de la composición y estructura de la pared celular en el proceso de dehiscencia en *Arabidopsis* (Ogawa et al., 2009). Este trabajo muestra que dos poligalacturonasas, *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1)* y *ADPG2*, son esenciales para que se produzca la dehiscencia del fruto de *Arabidopsis*. Las poligalacturonasas son enzimas que dirigen la degradación de la pectina, y en *Arabidopsis* forman una familia génica de más de 70 miembros. Estos dos genes parecen estar regulados positivamente por *IND*, mimetizando su patrón de expresión en la zona de dehiscencia (Fig.3-6).

Antecedentes

El papel de *FUL* durante el desarrollo y formación del pistilo ha sido objeto de numerosos estudios, pero a pesar de ello, apenas se dispone de información del papel que desempeña este factor de transcripción en las etapas posteriores del desarrollo del fruto.

Nuestro laboratorio dispone de una línea donde la actividad de *FUL* ha sido modificada mediante la fusión traduccional del dominio de activación transcripcional vírico VP16 (*FUL:VP16*) bajo el control de las regiones reguladoras propias del gen *FUL* (Fig. 3-7 A). Este dominio transforma el factor de transcripción asociado a él en un activador dominante de la transcripción. La línea *FUL:VP16* presenta alteraciones en el desarrollo del fruto, con una disminución acusada de la elongación y un ensanchamiento de la región apical de las valvas. Las diferencias fenotípicas entre *FUL:VP16*, el alelo silvestre y el mutante *ful* durante el desarrollo del fruto sugiere que *FUL* podría participar en la regulación del desarrollo del fruto a través de la activación de unos genes y la represión de otros, presentando un comportamiento dual: Si *FUL* se comportara siempre como un activador de la transcripción, los frutos de línea *FUL:VP16* debería parecerse a los producidos por la línea silvestre, mientras que si *FUL* se comportara siempre como un represor de la transcripción, los frutos de la línea *FUL:VP16* deberían parecerse a los generados por el mutante *ful* (Fig. 3-7 B). El hecho de que la línea *FUL:VP16* no genere frutos parecidos ni a las plantas silvestre ni al mutante *ful* apunta a que *FUL* podría comportarse de ambos modos.

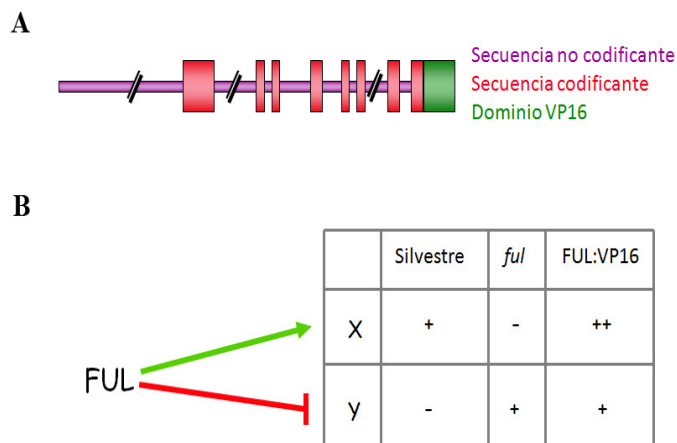


Figura 3-7: Esquema de la construcción pFUL::FUL:VP16 y mecanismo de acción. La línea *FUL:VP16* se construyó mediante la fusión traduccional del dominio de activación viral VP16 (A). Este dominio modifica la actividad del factor de transcripción al que va asociado, de modo que si este es un activador de la transcripción, al poseer el dominio VP16 se comportara como un activador más potente, y si es un represor, cambiara su actividad a activador (B), pudiendo mostrarnos fenotipos diferenciales respecto al alelo silvestre o el mutante.

La línea *FUL:VP16* podría ser una herramienta útil en la identificación puntual de nuevas dianas moleculares de *FUL*, así como para identificar y comprender a nivel global los procesos que controlan el desarrollo del fruto en *Arabidopsis* mediante estudios comparativos de expresión génica entre esta línea, plantas silvestres y mutantes *ful*.

Objetivos

El objetivo general de este capítulo de tesis es la identificación de posibles dianas de FUL implicadas en el desarrollo del fruto, y a su vez, determinar cuando sea posible el modo de acción de FUL sobre éstas.

Con este propósito se realizó un análisis transcriptómico de las líneas *ful* y FUL:VP16 durante las etapas iniciales del desarrollo del fruto mediante la utilización de micromatrices de DNA de oligonucleótidos largos. El trabajo aquí realizado no es más que una aproximación preliminar al objetivo general indicado, con la que se pretendió testar la validez de la línea FUL:VP16 para identificar diferencialmente genes regulados por FUL, así como recopilar información que sirviera de punto de partida para futuros trabajos. Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

- Identificar genes diferencialmente expresados en frutos silvestres, frutos *ful* y frutos FUL:VP16.

- Identificar posibles dianas directas de FUL, así como posibles procesos funcionales afectados, mediante el análisis de los patrones de expresión obtenidos.

- Validar algunos de los resultados obtenidos en el análisis de las micromatrices mediante estudios de expresión individuales utilizando líneas deladoras.

Resultados

La línea FUL:VP16.

Las plantas FUL:VP16 contienen una construcción que incluye las 4,5 Kb anteriores al ATG de FUL, así como la región genómica codificante del gen fusionada traducionalmente, en su extremo 3', a la secuencia del dominio de activación viral VP16 (Cress y Triezenberg, 1991; Triezenberg et al., 1988). Al fusionar el dominio VP16 a un factor de transcripción, éste se transforma en un activador dominante de la transcripción, alterando la regulación de los genes diana del factor de transcripción asociado (Ng y Yanofsky, 2001; Parcy et al., 1998).

La línea FUL:VP16 presenta un fenotipo característico en el fruto, que no muestra similitud ni con la línea mutante ni con la línea silvestre. Los frutos FUL:VP16 presentan una forma característica acorazonada, que recuerda a los frutos de *Capsela bursa-pastoris*, siendo más cortos y anchos que los frutos silvestres, pero de longitud similar a los frutos del mutante *ful* (Fig. 3-8). La longitud de los frutos de la línea FUL:VP16 depende de la proporción entre FUL:VP16 y FUL nativo, observándose una gradación decreciente entre los frutos FUL:VP16 heterocigotos, más largos, y los frutos FUL:VP16 *ful*, más cortos que los frutos FUL:VP16 (Fig. 3-8). Esta variación en la longitud podría estar reflejando un efecto de competición por diana entre ambos alelos, que podrían estar actuando de forma diferente.

Cuando se observan los frutos más detalladamente en el SEM las diferencias entre los frutos son más evidentes. Los frutos silvestres presentan células de valva alargadas dispuestas en paralelo con las células del replum, que también presentan morfología alargada pero son más estrechas (Fig. 3-8). Las células de la valva de *ful* son pequeñas, mostrando escasa elongación, mientras que las células del replum, que sí elongan, presentan una disposición en zigzag y se vuelven más grandes que las células del replum de los frutos silvestres (Fig. 3-8). Por su parte, los frutos FUL:VP16 muestran células de valva con una morfología intermedia entre las de los frutos silvestres y las de los frutos *ful*. Estas células sí que muestran elongación, pero son más cortas que las células de los frutos silvestres, y tienen una morfología en ocasiones irregular. A diferencia de los otros frutos, las células de la valva de los frutos FUL:VP16 se disponen de forma oblicua al replum (Fig. 3-8). Esta disposición celular podría explicar por qué estos frutos son más anchos.

Otra diferencia evidente entre estos frutos es la longitud del estilo. Los frutos *ful* presentan estilos mucho más largos que los silvestres mientras que en los frutos FUL:VP16 parecen ligeramente más cortos (Fig. 3-8). Otro aspecto diferencial de los frutos FUL:VP16 es el crecimiento de las valvas por encima del estilo, llegando a la altura del estigma (Fig. 3-8).

Nuestra hipótesis de partida era que las diferencias observadas entre los frutos de las plantas silvestres, *ful* y FUL:VP16, deben ser el reflejo del cambio de actividad de FUL que ocasiona cambios en la expresión de los genes que regula, y que la utilización combinada de estas líneas podría constituir un buen método para la identificación de posibles dianas directas de FUL.

Una forma de testar la validez de ésta hipótesis era comprobando si el alelo FUL:VP16 afectaba a la expresión de genes sobre los cuales se había descrito que actuaba FUL. Unos buenos candidatos eran los genes *SHP*, los cuales están reprimidos por FUL (Ferrándiz et al., 2000b). Otro buen candidato era el gen *IND*, el cual también había sido propuesto como un gen regulado negativamente por FUL. Para ver como afectaba la línea FUL:VP16 a la expresión de estos genes decidimos analizar la expresión de una línea delatora *SHP1::GUS* y una línea *IND::GUS* en el fondo FUL:VP16.

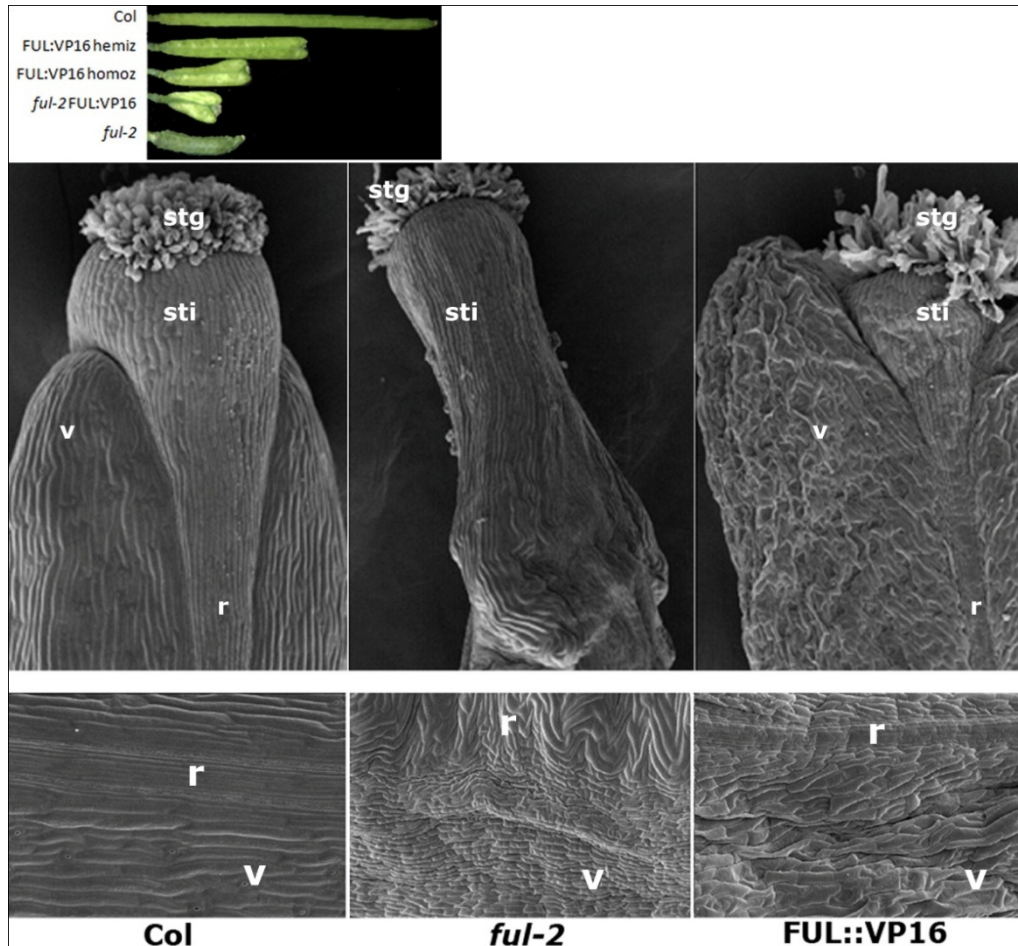


Figura 3-8: Fenotipos de los frutos de plantas silvestres, mutantes *ful* y línea FUL:VP16. En la parte superior se muestran los frutos de las diferentes líneas en fresco donde se aprecian las diferencias provocadas por el cambio de actividad de FUL. En los paneles centrales se muestran micrografías obtenidas mediante SEM de la región apical de los frutos silvestres (izquierda), *ful-2* (centro) y FUL:VP16 (derecha). En los paneles inferiores se muestran detalles de la zona de unión entre valva y replum, donde se aprecian las diferencias de tamaño y orientación celular entre los frutos silvestres (izquierda), *ful-2* (centro) y FUL:VP16 (derecha). Replum (r). Valva (v), Estigma (stg). Estilo (sti).

Mientras que la expresión de *SHP1* se detectó ectópicamente en la valva (Fig. 3-9 A), la expresión de *IND* no se modificó, quedando restringida a la zona del margen de valva (Fig. 3-9 B). Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que *SHP* es una diana directamente reprimida por FUL, de modo que FUL:VP16 sería capaz de activarlo en el mismo dominio de expresión de *FUL*. Sin embargo, *IND* debería ser regulado indirectamente, puesto que FUL:VP16 no es capaz de activarlo. Por tanto, estos resultados indicaban que la línea FUL:VP16 podría ser una buena herramienta para la identificación de dianas directas del gen *FUL*.

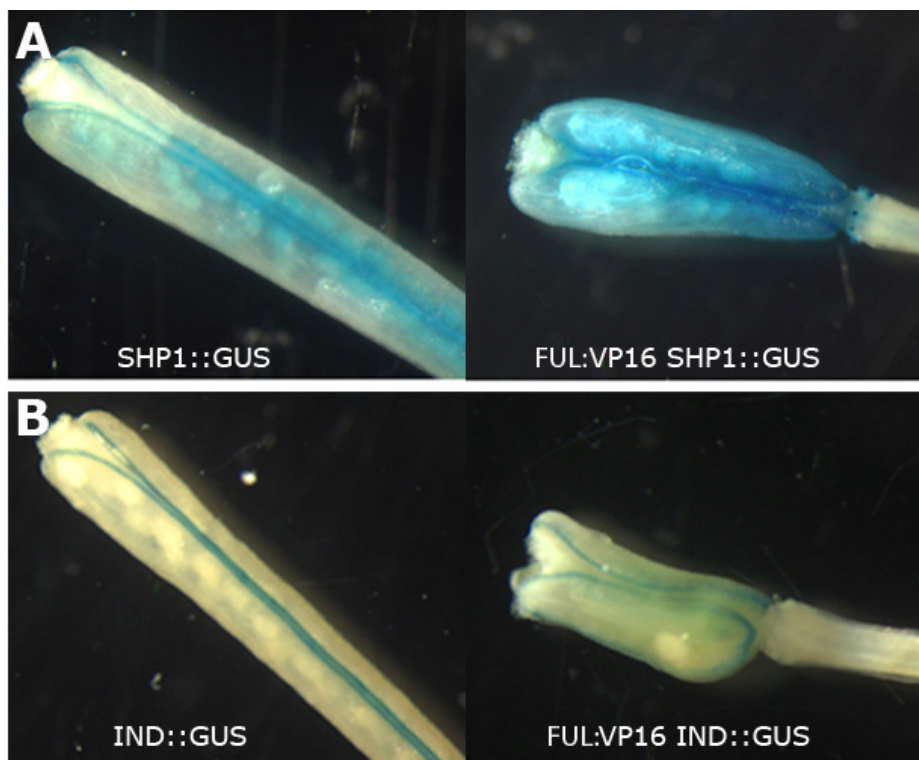


Figura 3-9: Expresión de *SHP1* (A) y *IND* (B) en frutos silvestres (izquierda) y en frutos FUL:VP16 (derecha). Mientras que la expresión de *SHP1* aparece ectópica en la línea FUL:VP16, la expresión de *IND* no varía, indicando que FUL podría actuar directamente sobre *SHP1* e indirectamente sobre *IND*.

Diseño experimental para el análisis transcriptómico:

Para estudiar de forma masiva los cambios de expresión asociados a la actividad FUL:VP16 se decidió realizar un análisis transcriptómico mediante el uso de micromatrices de DNA.

Para la caracterización del transcriptoma de los mutantes *ful* y la línea FUL:VP16 se recolectaron 100 frutos de unas 40 plantas en estadio de desarrollo 15-16, tanto de las líneas mutantes como del silvestre. Se utilizó un diseño de referencia para realizar las hibridaciones, es decir, el RNA de cada línea se hibridó conjuntamente con el RNA del silvestre (referencia) en una misma micromatriz. Este diseño experimental nos permite comparar tanto cada alelo frente al silvestre, como realizar comparaciones directas entre ellos. Para cada muestra se utilizaron tres replicas biológicas. De este modo se obtuvieron 3 micromatrices con *ful*/silvestre y 3 con FUL:VP16/silvestre.

Genes con expresión diferencial durante las etapas iniciales del desarrollo del fruto de los mutantes *ful* y la línea FUL:VP16:

Tras la hibridación de las micromatrices, se eliminaron aquellas sondas que no superaban los criterios de calidad descritos en Materiales y Métodos (pag. 224). Un total de 20709 sondas superaron los controles de calidad. Para cada una de estas sondas seleccionadas se aplicó un segundo filtro, donde el criterio fue estar presente al menos en 5 de las 6 hibridaciones (80% del total), tras el cual se consideraron para subsiguientes análisis 15711 sondas.

Para buscar genes con expresión diferencial entre *ful* y el silvestre o FUL:VP16 y el silvestre se aplicó un análisis estadístico tipo T de student para una muestra a cada grupo de micromatrices. Un gen se consideró diferencialmente expresado entre *ful* y el silvestre o

FUL:VP16 y el silvestre cuando el p-valor fue menor de 0,05, y el cambio en los niveles de expresión respecto al silvestre fue igual o mayor de 2. Para las plantas *ful* encontramos un total de 409 sondas que cumplían estos requisitos, donde 212 mostraban inducción de la expresión respecto al silvestre y 197 represión (Fig. 3-10 A, Tabla 1). Para las plantas FUL:VP16 se encontraron 637 sondas, donde 430 presentaban niveles de expresión superiores al silvestre y 207 niveles inferiores (Fig. 3-10 B, Tabla 2).

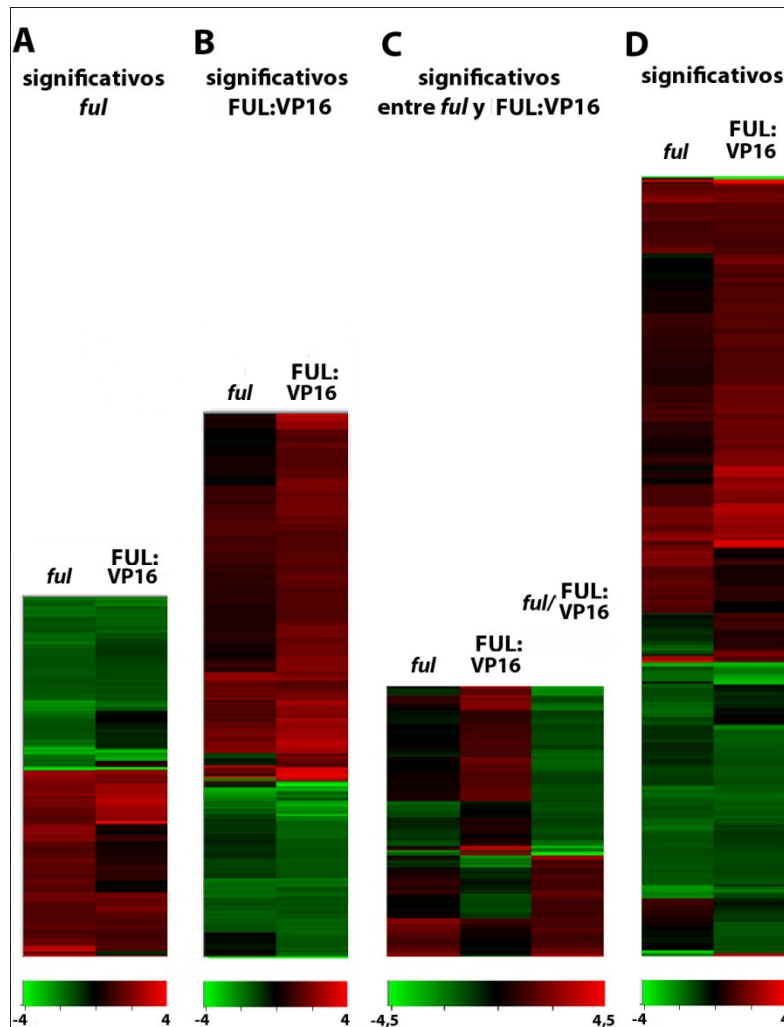


Figura 3-10: Representación mediante clusters jerárquicos de los genes diferenciales obtenidos en las diferentes comparaciones realizadas: mutante *ful* frente a silvestre (A), línea VP16 frente a silvestre (B) y mutante *ful* frente a línea VP16 (D). A partir de estos tres grupos se obtuvo un grupo final de 886 genes (D). Todos los clusters muestran los niveles de expresión del mutante *ful* y la línea VP16 frente al silvestre (A, B, C y D), y en el caso de los genes obtenidos al comparar el mutante *ful* frente a línea VP16, también se muestra la relación existente entre ellos (D).

Puesto que algunos genes podrían presentar diferencias de expresión entre el mutante *ful* y la línea FUL:VP16, pero no ser significativas respecto al silvestre o no superar el umbral de dos veces de cambio respecto al silvestre, se realizó una comparación directa de los niveles de expresión entre *ful* y FUL:VP16. Para ello se realizó un análisis estadístico tipo T de student para varianzas iguales entre dos muestras. Un gen se consideró diferencialmente expresado entre el mutante *ful* y la línea FUL:VP16 cuando el p-valor fue menor de 0,05, y el cambio en los niveles de expresión entre ellos fuese igual o mayor de 2. Un total de 291 sondas cumplieron estos requisitos. De ellas, 109 sondas presentaban niveles más altos en *ful* que en FUL:VP16 y 182 más bajos (Fig. 3-10 C, Tabla 3). De este nuevo grupo de sondas, 78 no se

habían identificado como diferenciales en las comparaciones anteriores. Tras los tres análisis disponíamos de un grupo de 940 sondas, que tras eliminar las sondas redundantes, correspondían a 886 genes anotados (Fig. 3-10 D, Tabla 4).

Análisis de la variabilidad de los genes diferencialmente expresados mediante PCA.

Sobre los 886 genes seleccionados en los tres análisis se realizó un análisis de componentes principales o PCA (Principal Component Analysis). El PCA permite examinar la mayor parte de la variabilidad de un conjunto de datos asociada a sus componentes principales (Dopazo, 2002). Este análisis mostró que la mayor parte de la variabilidad existente entre nuestras hibridaciones se debía a las diferencias entre *ful* y FUL:VP16 (un 79,9%) (Fig. 3-11). El resto de la variabilidad podría asociarse a diferencias entre las hibridaciones dentro de un mismo grupo, que se explicarían por variaciones en la recolección de las muestras (10.1%) y por diferencias durante la hibridación de las micro matrices (4.1%) (Fig. 3-11).

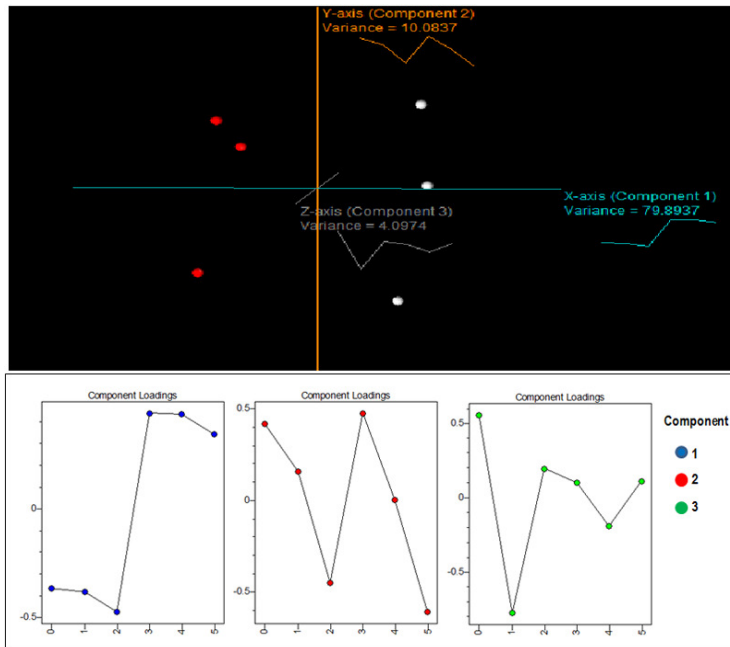


Figura 3-11: El análisis PCA nos permite examinar la mayor parte de la variabilidad de un conjunto de datos asociada a sus componentes principales. Las principales diferencias encontradas entre los datos se deben principalmente a diferencias entre *ful* y la línea FUL:VP16 (Component 1), que supone casi el 80% de la variabilidad encontrada. El resto de la variabilidad se puede asociar a diferencias entre las muestras, que se podrían asociar a pequeñas variaciones durante la recolección (Component 2) o la hibridación de los cristales (Component 3). En la figura superior los puntos rojos corresponden a las micromatrices de *ful* y los blancos a las de FUL:VP16.

FUL como un represor de la transcripción durante el desarrollo del fruto

Uno de nuestros objetivos era determinar el modo de acción de FUL sobre sus posibles dianas. La línea FUL:VP16, al tener fusionado el dominio de activación vírico VP16, debería comportarse de forma dominante como activador de la transcripción. Si FUL, de forma nativa, fuera un represor de la transcripción, en un fondo mutante *ful* sus dianas deberían estar activadas, del mismo modo que en la línea FUL:VP16. Si por el contrario FUL fuera un activador, sus dianas, entonces, deberían estar reprimidas en el mutante, mientras que en FUL:VP16 deberían estar activadas.

Para visualizar de forma sencilla el comportamiento de FUL como activador o represor, los 886 genes seleccionados se etiquetaron en función de su nivel de expresión respecto al silvestre. Se establecieron tres niveles: Alto (Up), si presentaban una expresión 1,3 veces mayor que en el silvestre, Igual (=), donde los valores de expresión estaban entre 1,3 y 0,7 veces, y que consideramos que no cambiaban, y Bajo (Down), donde incluimos los genes que se expresaban

por debajo de 0.7 veces la expresión del silvestre (Tabla 4). Según esta clasificación, en el fondo mutante *ful* se consideró que 153 de los genes seleccionados no cambiaban respecto al silvestre, 306 estaban reprimidos y 427 activados, mientras que en FUL:VP16 encontramos 71 genes que no variaban su expresión, 305 que estaban reprimidos y 510 activados.

Cuando se comparó la respuesta del mutante *ful* y la de la línea FUL:VP16 (Figura 3-11) se observó que el 68% (241+361=602) de los genes seleccionados se comportaba de forma similar en ambas líneas. La similitud en la variación de la expresión entre ambas líneas era compatible con que FUL pudiera estar comportándose, principalmente, como un represor de la transcripción.

Nivel FUL:VP16	Nivel <i>ful</i>			Total
	=	down	up	
=		28	43	71
down	41	241	23	305
up	112	37	361	510
Total	153	306	427	886

Figura 3-12: Patrones de expresión. En esta tabla se muestra el número de genes que están activados, reprimidos o no varían respecto al silvestre de los 886 genes seleccionados. Las casillas marcadas en gris representan patrones de expresión de genes compatibles con una posible regulación indirecta (333), mientras que el resto, casillas azul claro y azul oscuro, son compatibles con una posible regulación directa (553). De los posibles genes regulados directamente, las casillas azul claro representan genes que podrían estar reprimidos por FUL (516) mientras que la casilla azul oscuro representa a aquellos genes que podrían estar activados (37 genes).

Estimación del posible modo de acción de FUL sobre los genes diferencialmente expresados.

Genes regulados indirectamente por FUL

Considerando los efectos que tiene FUL:VP16 sobre la transcripción de sus dianas, todos aquellos genes que mostraran represión de su expresión respecto al silvestre podían ser considerados genes regulados indirectamente por FUL. Entre los genes seleccionados se encontraron 305 genes que cumplían esta premisa (Fig. 3-12, Tabla 7). También consideramos dianas indirectas aquellos genes que mientras en *ful* presentaban disminución de su expresión, es decir, estarían activados por FUL, en la línea FUL VP16 no presentaban variaciones. Entre los genes seleccionados se encontraron 28 genes que seguían este patrón (Fig. 3-12, Tabla 7)

Genes que podrían estar regulados directamente por FUL

Según nuestro razonamiento inicial (Fig. 3-7), entre los genes seleccionados se identificaron patrones de expresión compatibles con un modo de acción de FUL tanto como represor como activador. 361 genes presentaban expresión alta en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16 (Fig. 3-12, Tabla 5), lo cual era compatible con que la forma nativa de FUL actuara como represor de la transcripción, y 37 genes presentaban expresión baja en el mutante *ful* y alta en la línea FUL:VP16 (Fig. 3-12, Tabla 6), lo cual era compatible con que la forma nativa de FUL presentara un modo de acción activador.

Genes regulados redundantemente por *FUL*

Otro aspecto a tener en cuenta sobre la actividad de *FUL* es que algunos genes que regularía podrían estar a su vez controlados redundantemente por otros reguladores. Según esta posibilidad, los genes regulados redundantemente por *FUL* y otros factores de transcripción apenas variarían su expresión en el mutante *ful* respecto a las plantas silvestres, mientras que sí lo podrían hacer en *FUL:VP16*, donde estarán activados. Este razonamiento sería compatible con los genes cuyos niveles de expresión no varían en el mutante *ful*, pero aparecen activados en la línea *FUL:VP16*. Este patrón de expresión se observó para 112 genes (Fig. 3-12, Tabla 8), que, por lo tanto, podrían ser compatibles con una regulación directa por *FUL*, aunque no podríamos discernir en ellas el modo de acción de *FUL* (activador/represor).

Competición por dianas

Los fenotipos generados por el alelo *FUL:VP16* varían en función de los niveles endógenos de *FUL* (Fig. 3-8). Los fenotipos de la línea heterocigota *FUL:VP16* son más débiles que los de la línea homocigota, y más fuertes cuando se elimina el alelo endógeno de *FUL*, indicando cierto grado de competición entre ambos alelos por sus dianas. La presencia del alelo nativo de *FUL* en las plantas *FUL:VP16* podría impedir la acción del alelo *FUL:VP16* sobre algunas dianas, por lo que podrían mostrar una expresión similar a la de plantas silvestres. Éste aspecto podría explicar el comportamiento de algunos genes (43) para los que sólo se aprecian cambios en el mutante *ful*, mientras que en la línea *FUL:VP16* no son destacables (Fig. 3-12, Tabla 8).

Tras estas consideraciones, de los 886 genes seleccionados, 553 (361+37+112+43) serían compatibles con una posible regulación directa por *FUL*. De estos 553 genes, 37 serían compatibles con un modo de acción de *FUL* como activador, y 404 con un modo de acción represor, mientras que para los 112 genes que podrían estar regulados redundantemente por *FUL* no podemos inferir su modo de acción.

Análisis de categorías de Ontología Génica (GO) enriquecidas en los genes diferencialmente expresados.

La interpretación de los resultados de este tipo de análisis, donde se dispone de una gran cantidad de datos, no resulta sencillo, pero sin embargo, la coexpresión de genes que cumplen funciones relacionadas resulta extremadamente útil para inferir información biológica a partir de los datos transcriptómicos (Lee et al., 2004; Stuart et al., 2003). Así, con el fin de identificar los procesos biológicos que podrían estar afectados en el mutante *ful* y la línea *FUL:VP16* durante las etapas iniciales del desarrollo del fruto se utilizó la aplicación EasyGO (Zhou y Su, 2007), que permite detectar la sobrerrepresentación o enriquecimiento de categorías de ontología génica (GO) (Ashburner et al., 2000).

Con esta aplicación se analizó el grupo de 886 genes que habíamos seleccionado como diferenciales, frente al total de genes representados en la micromatriz. El análisis de enriquecimiento se realizó sobre términos GO de Procesos Biológicos y de Función Molecular, que hacen referencia al objetivo biológico al que contribuye el producto génico, y a la función que desempeña respectivamente (Ashburner et al., 2000). De este modo pretendíamos averiguar qué procesos podrían ser los responsables de las alteraciones del desarrollo del fruto observadas en el mutante *ful* y la línea *FUL:VP16*.

De entre los genes seleccionados, la categoría más significativa dentro de Procesos Biológicos fue la de respuesta a estímulos (Fig. 3-13, GO: 0050896).

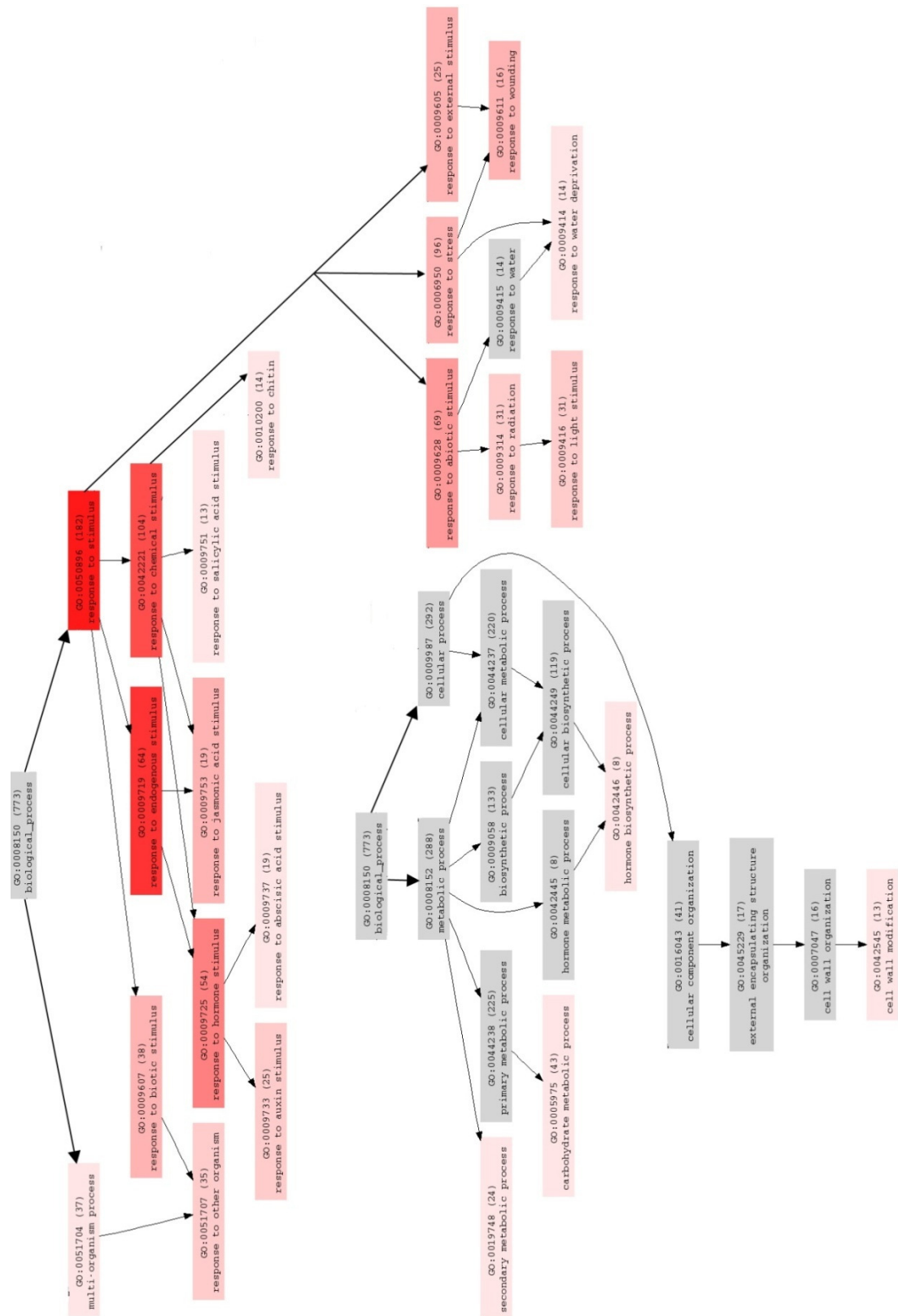


Figura 3-13: GO Procesos Biológicos: resultado del análisis de categorías funcionales enriquecidas en base a procesos biológicos. Los sectores en colores rojos indican grado de significatividad en función de la intensidad del color. Los cuadros en azul indican no significatividad.

Dentro de esta categoría, los procesos afectados fueron la respuesta a estímulos endógenos (GO: 0009719), a estímulos químicos (GO: 0042221), a estímulos abióticos (GO: 0009628), a estrés (GO: 0006950) y a estímulos externos (GO: 0009605). De estas categorías, las más significativas fueron la respuesta a estímulos internos y a estímulos químicos, y dentro de estas categorías destacaban la respuesta a ácido salicílico (GO: 0009751) que contenía 13 genes, la respuesta a ácido jasmónico (GO: 0009753) con 19 genes, y la respuesta a hormonas (GO: 0009725), donde destacaban la respuesta a auxinas (GO: 0009733) con 25 genes y la respuesta a ácido abscísico (GO: 0009737) con 16.

En este mismo análisis, dentro de la categoría de procesos metabólicos (Fig. 3-12, GO: 0008152) también se obtuvo significatividad en 3 categorías: metabolismo secundario (GO: 0019748) con 24 genes, metabolismo de carbohidratos (GO: 0005975) con 43 genes, y biosíntesis de hormonas (GO: 0042446) con 8 genes. Dentro de la categoría Organización de Componentes Celulares se encontró la categoría modificaciones de la pared celular (GO: 0042545) con 13 genes.

En el análisis realizado en base a su Función Molecular tan sólo apareció una categoría principal enriquecida significativamente (Fig. 3-14), regulación de la transcripción (GO: 0030528), y dentro de ella, la categoría de factor de transcripción (GO: 0003700), con 84 genes presentes. En este análisis también aparecieron significativas dos subcategorías vinculadas a Actividad Catalítica (GO: 0003824), actividad liasa carbono-oxígeno (GO: 0016835) con 13 genes y actividad carboxilesterasa (GO:0004091) con 21 genes.

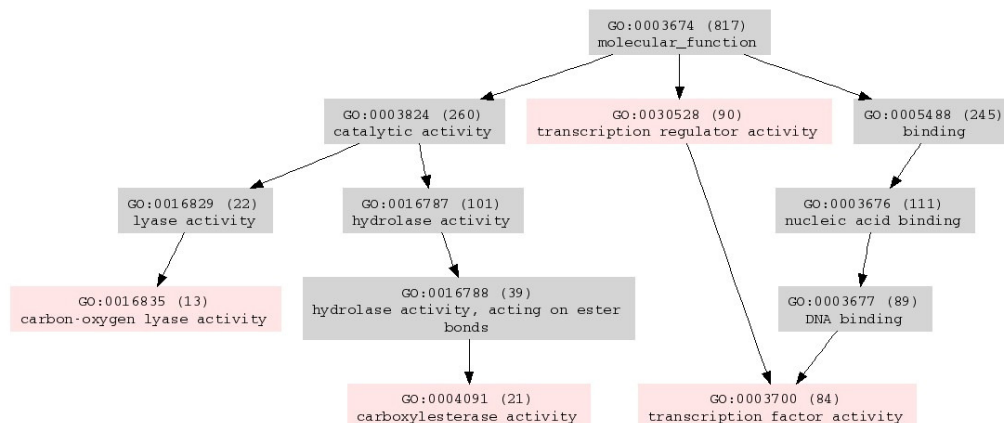


Figura 3-14: GO Función Molecular: resultado del análisis de categorías funcionales enriquecidas en base a función molecular. Los sectores en colores rojos indican grado de significatividad en función de la intensidad del color. Los cuadros en azul indican no significatividad.

Genes incluidos en las categorías GO enriquecidas.

Al examinar los listados de genes obtenidos en las categorías de metabolismo secundario, actividad catalítica y modificaciones de la pared celular, observamos que muchos de los genes incluidos estaban relacionados con tres procesos principalmente: la formación y modificación de la pared celular y la síntesis de flavonoides y antocianinas.

Pared celular:

A través de los análisis realizados identificamos un total de 40 genes implicados en procesos claves de la formación y mantenimiento de la pared celular, como la formación de celulosa (7 genes) (Fig. 3-15 A), la regulación de la extensibilidad de la pared celular (11 genes) (Fig. 3-15 B) y el metabolismo de las pectinas (22 genes) (Fig. 3-15 C), sugiriendo que nuestros alelos de FUL podrían presentar defectos en la formación y desarrollo de esta estructura celular. De estos 40 genes, tan sólo 17 eran susceptibles de ser dianas directas de FUL, de los cuales, sólo 2 eran compatibles con una posible activación por FUL.

Entre los genes implicados en la formación de celulosa (Fig. 3-14 A) encontramos genes implicados tanto en la síntesis de celulosa como en la degradación de glicanos. Por un lado podría estar estimulando la síntesis de celulosa a través de la *CELLULOSE SYNTHASA LIKE E1* (*CSLE1*), y por otro reprimiendo la expresión de genes implicados en la degradación de ésta, como los β -*GALACTURONIDASE2* (*BGAL2*) y la β -*GLUCOSIDASE17* (*BGLU17*). Entre los genes considerados como dianas indirectas de FUL, también encontramos reprimidos otros genes que codifican CSLs (*CSLD5* y *CSLG3*), una *BGAL* y una *BGLU*. Estos cambios de expresión respecto a frutos silvestres sugerían que FUL podría funcionar regulando de algún modo la síntesis de celulosa así como la degradación y/o modificación de la celulosa y hemicelulosa, indicando que FUL podría desempeñar un papel en el control de la composición de la pared celular durante el desarrollo del fruto.

A Celulosa					C Metabolismo de pectina				
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción	AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At3g52840	BGAL2	1,12	1,77	Glycan degradation	At1g11590	–	2,10	1,99	pectin degradation
At2g44480	BGLU17	1,11	1,74	Glycan degradation	At5g26810	–	3,29	1,46	pectin degradation
At1g55850	CSLE1	-0,43	0,89	cellulose biosynthesis	At4g03930	–	1,48	1,29	pectin degradation
At1g02730	CSLD5	-0,45	-1,05	cellulose biosynthesis	At3g28340	GATL10	0,54	1,17	pectin biosynthesis
At4g35010	BGAL11	-0,59	-1,09	Glycan degradation	At2g45220	–	1,03	1,15	pectin degradation
At4g23990	CSLG3	-1,33	-1,19	cellulose biosynthesis	At5g49360	BXL1	0,88	1,48	pectin modification
At2g44460	BGLU28	-0,83	-1,31	Glycan degradation	At1g02640	BXL2	0,79	-0,37	pectin modification
B Extensibilidad de la pared celular					At5g63180	–	1,76	-0,01	pectin degradation
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción	At1g67750	–	1,25	-0,59	pectin degradation
At3g45970	EXLA1	1,01	1,53	pH dependent cellulose microfibrille relaxation	At3g24230	–	0,41	-0,71	pectin degradation
At4g17030	EXLB1	1,49	1,28	pH dependent cellulose microfibrille relaxation	At5g09280	–	-0,30	-1,05	pectin degradation
At4g14130	XTH7	0,42	1,01	construction and restruction of xyloglucan cross-links	At1g70500	–	-0,25	-1,06	pectin degradation
At1g32170	XTH30	1,51	0,90	construction and restruction of xyloglucan cross-links	At1g78570	RHM1/ROL1	-1,01	-0,52	pectin precursor biosynthesis
At1g11545	XTH8	1,14	0,10	construction and restruction of xyloglucan cross-links	At5g26670	–	-0,85	-1,01	pectin degradation
At3g29030	EXPA5	-0,87	1,26	pH dependent cellulose microfibrille relaxation	At2g26450	–	-0,74	-1,03	pectin degradation
At2g40610	EXPA8	-1,48	-0,21	pH dependent cellulose microfibrille relaxation	At1g69940	PPME1	-0,52	-1,03	pectin degradation
At4g13090	XTH2	0,01	-1,10	construction and restruction of xyloglucan cross-links	At5g44840	–	-0,70	-1,07	pectin degradation
At2g36870	XTH32	-1,46	-1,19	construction and restruction of xyloglucan cross-links	At3g62170	VGDH2	-0,54	-1,20	pectin degradation
At2g37640	EXP3	-1,18	-1,34	pH dependent cellulose microfibrille relaxation	At2g23900	–	-0,72	-1,22	pectin degradation
At4g28250	EXPB3	-0,71	-1,49	pH dependent cellulose microfibrille relaxation	At3g07850	–	-0,77	-1,27	pectin degradation
					At3g14040	–	-1,21	-1,53	pectin degradation
					At5g47500	–	-1,37	-2,10	pectin degradation

Figura 3-14: Genes implicados en la formación y regulación de la pared celular. Los genes seleccionados se clasificaron en tres grupos: Metabolismo de celulosa (A), Extensibilidad de la pared celular (B) y Metabolismo de pectina (C). Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo=represor, naranja=activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

El siguiente grupo de genes identificados estaban implicados en la regulación de las propiedades de la pared celular que modulan la capacidad de crecimiento de la célula. En este grupo (Fig. 3-15 B) encontramos dos funciones representadas: genes implicados en la relajación de las fibras de celulosa que participan en la elongación celular (mediado por expansinas), y genes implicados en el corte de estas fibras de celulosa y la inclusión de nuevos

monómeros que sustentan la elongación celular (mediado por xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas (XTH)). Entre estos genes se identificaron 6 posibles dianas de FUL, donde se observó de nuevo un comportamiento dual. FUL podría actuar activando la expresión del gen *EXPANSIN A5 (EXPA5)*, una expansina, y por otro lado reprimiendo la expresión de 2 genes *EXPANSIN LIKE*, *EXLA1* y *EXLB1*, y tres genes *XTH*, *XTH7*, *XTH8* y *XTH30*. Entre los genes considerados dianas indirectas encontramos las mismas funciones representadas, tres expansinas, *EXPA8*, *EXP3* y *EXPB*, que estaban reprimidas también en el mutante *ful*, y dos *XTH*, *XTH2* que no cambiaba en el mutante, y *XTH32* que se encontraba reprimida.

El metabolismo de las pectinas, y en concreto su degradación, también apareció alterado (Fig. 3-14 C). En este grupo encontramos 8 posibles candidatos a ser dianas directas de FUL, y todas, eran compatibles con un modo de acción represor de FUL, apareciendo inducidos en el mutante *ful*. Tres de estos genes, *At1g11590*, *At4g03930* y *At2g45220*, eran inhibidores de pectinmetilesterasas (PMEI) que impiden la degradación de la pectina, otros dos, los genes β -*XYLODISASE1 (BXL1)* y *BXL2*, eran modificadores de pectinas, dos más, *At5g26810* y *At5g63180*, eran pectinliasas que promueven la degradación de la pectina, y un gen implicado en la síntesis de pectina, *GALACTUROSILTRANSFERASA LIKE 10 (GATL10)*. Entre los genes considerados dianas indirectas encontramos, dos PMEI, *At2g26450* y *VANGUARD 1 homolog 2 (VGDH2)*, 7 pectinliasas, *At5g09280*, *At1g70500*, *At5g44840*, *At2g23900*, *At3g07850*, *At3g14040* y *At5g47500*, una pectin acetilesterasa, *At5g26670*, un gen implicado en la síntesis de un precursor de la pectina (la ramanosa), *RHM1*, y una PME, *PPME1*, todos ellos reprimidos en el mutante *ful*. Otras dos posibles dianas indirectas de FUL, dos pectato liasa, *At1g67750* y *At3g24230*, mostraban un patrón de expresión opuesto al resto, mostrando activación en el fondo mutante *ful*.

Las respuestas del mutante *ful* y de la línea FUL:VP16 fueron muy similares, encontrando tan sólo 11 genes que presentaban niveles de expresión diferentes en cada línea. De estos 11 genes, 5 eran compatibles con una posible regulación directa de FUL. *CSLE1* y *EXPA5* presentaban niveles bajos en el mutante *ful* y altos en la línea FUL:VP16, lo cual podría indicar una posible regulación positiva por FUL. *XTH8*, *BXL2* y *At5g63180* eran compatibles con un posible efecto de competición por diana entre FUL y FUL:VP16, ya que mientras en el mutante *ful* estos genes estaban inducidos no presentaban cambios en la línea FUL:VP16. Los 6 genes regulados indirectamente que diferían entre *ful* y FUL:VP16 presentaban diferentes patrones de expresión. 3 de ellos no variaban en el mutante *ful* pero disminuían en la línea FUL:VP16 (*XTH2*, *At5g09280* y *At1g70500*), 1 estaba reprimido en el mutante *ful* y no variaba en FUL:VP16 (*EXPA8*) mientras que 2 aparecían activados en el mutante *ful* y reprimidos en FUL:VP16 (*At1g67750* y *At3g24230*).

Teniendo en cuenta los cambios de expresión observados, podríamos predecir que en los frutos del mutante *ful* existiría una menor síntesis de celulosa, niveles bajos de expansinas y unos niveles superiores de pectinas que en los frutos silvestres. Esta predicción estaría de acuerdo con el fenotipo del mutante *ful*, donde apenas existe elongación de las células de la valva (Fig. 3-8). Del mismo modo, en la línea FUL:VP16 existiría una mayor síntesis de celulosa, así como niveles más altos de expansinas que en el mutante *ful*, que serían compatibles con la mayor elongación de las células de estos frutos (Fig. 3-8).

Síntesis de flavonoides y antocianinas:

En este apartado se incluyen genes que afectan a la síntesis de flavonoides y antocianinas, ya que ambos productos se originan a partir de un precursor común. Este grupo estaba constituido únicamente por 8 genes (Fig. 3-16), y a excepción del gen *SENESCENCE RELATED 1* (*SRG1*), todos ellos estaban incluidos entre las posibles dianas indirectas de FUL. De los genes incluidos en esta lista destacan ANTHOCYANIDIN SYNTHASE (*ANS*) y FLAVONOL SYNTHASE 1 (*FLS1*) (Pelletier et al., 1997; Wilmouth et al., 2002), ambos genes clave en la síntesis de antocianinas y flavonoles respectivamente, al ser dos enzimas limitantes de estos procesos (Tanaka et al., 2008) y los factores de transcripción tipo MYB *PRODUCTION OF FLAVONOLGLICOSIDES 2* (*PFG2*) y *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 2* (*PAP2*), genes clave en la regulación génica de estos procesos de síntesis (Broun, 2005; Stracke et al., 2007). Basándonos en los niveles de expresión obtenidos, FUL podría estar afectando, mayoritariamente de forma indirecta, la síntesis de ambos compuestos. Los frutos *ful* en ocasiones desarrollan tonalidades rojizas o violáceas que sugieren niveles altos de antocianinas (Fig. 3-16). Los bajos niveles de expresión del gen *FLS1* en el mutante *ful* podría favorecer la acumulación de dihidroflavonoles que serían derivados a la síntesis de antocianinas (Stracke et al., 2009). Por otro lado, en los frutos FUL:VP16 podría ocurrir lo contrario, ya que los niveles de expresión del gen *FLS1* fueron normales mientras que los de *ANS* se encontraban reducidos.

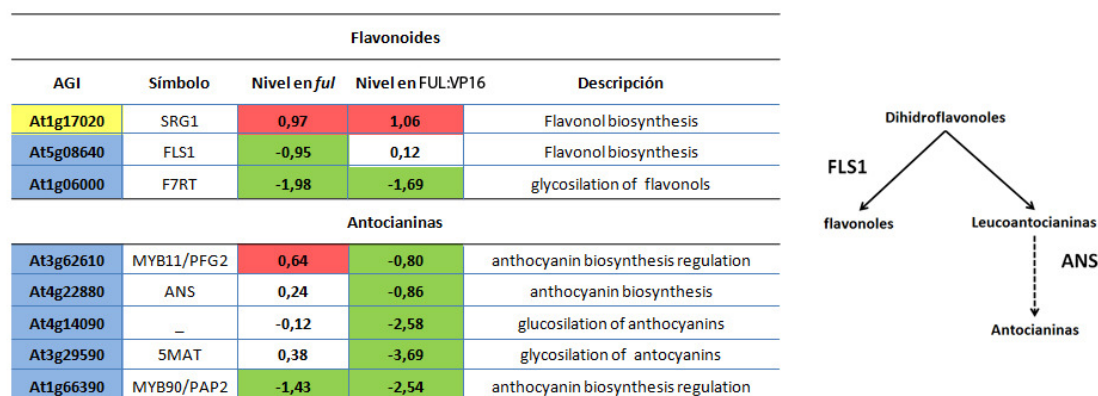


Figura 3-16: genes implicados en la síntesis de flavonoles y antocianinas. Los genes seleccionados se clasificaron en función del proceso en el que participaban, aunque algunos de ellos se ha visto que pueden tener un papel tanto en la síntesis de flavonoles como en la de antocianinas, como PFG2. A la izquierda se muestra un esquema simple del punto de partida de ambos procesos. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo=represor, naranja=activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

Factores de transcripción:

El análisis de enriquecimiento en términos GO de Función Molecular sugería que FUL podría estar regulando un elevado número de factores de transcripción (84). La gran cantidad de factores de transcripción identificados en este análisis indica que FUL podría ser un gen clave en la regulación génica de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo del fruto. La mayor parte de estos genes (60) presentaba patrones de expresión compatibles con una posible regulación directa por FUL (Fig. 3-17). En éste grupo de posibles genes regulados por FUL, tan sólo 6 eran compatibles con una posible activación por FUL. Entre estos 6 genes se incluía el propio gen FUL. Como era de esperar, en el mutante *ful* su expresión fue muy baja,

mientras que en la línea FUL:VP16 se encontró a niveles muy altos, ya que se debía detectar tanto la expresión del gen FUL endógeno como la expresión del alelo FUL:VP16. En este grupo también se incluían dos genes PIF like, *PIL5* y *PIL6*, pertenecientes a la familia de factores de transcripción tipo bHLH; *AG*, un factor de transcripción tipo MADS; y dos tipo MYB, el *MYB21* implicado en el desarrollo de los estambres (Cheng et al., 2009a; Mandaokar et al., 2006) y el MYB *At5g56840* para el que todavía no se ha descrito ninguna función.

AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción	AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At1g56010	NAC1	0,51	1,33	NAC transcription factor	At2g18550	HB21	1,40	2,19	HD-Zip I
At3g04070	NAC47	1,01	2,07	NAC transcription factor	At1g69600	HB29	1,01	1,35	HD-Zip I
At1g52880	NAM	0,77	1,18	NAC transcription factor	At4g36740	HB40	1,19	1,59	HD-Zip I
At1g69490	NAP	0,28	1,89	NAC transcription factor	At3g57230	AGL16	-0,24	0,79	MADS
At4g27410	RD26	0,43	1,73	NAC transcription factor	At3g57390	AGL18	0,31	1,02	MADS
At2g44745	—	1,26	0,01	WRKY Transcription Factor	At3g54340	AP3	0,36	1,65	MADS
At1g80840	WRKY40	0,32	1,50	WRKY Transcription Factor	At5g65080	MAF5	0,84	1,21	MADS
At5g49520	WRKY48	1,53	0,61	WRKY Transcription Factor	At5g20240	PI	0,52	2,36	MADS
At4g23810	WRKY53	0,46	1,18	WRKY Transcription Factor	At1g74660	MIF1	2,61	1,23	mini zinc finger
At1g16640	—	0,81	-0,30	AP2/B3 transcription factor	At4g37180	—	0,91	1,09	myb transcription factor
At1g25560	TEM1	0,41	1,38	AP2/B3 transcription factor	At4g01060	CPL3	0,56	1,76	myb transcription factor
At1g13260	VP11	0,79	1,17	AP2/B3 transcription factor	At3g23250	MYB15	0,53	1,24	myb transcription factor
At2g36080	—	0,79	1,56	B3 transcription factor	At5g61420	MYB28	0,56	1,48	myb transcription factor
At5g57780	—	0,22	1,62	bHLH	At3g01530	MYB57	-0,38	1,11	myb transcription factor
At1g25330	CESTA	0,10	1,35	bHLH	At4g05100	MYB74	0,73	1,47	myb transcription factor
At1g26945	KDR	1,28	-0,02	bHLH	At3g47600	MYB94	1,02	0,30	myb transcription factor
At2g46970	PIL1	1,30	0,24	bHLH	At5g53200	TRY	0,05	1,60	myb transcription factor
At4g36930	SPT	1,16	0,42	bHLH	At1g25550	—	0,88	1,12	myb transcription factor
At1g27730	ZAT10	0,94	1,46	Cys2/His2-type zinc-finger	At3g11280	MYB2 like	0,51	1,41	myb transcription factor
At5g04340	ZAT6	0,73	1,65	Cys2/His2-type zinc-finger	At1g02580	FIS1-MEDEA	0,39	3,52	Polycomb group gene
At2g25900	ATCTH	0,42	1,09	Cys3His zinc finger protein	At1g49130	—	0,57	1,75	zinc finger (B-box type)
At4g34410	RRTF1	-0,06	1,68	ERF/AP2 transcription factor	At4g29190	—	0,50	1,50	Zincfinger C-x8-C-x5-C-x3-H type
At1g12610	DDF1	0,12	1,04	ERF/AP2 transcription factor	At3g19580	AZF2	0,44	1,10	zinc finger protein
At2g22200	RAP2family	0,53	2,54	ERF/AP2 transcription factor	At5g59820	RHL41	0,96	1,07	zinc finger protein
At1g19210	RAP2family	0,62	1,71	ERF/AP2 transcription factor	At2g20180	PIL5	-0,45	0,92	bHLH
At4g17500	ATERF1	0,24	1,08	ERF/AP2 transcription factor	At3g59060	PIL6	-0,61	0,74	bHLH
At3g23240	ERF1	0,86	1,04	ERF/AP2 transcription factor	At4g18960	AG	-0,51	0,49	MADS
At5g61600	ERF104	1,59	1,45	ERF/AP2 transcription factor	At5g60910	FUL	-2,29	2,17	MADS
At1g28370	ERF11	0,51	1,44	ERF/AP2 transcription factor	At3g27810	MYB21	-0,54	0,48	myb family transcription factor
At5g21960	ERF16	0,88	1,26	ERF/AP2 transcription factor	At5g56840	—	-0,81	1,51	myb-like transcription factor

Figura 3-17: Factores de transcripción. Posibles dianas directas de FUL encontradas entre los genes incluidos en la categoría funcional de factores de transcripción. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción que indica el tipo de factor de transcripción que son. En el código AGI los colores representan el posible efecto regulador de FUL sobre ellos (amarillo=represor, naranja=activador). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

El grupo de posibles dianas reprimidas por FUL estaba constituido por 54 genes, que pertenecían a diferentes familias, entre los que se encontraban factores de transcripción NAC, WRKY, AP2/B3, B3, bHLH, zinc finger, ERF/AP2, HD-Zip I, MADS, MYB y un miembro del complejo Polycomb de remodelación de cromatina.

El grupo de factores de transcripción incompatibles con una regulación directa por FUL contenía 24 genes (Fig. 3-18). Entre ellos también encontramos diferentes clases de factores de transcripción como NAC, ARF, bHLH, zinc finger, GRAS, MADS, MYB, ARR, SPL, TCP y YAB.

Durante el desarrollo de fruto son claves los efectos de diferentes hormonas, como las auxinas y las giberelinas. En el listado obtenido también se pueden identificar diferentes factores de transcripción que median las respuestas a estas hormonas, aunque no son especialmente abundantes. Entre ellos encontraríamos el factor de respuesta a auxinas *ARF4*, que junto a *ETT/ARF3* participaría en el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial y apical-basal, y 4 genes PIF-like (*PIL1*, *SPT*, *PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5*), que podrían estar mediando la respuesta a

giberelinas. Otro grupo de factores de transcripción identificados en este apartado son los ERF/AP2. Muchos de estos factores de transcripción median la respuesta a etileno, una hormona clave en el desarrollo de los frutos climatéricos. Para el resto de factores de transcripción no se ha descrito un papel durante el desarrollo del fruto. Entre ellos encontramos genes implicados en procesos como la transición floral, como *TEMPRANILLO1* (*TEM1*), *MADS AFFECTING FLOWERING5* (*MAF5*), *AGAMOUS LIKE 42* (*AGL42*), *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE 9* (*SPL9*) y *SPL10*, o el establecimiento de la identidad de los órganos florales, como *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) y *SEPALLATA4* (*SEP4*). *AP3* y *PI* no se expresan durante el desarrollo del fruto silvestre, y su expresión aumentada en los frutos FUL:VP16 podría significar un papel de FUL en excluir su expresión en estos tejidos.

AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At2g02450	NAC35	-2,11	-1,49	NAC transcription factor
At5g60450	ARF4	0,70	-0,46	auxin-responsive factor
At1g12860	ICE2	-1,36	-0,96	bHLH
At3g28857	PRE5/bHLH166	-1,24	-2,25	bHLH
At4g01460	–	-1,59	-1,85	bHLH
At4g17880	MYC4	-0,67	0,35	bHLH
At5g39860	PRE1/bHLH136	-1,97	-2,34	bHLH
At3g61950	–	-1,84	-1,29	bHLH
At3g58070	GIS	0,39	-0,67	Cys2/His2-type zinc-finger proteins
At1g63100	–	-1,16	-1,74	GRAS family transcription factor
At2g03710	SEP4	-1,53	-2,10	MADS
At5g62165	AGL42	-0,88	-1,21	MADS
At1g47760	AGL102	0,32	-1,10	MADS
At1g66390	MYB90/PAP2	-1,43	-2,54	myb family transcription factor
At3g12820	MYB10	1,70	-0,42	myb family transcription factor
At3g62610	MYB11/PFG2	0,64	-0,80	myb family transcription factor
At1g74890	ARR15	-0,45	-1,24	nuclear response regulator
At1g27370	SPL10	-0,54	-1,12	SPL transcription factor
At2g42200	SPL9	-1,05	-1,29	SPL transcription factor
At2g31070	TCP10	-1,21	-1,41	TCP transcription factor
At1g68800	TCP12	0,17	-0,91	TCP transcription factor
At5g57180	CIA2	-1,14	-0,94	Transcription regulator
At2g45190	YAB1/FIL	0,43	-1,39	YABBY
At5g44260	–	-2,35	-0,72	Zincfinger C-x8-C-x5-C-x3-H type

Figura 3-18: Factores de transcripción. Posibles dianas indirectas de FUL encontradas entre los genes incluidos en la categoría funcional de factores de transcripción. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción que indica el tipo de factor de transcripción que son. En el código AGI el color azul indica que son genes posiblemente regulados indirectamente. En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

La respuesta observada en el mutante *ful* fue de nuevo muy similar a la de la línea FUL:VP16, pero entre las posibles dianas directas de FUL, además de los 6 genes identificados sobre los que FUL podría comportarse como un activador de la transcripción (*PIL5/PIF1*, *PIL6/PIF5*, *AG*, *FUL*, *MYB21* y *At5g56840*), se observaron diferencias en el comportamiento de 18 genes más

entre el mutante *ful* y la línea FUL:VP16. De estos 18 genes, 13 eran compatibles con una posible regulación redundante de FUL junto a otros factores, ya que aunque no cambiaban en el mutante *ful*, se encontraban sobreexpresados en la línea FUL:VP16 (*NAC-LIKE*, *ACTIVATED BY AP3/PI (NAP)*, *WRKY40*, *At5g57780*, *CESTA (CES)*, *REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 (RRTF1)*, *DWARF* y *DELAYED FLOWERING 1 (DDF1)*, *ATERF1*, *AGL16*, *AGL18*, *AP3*, *MYB57*, *TRIPTYCHON (TRY)* y *FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 1 (FIS1)*). La expresión de los 5 genes restantes (*At2g44745*, *At1g16640*, *KIDARI (KDR)*, *PIL1* y *MYB94*) eran compatibles con un posible efecto de competición por diana entre FUL y FUL:VP16, ya que mientras en el mutante *ful* estos genes estaban inducidos no presentaban cambios en la línea FUL:VP16.

En los genes compatibles con una regulación indirecta también se encontraron 8 genes que se expresaban de forma distinta en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16. De estos genes, 4 presentaban inducción en el mutante *ful* y represión en la línea FUL:VP16 (*ARF4*, *MYB10*, *MYB11/PFG2* y *YAB1/FIL*), 3 genes no cambiaban en el mutante *ful* y se encontraban reprimidos en la línea FUL:VP16 (*GLABROUS INFLORESCENCE STEMS (GIS)*, *AGL102* y *TCP12*), y un gen que se encontraba reprimido en el mutante *ful* y no variaba en la línea FUL:VP16 (*MYC4*).

Un hecho que nos resultó llamativo de estos listados fue la poca presencia relativa de genes para los que se había descrito un papel importante durante el desarrollo del gineceo, tan sólo *SPT*, *FIL* y *AG*. Por ello volvimos a examinar los datos crudos de las micromatrices para ver que ocurría con la expresión de estos genes. Al hacerlo observamos que algunos genes como *CRC*, *IND*, *STY1*, *STY2*, *NGA2*, *NGA3*, *NGA4*, *HEC1*, *HEC2* y *HEC3* no estaban presentes en el análisis al no haber superado los criterios de calidad, y otros como *SHP1*, *SHP2*, *NGA1*, *RPL* y *ALC* sí que estaban presentes pero no habían resultado significativos, bien porque no presentaban grandes cambios respecto al silvestre, como *ALC*, *NGA1* o *RPL*, o bien porque existía una variabilidad muy grande entre las muestras que los excluía del tratamiento estadístico, como los genes *SHP*.

Para comprobar si los datos deducidos de las micromatrices realmente reflejaban cambios en la regulación de los genes identificados, decidimos analizar la expresión de alguno de los genes que presentaban una posible regulación diferente en *ful* o FUL:VP16 individualmente y con más detalle. Uno de los genes elegidos fue *SPT*, por su implicación durante el desarrollo del gineceo. La expresión de *SPT* se comprobó combinando la línea FUL:VP16 con una línea delatora *SPT::GUS*. La combinación resultante confirmó los resultados de las micromatrices al detectarse la señal *GUS* ectópicamente en las valvas de la línea FUL:VP16 (Fig. 3-19). Además, cuando se combinó un mutante *spt* con la línea FUL:VP16 se observó que se suprimía parte del fenotipo del fruto FUL:VP16, en concreto el ensanchamiento de la zona apical.

También se decidió testar la expresión de los genes de identidad floral *AG* y *AP3*. Para ello se combinaron las líneas deladoras *AP3::GUS* y *AG::GUS* con la línea FUL:VP16. La expresión de *AP3* estaba alterada, expresándose ectópicamente en las valvas de los frutos de la línea FUL:VP16 (Fig. 3-20) y explicando así el incremento de sus niveles detectado en los frutos FUL:VP16. Por otro lado, el patrón de expresión de *AG* parecía no estar afectado (Fig. 3-20). Los cambios de expresión de *AG* en la línea FUL:VP16 detectados en el experimento de micromatrices eran modestos, y podrían corresponder a cambios en su nivel no asociados a

cambió en su patrón. El hecho de que *AG* no cambiara su patrón de expresión sugería que *FUL* no estaría regulando directamente la expresión de este gen, mientras que sí podría hacerlo con *AP3*.



Figura 3-19: Expresión de *SPT* en frutos silvestres (izquierda) y en frutos *FUL:VP16* (centro). La expresión de *SPT* aparece ectópica en la línea *FUL:VP16* indicando que *FUL* podría actuar directamente sobre este gen. La eliminación de *SPT* en la línea *FUL:VP16* rescata parte del fenotipo mostrado por esta línea, suprimándose el ensanchamiento de la zona apical del fruto (asterisco).

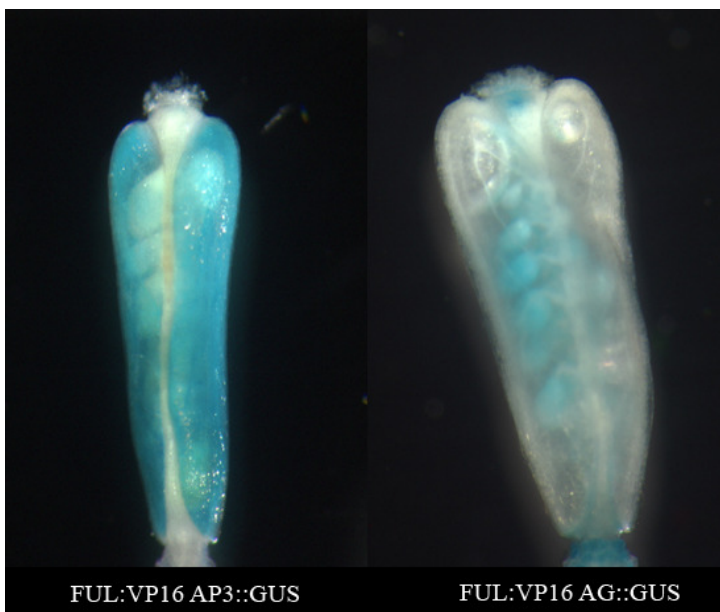


Figura 3-20: expresión de *AP3* y *AG* en los frutos *FUL:VP16*. *AP3* es un gen homeótico que se expresa únicamente durante el desarrollo floral. En la línea *FUL:VP16* se expresa de forma ectópica en toda la valva (izquierda), indicando que podría existir una regulación directa de este gen por *FUL*. Por otro lado, *AG* no altera su patrón de expresión en los frutos *FUL:VP16* (derecha).

Hormonas

El análisis de categorías GO también nos sugería que *FUL* estaría implicado en el control de la respuesta a diferentes estímulos, entre los que destacaban las respuestas a hormonas como auxinas, ácido abscísico, ácido jasmónico o ácido salicílico (Fig. 3-13). En este análisis también se observó que la biosíntesis de algunas hormonas como auxinas, giberelinas, etileno o ácido abscísico también podría estar afectada por *FUL*:

-Giberelinas:

En los procesos que controlan los niveles de GA encontramos el gen *GA2ox6*, cuyo producto participa en la inactivación de las giberelinas activas (Wang et al., 2004) (Fig. 3-21). La expresión de este gen no variaba en el mutante *ful*, pero se encontró sobreexpresado en la línea FUL:VP16, sugiriendo que en ésta podrían estar reducidas las giberelinas activas. Este tipo de patrón de expresión sería compatible con una posible regulación directa de *GA2ox6* por FUL, aunque de forma redundante con otros factores.

En el análisis de categorías funcionales no se obtuvo ningún grupo de genes de respuesta a giberelinas pero como en la categoría de síntesis de hormonas se encontraba un gen que podía afectar a los niveles de esta hormona, decidimos inspeccionar el grupo inicial de genes significativos, seleccionando aquellos para los que se había descrito un papel en la respuesta a giberelinas, identificando 12 genes (Fig. 3-21). De estos 12 genes, 8 eran susceptibles de estar regulados directamente por FUL, de los que 4 eran genes PIF-like (*SPT*, *PIL1*, *PIL5/PIF1*, y *PIL6/PIF5*), que participan en la transducción de la señal de las giberelinas.

GIBERELINAS				
Síntesis				
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At1g02400	GA2ox6	0,25	1,25	Gibberellin inactivation
Respuesta				
At1g75750	GASA1	1,20	1,96	Gibberellin-regulated
At1g74670	GASA6	1,69	0,84	Gibberellin-regulated
At5g61420	MYB28	0,56	1,48	MYB transcription factor
At4g36930	SPT	1,16	0,42	Gibberellin response
At2g46970	PIL1	1,30	0,24	Gibberellin response
At2g14900	GASA7	1,30	-0,03	Gibberellin-regulated
At2g20180	PIL5	-0,45	0,92	Gibberellin-regulated
At3g59060	PIL6	-0,61	0,74	Gibberellin response
At5g15230	GASA4	0,64	-0,48	Gibberellin-regulated
At4g36880	CP1	0,25	-1,47	upregulated in response to gibberellins
At3g58070	GIS	0,39	-0,67	upregulated in response to gibberellins
At2g37640	EXP3	-1,18	-1,34	upregulated in response to gibberellins

Figura 3-19: Respuesta a giberelinas. Genes implicados en la síntesis y la respuesta a giberelinas encontrados entre nuestro listado de genes significativos. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo=represor, naranja=activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

La respuesta a giberelinas fue diferente entre el mutante *ful* y la línea FUL:VP16, ya que de los 12 genes considerados, 7 se comportaban de forma diferente en ambas líneas. De estos 9 genes, 4 eran posibles dianas directas: 2 genes que presentaban niveles altos en *ful* y que no variaban en FUL:VP16 (*PIL1* y *GASA7*), patrón de expresión compatible con un posible efecto de competición por diana entre FUL y FUL:VP16, y dos genes compatibles con una activación directa por FUL (*PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5*). Los 3 genes restantes estaban reprimidos en la línea

FUL:VP16, pero dos de ellos no cambiaban en el mutante *ful* (*CYSTEINE PROTEINASE1 (CP1)* y *GIS*) mientras que el tercero estaba activado (*GASA4*).

-Ácido abscísico:

Tanto la síntesis como la respuesta a ácido abscísico aparecieron enriquecidas en el análisis de categorías funcionales (Fig. 3-22).

Ácido abscísico				
Síntesis				
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At5g45340	CYP707A3	-0,74	0,85	ABA catabolism
Respuesta				
At1g27730	STZ/ZAT10	0,94	1,46	upregulated in response to ABA
At1g75750	GASA1	1,20	1,96	Gibberellin-regulated
At1g76930	EXT4	1,11	1,07	upregulated in response to ABA
At2g05520	GRP3	0,90	1,37	upregulated in response to ABA
At3g19580	AZF2	0,44	1,10	upregulated in response to ABA
At4g05100	MYB74	0,73	1,47	MYB transcription factor
At4g18010	SPTASE2	0,47	1,06	upregulated in response to ABA
At4g27410	RD26	0,43	1,73	upregulated in response to ABA
At5g61420	MYB28	0,56	1,48	MYB transcription factor
At1g29395	COR414TM1	-0,09	1,18	upregulated in response to ABA
At4g04020	FIB FIBRILLIN	-0,35	0,71	Regulated by abscisic acid response regulators
At4g23600	COR13/JR2	-1,63	2,36	responsive to jasmonic acid
At3g47600	MYB94	1,02	0,30	MYB transcription factor
At3g59220	PRN PIRIN	1,15	0,36	ABA regulated
At5g25610	RD22	0,88	-0,35	upregulated in response to ABA
At1g80080	TMM/RLP17	-2,00	-1,45	ABA regulated

Figura 3-20: Respuesta a abscísico. Genes de síntesis y respuesta a ácido abscísico encontrados entre nuestro listado de genes significativos. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo=represor, naranja=activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

Afectando a los niveles de ABA sólo encontramos el gen CYP707A3, implicado en el catabolismo de esta hormona (Umezawa et al., 2006). Este gen presentaba un patrón de expresión compatible con una posible regulación directa positiva por FUL, estando reprimido en el mutante *ful* y sobreexpresado en la línea FUL:VP16. Estos datos sugerían que en el mutante *ful* podría existir un nivel más elevado de ABA que en frutos silvestres mientras que en la línea FUL:VP16 ocurriría lo contrario.

A excepción de un gen (*TWO MANY MOUTHS (TMM)*), todos los genes identificados que participaban en la respuesta a ABA eran compatibles con una posible regulación directa por FUL. A excepción del gen *CORONATINE INDUCED 1 (COR13)* que se encontraba reprimido en el mutante *ful*, y activado en la línea FUL:VP16, por lo que podría estar activado directamente por FUL, el resto de genes presentaban patrones de expresión compatibles con un modo de acción

repressor de FUL. De nuevo se encontraban diferencias entre la respuesta del mutante *ful* y la línea FUL:VP16, aunque tan sólo en la expresión de 6 genes. Dos de ellos, *FIBRILLIN1a* (*FIB*) y *COLD REGULATED 414 THYLAKOID MEMBRANE* (*COR414-TM1*), sólo presentaban cambios en la línea FUL:VP16, donde estaban sobreexpresados, y 3 genes, *MYB94*, *PIRIN1*(*PRN1*) y *RESPONSIVE TO DESSICATION 22* (*RD22*), estaban activados en el mutante y no cambiaban en la línea FUL:VP16. El otro gen que mostraba un comportamiento diferente era *COR13*.

-Etileno:

El etileno fue otra de las hormonas afectadas. El análisis de categorías funcionales mostró que existía un enriquecimiento en genes que afectaban al proceso de síntesis de la hormona (Fig.3-21).

ETILENO				
Síntesis				
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At1g12010	ACCox	1,07	2,33	Ethylene synthesis
At4g08040	ACS11	1,72	2,50	Ethylene synthesis
At4g11280	ACS6	-0,54	0,57	Ethylene synthesis
At1g73500	MKK9	-0,05	1,19	Induces ethylene synthesis
Respuesta				
At1g28370	ERF11	0,51	1,44	ethylene response factor
At1g56010	NAC1	0,51	1,33	involved in stress responses
At1g74660	MIF1	2,61	1,23	response to ethylene
At2g05520	GRP3	0,90	1,37	upregulated in response to ethylene
At2g38900	PR	1,17	0,09	upregulated in response to ethylene
At3g04720	PR4/HEL	1,69	1,70	upregulated in response to ethylene
At3g23240	ERF1	0,86	1,04	ethylene response factor
At3g23250	MYB15	0,53	1,24	Member of the R2R3 factor gene family.
At3g47600	MYB94	1,02	0,30	MYB transcription factor
At4g05100	MYB74	0,73	1,47	Member of the R2R3 factor gene family.
At4g17500	ATERF1	0,24	1,08	ethylene response factor
At4g34410	RRTF1	-0,06	1,68	ethylene response factor
At5g21960	ERF16	0,88	1,26	ethylene response factor
At5g61600	ERF104	1,59	1,45	ethylene response factor

Figura 3-21: Respuesta a etileno. Genes implicados en la síntesis y la respuesta a etileno encontrados entre nuestro listado de genes significativos. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo = repressor, naranja = activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

La síntesis de etileno es un proceso que requiere únicamente la acción de dos actividades enzimáticas: la actividad ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACS), que convierte la S-adenosil-metionina (SAM) en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), y la actividad ACC oxidasa (ACO), que convierte el ACC en etileno. En el grupo de genes implicados en la síntesis encontramos 4 genes, todos ellos compatibles con una posible regulación directa por FUL, entre los que encontramos genes que codifican los dos tipos de enzimas que participan en

la síntesis de etileno. DOS de ellos eran *AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE (ACS)*, *ACS6* y *ACS11*, que catalizan el primer paso de síntesis del etileno, y un gen *ACO*, que cataliza el segundo y último paso en la síntesis del etileno. El cuarto gen era una MAP quinasa, *MKK9*, que induce la síntesis del etileno.

Los dos genes *ACS* parecían estar regulados de forma opuesta por FUL. *ACS11* estaba sobreexpresado tanto en *ful* como en la línea FUL:VP16, lo cual era compatible con una posible regulación negativa del gen, mientras que *ACS6* presentaba bajos niveles de expresión en el mutante *ful*, pero estaba sobreexpresado en la línea FUL:VP16, lo cual era compatible con un efecto activador de FUL. El gen *ACO*, al igual que *ACS11*, se encontraba sobreexpresado en ambas líneas, mientras que *MKK9* sólo presentaba activación en la línea FUL:VP16, que sería compatible con una regulación negativa redundante de este gen por FUL.

El hecho de tener sobreexpresadas las dos actividades enzimáticas que dan lugar al etileno sugería que posiblemente, tanto en el mutante *ful* como en la línea FUL:VP16 pudieran existir niveles elevados de etileno, pero en el análisis de categorías funcionales no se detectó ningún enriquecimiento en genes dentro de la respuesta a etileno. Sin embargo, una inspección detallada del listado de genes seleccionados nos permitió identificar 14 genes de respuesta a etileno (Fig. 3-21) y de acuerdo con la posible existencia de niveles elevados de etileno, prácticamente todos ellos aparecían sobreexpresados tanto en *ful* como en FUL:VP16. Sus patrones de expresión eran a su vez compatibles con una posible regulación directa negativa por FUL. Solo existían 4 genes que se comportaban de forma diferente en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16, dos genes que no presentaban cambios de expresión en el mutante *ful* y que estaban sobreexpresados en FUL:VP16 (*AtERF1* y *RRTF1*) y dos genes que estaban sobreexpresados en el mutante *ful* pero no cambiaban en la línea FUL:VP16 (*PATHOGENESIS RELATED TYPE6 (PR6)* y *MYB94*)

-Ácido jasmónico:

Otro grupo de genes que apareció en el análisis de categorías funcionales estaba implicado en la respuesta a la hormona ácido jasmónico (Fig. 3-22). Dentro de este grupo de respuesta a jasmónico se encontraba el gen *LOX2*, que además de responder a esta hormona también participa en la síntesis de la misma (Bell et al., 1995; Delker et al., 2006). Este gen presentaba niveles bajos de expresión en el mutante *ful*, mientras que estaba sobreexpresado en la línea FUL:VP16. Este patrón de expresión era compatible con una posible regulación directa positiva por FUL.

Los genes incluidos en la categoría de respuesta a ácido jasmónico fueron 18, de los cuales, 14 eran compatibles con una posible regulación directa por FUL. Entre estas posibles dianas directas de FUL, FUL podría actuar como un represor en 11 de ellas, y como activador en 3.

Las diferencias en la respuesta del mutante *ful* y la línea FUL:VP16 se centraban en 8 genes. De estos 8 genes, dos eran compatibles con una regulación indirecta, *ANS* que estaba reprimido en la línea FUL:VP16, y *MYC4* que estaba reprimido en el mutante *ful*. Entre los otros 6 se encontraban los genes que eran compatibles con una posible regulación directa positiva por FUL (*At2g34810*, *MYB21* y *COR13*), dos genes cuyos patrones de expresión eran compatibles con una posible regulación redundante por FUL (*JASMONATE ZIM-DOMAIN 7 (JAZ7)* y *JAZ8*) y

un gen que presentaba un patrón de expresión compatible con un posible efecto de competición por diana entre FUL y FUL:VP16 (*MYB94*).

Ácido jasmónico				
Síntesis				
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At3g45140	LOX2	-1,21	0,71	JA-response and synthesis
Respuesta				
At1g28480	ROXY19	0,98	1,04	suppresses JA-response
At1g76930	EXT4	1,11	1,07	JA-response
At3g23240	ERF1	0,86	1,04	Ethylene response factor
At3g23250	MYB15	0,53	1,24	MYB transcription factor
At4g01060	CPL3	0,56	1,76	MYB transcription factor
At4g05100	MYB74	0,73	1,47	MYB transcription factor
At4g35770	SEN1/DIN1	2,31	2,81	JA-response
At5g61420	MYB28	0,56	1,48	MYB transcription factor
At2g34600	JAZ7	-0,03	1,52	jasmonate-zim-domain
At1g30135	JAZ8	0,02	1,37	jasmonate-zim-domain
At2g34810	-	-0,72	1,06	JA-response
At3g27810	MYB21	-0,54	0,48	JA-response
At4g23600	COR13/JR2	-1,63	2,36	JA-response
At3g47600	MYB94	1,02	0,30	MYB transcription factor
At4g22880	ANS	0,24	-0,86	JA-response
At4g17880	MYC4	-0,67	0,35	JA-response
At1g54040	ESP/TASTY	-1,16	-1,63	JA-response
At2g24210	TPS10	-1,03	-1,80	JA-response

Figura 3-22: Respuesta a ácido jasmónico. Genes implicados en la síntesis y la respuesta a ácido jasmónico encontrados entre nuestro listado de genes significativos. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo=represor, naranja=activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

Entre los genes que presentaban un comportamiento diferente entre *ful* y FUL:VP16 se encontraron genes que participaban en diferentes niveles dentro de la señalización de esta hormona: *LOX2* (Delker et al., 2006) afecta a la síntesis de la hormona, los genes *JAZ* actúan como represores de la señalización (Chini et al., 2007), y *MYB21* y *MYC4* actúan como efectores positivos de esta señalización (Fernandez-Calvo et al., 2011; Song et al., 2011). Aunque ninguna función se ha atribuido al ácido jasmónico durante el desarrollo del fruto, nuestros resultados indicaban que esta hormona podría estar actuando durante esta etapa del desarrollo y que FUL podría estar modulando su actividad.

-Ácido salicílico:

Otra categoría funcional enriquecida en el análisis de categorías funcionales fue la respuesta a ácido salicílico (Fig. 3-23), donde encontramos 13 genes, todos ellos compatibles con una posible regulación directa negativa por FUL. No se encontró ningún gen implicado en la síntesis

o la regulación de los niveles de esta hormona entre los genes seleccionados inicialmente, por lo que los cambios observados en la respuesta a esta hormona podrían ser consecuencia directa de la regulación ejercida por FUL, o bien porque pudieran estar afectados por cambios en otras hormonas.

Respuesta a ácido salicílico				
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At1g21270	WAK2	1,02	0,55	response to SA
At1g28480	ROXY19	0,98	1,04	response to SA
At1g76930	EXT4	1,11	1,07	response to SA
At2g05520	GRP3	0,90	1,37	response to SA
At3g11280	MYB2 like	0,51	1,41	response to SA
At3g52400	SYP122	0,65	1,17	response to SA
At3g61190	BAP1	0,90	1,53	response to SA
At4g01060	CPL3	0,56	1,76	response to SA
At4g23170	EP1/CRK9	0,83	1,01	response to SA
At5g61420	MYB28	0,56	1,48	response to SA
At1g80840	WRKY40	0,32	1,50	response to SA
At2g40000	HSPRO2	0,26	1,20	response to SA
At3g47600	MYB94	1,02	0,30	response to SA

Figura 3-23: Respuesta a ácido salicílico. Genes de respuesta a ácido salicílico encontrados entre nuestro listado de genes significativos. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo=represor, naranja=activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

La respuesta observada en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16 sólo diferían en tres genes, *WRKY40* y *ARABIDOPSIS ORTHOLOG OF SUGAR BEET HS1 PRO-1 2 (HSPRO2)*, que no cambiaban en el mutante *ful* pero estaban sobreexpresados en la línea FUL:VP16, y *MYB94*, que estaba sobreexpresado en el mutante *ful* y no cambiaba en FUL:VP16.

-Auxinas:

Tanto la síntesis como la respuesta a auxinas fueron los grupos que más genes incluían tras el análisis de categorías funcionales. En el grupo de genes que participaban en la síntesis o la regulación de los niveles de esta hormona encontramos 6 genes de los cuales tan sólo dos eran susceptibles de ser diana directas de FUL, mientras que en el grupo de genes implicados en la respuesta a esta hormona se identificaron con 25 genes, 16 de los cuales presentaban patrones de expresión compatibles con una posible regulación directa por FUL (Fig. 3-24).

Los dos genes compatibles con una posible regulación directa por FUL implicados en la síntesis de auxinas, *SUPERROOT2 (SUR2)* y *NITRILASE2*, parecían estar regulados de forma diferente. *SUR2* inicia la formación de glucosinolatos indólicos a partir de indol-3-acetaldoxima (IAOx), un intermediario de la síntesis de la auxina ácido indolacético (IAA) (Fig. 3-25). *SUR2* no mostraba cambios en el mutante *ful*, pero estaba sobreexpresado en la línea FUL:VP16, un comportamiento compatible con una posible regulación redundante por FUL. Por su parte, *NIT2* cataliza uno de los últimos pasos en la síntesis de IAA, mediando la transformación de

indol acetónitrilo (IAN) obtenido a partir del IAOx, en IAA (Fig. 3-25). *NIT2* aparecía sobreexpresado en ambas líneas, compatible con una represión directa por FUL.

Auxinas				
Síntesis				
AGI	Símbolo	Nivel en <i>ful</i>	Nivel en FUL:VP16	Descripción
At1g04610	YUC3-YUCCA3	-0,04	-1,15	Auxin synthesis
At5g25620	YUC6	-1,00	-0,84	Auxin synthesis
At4g31500	CYP83B1/SUR2	-0,36	0,92	Biosynthetic pathway of glucosinolates
At3g44300	NIT2	1,43	1,10	Auxin synthesis
At1g70560	TAA1	0,54	-0,53	Auxin synthesis
At1g05680	UGT74E2	-2,79	-3,12	Auxin homeostasis
Respuesta				
At1g56150	–	0,81	1,02	SAUR-like auxin-responsive protein
At2g21210	–	0,48	1,38	Putative auxin-regulated protein
At2g21220	–	1,10	1,02	SAUR-like auxin-responsive protein
At2g45210	–	0,81	1,50	SAUR-like auxin-responsive protein
At3g60690	–	1,04	1,48	SAUR-like auxin-responsive protein
At4g12550	AIR1	2,40	0,97	Up-regulated by auxins
At4g36740	HB40	1,19	1,59	Up-regulated by auxins
At1g74660	MIF1	2,61	1,23	Up-regulated by auxins
At3g23250	MYB15	0,53	1,24	Member of the R2R3 factor gene family.
At5g61420	MYB28	0,56	1,48	Encodes a putative transcription factor (MYB28).
At1g56010	NAC1	0,51	1,33	Up-regulated by auxins
At3g03820	–	0,82	-0,22	SAUR-like auxin-responsive protein
At2g04160	AIR3	1,08	-0,03	Up-regulated by auxins
At3g47600	MYB94	1,02	0,30	Encodes a putative transcription factor (MYB94).
At5g60450	ARF4	0,70	-0,46	Auxin response factor
At1g72430	–	0,28	2,32	SAUR-like auxin-responsive protein
At5g18080	–	-1,14	-0,27	SAUR-like auxin-responsive protein
At1g29430	–	-1,30	-0,91	SAUR-like auxin-responsive protein
At1g29440	–	-1,18	-0,93	SAUR-like auxin-responsive protein
At5g18020	–	-1,62	-0,41	SAUR-like auxin-responsive protein
At5g18030	–	-1,10	-0,50	SAUR-like auxin-responsive protein
At5g27780	–	-1,28	-0,92	SAUR-like auxin-responsive protein
At1g29510	SAUR68	-1,06	-0,80	SAUR-like auxin-responsive protein
At5g18050	SAUR-like	-1,46	-0,75	SAUR-like auxin-responsive protein
At5g18060	SAUR-like	-1,37	-0,47	SAUR-like auxin-responsive protein

Figura 3-24: Respuesta a auxinas. Genes implicados en la síntesis y la de respuesta a auxina. Se muestran el código AGI, el símbolo, los niveles de expresión en *ful* y en la línea FUL:VP16 y una pequeña descripción de la función de cada gen. En el código AGI los colores representan si el gen se considera una posible diana directa (amarillo=represor, naranja=activador) o indirecta (azul). En las columnas de nivel de expresión el color rojo indica activación, y el color verde represión, respecto a la línea silvestre.

El resto de genes encontrados en este grupo, y que serían dianas indirectas de FUL, fueron *YUCCA3* (*YUC3*), *YUC6*, *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1* (*TAA1*) y *UGT74E2*. Los tres primeros son genes claves en la síntesis de IAA. Mientras que los genes YUC

inician una ruta de síntesis del IAA a partir de un derivado del triptófano que transforman en IAOx (Fig. 3-25), TAA1 es el responsable del inicio de otra ruta de síntesis que parte directamente del triptófano y que tiene por intermediario el ácido indolpirúvico (IPA) (Fig. 3-25). UGT74E2 media la glucosilación del ácido indol butírico (IBA), otra auxina presente en *Arabidopsis*. Se ha propuesto que existe un equilibrio entre los niveles de IBA y IAA y que ambas formas de la hormona podrían participar en la regulación de procesos de desarrollo. Cuando está presente UGT74E2 se promueve la formación de formas inactivas de IBA, y esto provoca el paso de IAA a IBA (Tognetti et al., 2010).

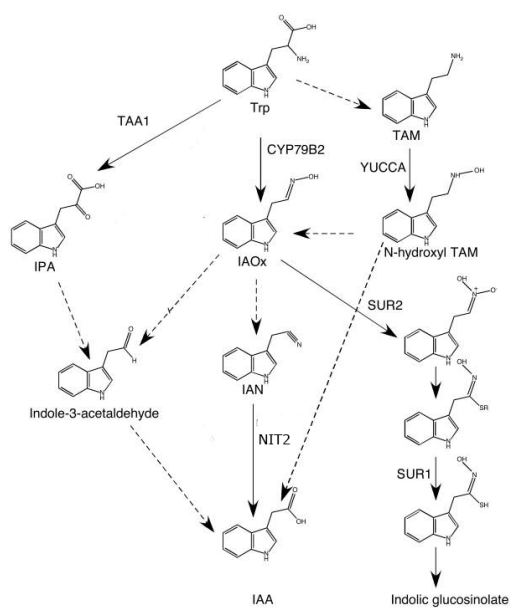


Fig. 3-25: Posibles rutas de síntesis de las auxinas. Se ha propuesto diferentes rutas implicadas en la síntesis de las auxinas. La ruta iniciada por TAA1 parte directamente del triptófano, produciendo IPA. La ruta establecida por los genes YUC modifica un derivado del triptófano para producir IAOx, un intermediario clave en la ruta de síntesis. Sobre el IAOx actúa SUR2, un enzima que inicia la ruta de síntesis de los glucosinolatos indólicos. NIT2 cataliza uno de los últimos pasos de síntesis transformando IAN en IAA. Las líneas sólidas indican pasos demostrados mientras que las líneas discontinuas indican pasos propuestos de los que se dispone de escasa información. Adaptado de (Zhao, 2010)

En el mutante *ful*, mientras que los niveles de *YUC3* no varían, los niveles de *YUC6* son muy bajos. En la línea FUL:VP16 los niveles de expresión de ambos genes son bajos. Por su parte los niveles de *TAA1* están elevados en el mutante *ful*, mientras que en FUL:VP16 están reprimidos. Por otro lado *UGT74E2* esta reprimida tanto en el mutante *ful* como en la línea FUL:VP16. En general, estos cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis de auxinas podría traducirse en niveles bajos de la hormona tanto en *ful* como en FUL:VP16.

Las respuestas a auxinas del mutante *ful* y de la línea FUL:VP16 fueron similares, predominando la inducción (Fig. 3-24), lo que contradictoriamente, parecería indicar niveles altos de ésta hormona en los frutos de éstas plantas. La respuesta entre ambas líneas sólo diferían en 6 genes, de los cuales 4 podrían ser dianas directas de FUL, *At3g03820*, *AIR3* y *MYB94*, que presentaban un patrón de expresión compatible con una posible competición por diana entre FUL y FUL:VP16, y *At1g60450*, compatible con una posible regulación redundante por FUL. Los dos genes regulados indirectamente fueron, *ARF4* que estaba inducido en el mutante *ful* y reprimido en la línea FUL:VP16, y *At5g18080*, que aparecía reprimido en el mutante *ful* y no cambiaba en FUL:VP16.

Una posible explicación a esta aparente contradicción podría ser que la síntesis de auxinas estuviera reprimida debido a la acumulación de la propia hormona en los sitios de síntesis (Ljung et al., 2005). La acumulación de auxinas puede generarse de diversas formas, bien por una síntesis activa de la hormona, bien por la acción del transporte activo de esta hormona

(Cheng et al., 2006; Heisler et al., 2005). Como la síntesis parecía no ser la responsable de esta respuesta decidimos investigar si entre los genes significativos obtenidos existía algún transportador de auxinas. Entre los 886 genes seleccionados inicialmente se encontraba *PIN7* (Friml et al., 2003). Los niveles de expresión de este gen en el mutante *ful* eran inferiores a los del silvestre (-1,20), mientras que en la línea FUL:VP16 eran superiores (0,48). Este patrón de expresión era compatible con una posible regulación directa positiva por FUL. Estos datos sugerían que *PIN7* podría estar activado por FUL, y que la disminución observada en su expresión en el mutante *ful* podría explicar una distribución diferente de las auxinas. La alteración del transporte de las auxinas podría generar la acumulación ectópica esta hormona en algunos tejidos del fruto, y en consecuencia, una respuesta alterada a la hormona así como la alteración de la actividad de síntesis (Ljung et al., 2005).

FUL controla el flujo de auxinas durante el desarrollo del fruto.

La desregulación de *PIN7* podría explicar tanto la alteración de la respuesta a auxinas como los cambios en la síntesis de las mismas auxinas observadas en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16.

En el momento de realizar ésta tesis apenas existían referencias sobre el patrón de expresión de *PIN7* en la parte aérea de *Arabidopsis* y mucho menos de su expresión en fruto. Por este motivo decidimos analizar detalladamente la expresión de este transportador de auxinas en los frutos de plantas silvestres, *ful* y FUL:VP16. Se utilizó una línea delatora *PIN7::GUS*, donde el promotor de *PIN7* estaba fusionado al gen delator GUS.

En los frutos silvestres, *PIN7* se expresaba fuertemente en la zona del estilo y en el tejido marginal durante todo el desarrollo del gineceo (Fig. 3-26 A). En un fondo genético *ful*, la expresión de esta línea delatora disminuía considerablemente, hasta hacerse casi imperceptible en el momento de la antesis (Fig. 3-26 B). Por otro lado, en la línea FUL:VP16 la expresión de este gen delator se volvía ectópica, llegando a expresarse a niveles elevados en las valvas de los frutos FUL:VP16 (Fig. 3-26 C).

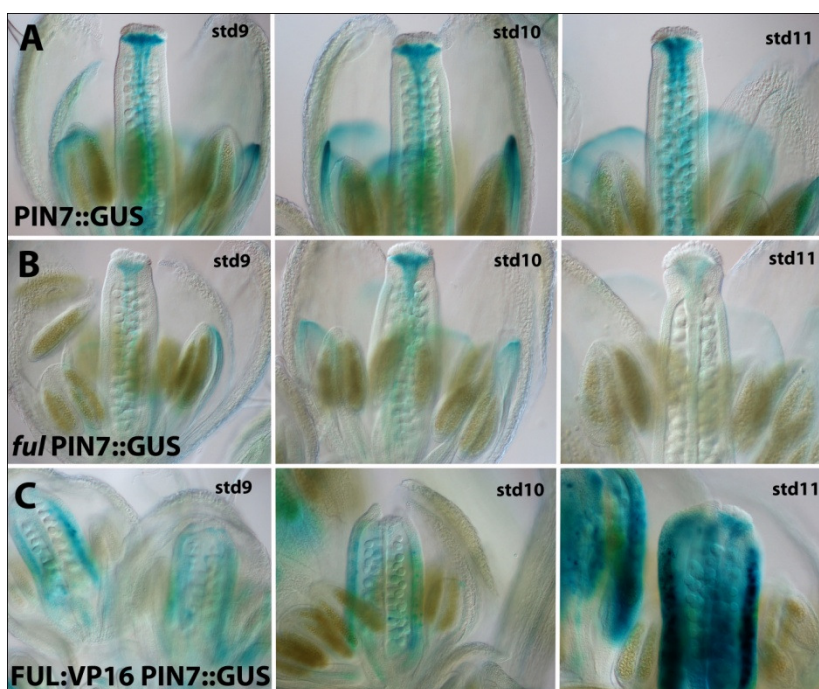


Figura 3-26: Expresión de *PIN7*. La expresión de *PIN7* en frutos silvestres se detectó en la zona del estilo y los tejidos mediales del replum. En frutos *ful*, la expresión de *PIN7* era mucho más débil, llegando a desaparecer durante el estadio 11 de desarrollo del gineceo. En frutos FUL:VP16 la expresión de *PIN7* se detectó ectópicamente por toda la valva.

Estos resultados confirmaban los observados en las micromatrices, donde la expresión de *PIN7* en la línea *ful* era mucho menor que en el silvestre, mientras que en la línea FUL:VP16 era mayor.

El transporte de las auxinas depende de la localización subcelular de las proteínas PIN, por lo que decidimos averiguar donde se ubicaba PIN7 y como contribuía a la distribución de las auxinas durante el desarrollo del fruto. Para este propósito se utilizó una línea delatora PIN7::GFP, donde la proteína GFP estaba fusionada a la región promotora y genómica de *PIN7* (Fig. 3-27).

En esta línea la expresión se detectó en los mismos tejidos que con la línea fusionada a GUS, en la región del estilo y en la zona de los tejidos marginales (Fig. 3-27 A). Mediante este análisis pudimos establecer que la proteína se situaba en la zona basal de las células, y que por lo tanto, estaría dirigiendo el flujo de auxinas de forma basipétala. En el mutante *ful*, apenas se detectó la expresión en el estilo, y fue imposible localizarla en la zona de los tejidos marginales (Fig. 3-27 B).

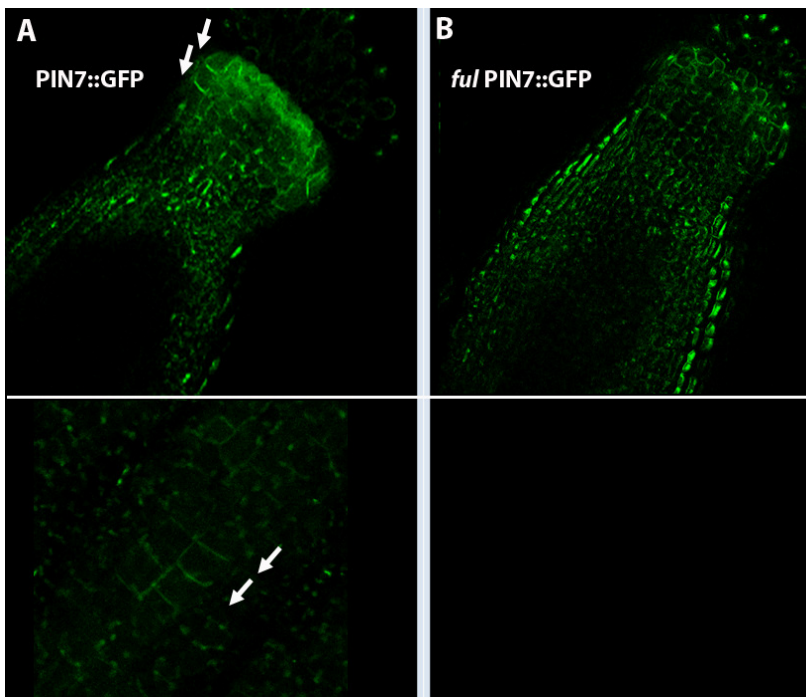


Figura 3-27: Localización de PIN7. En las plantas silvestres (A) la proteína PIN7 se localizó en la región del estilo (arriba) y en los tejidos marginales del replum (bajo). La proteína siempre se situaba en la region basal de las células, dirigiendo el flujo de auxinas en dirección basipétala (flechas). En el mutante *ful* (B) apenas se detectó expresión de la proteína PIN7. La señal verde detectada en las valvas de los frutos, corresponde a señal inespecífica provocada por fenómenos de reflexión sobre la cutícula de las células y a la auto fluorescencia de la clorofila.

Puesto que PIN7 actuaba dirigiendo el flujo de auxinas de forma basipétala, unas de las consecuencias de su ausencia en el mutante *ful* podría ser que las auxinas se acumularan en zona apical del fruto. Para comprobar si esto era cierto decidimos observar que ocurría con la localización de las auxinas. Para ello utilizamos una línea DR5::GUS, que indica de forma indirecta los lugares donde se acumulan las auxinas. La línea DR5::GUS de la que disponíamos presentaba muy baja sensibilidad a las auxinas, por lo que en frutos silvestres no se detectaban los máximos característicos de la zona apical. Al comparar la expresión de este marcador entre una línea silvestre (Fig. 3-28 A) y el mutante *ful* (Fig. 3-28 B) se observó que las auxinas se acumulaban en la zona apical del fruto en el mutante *ful*, pero principalmente durante el desarrollo del gineceo. En estadios posteriores se localizaron pequeños puntos de acumulación de auxinas en las valvas, así como en la zona adaxial de la valva.

Estos resultados indicaban que un FUL podía participar en el control de la distribución de las auxinas durante el desarrollo del fruto, y que parte de los fenotipos observados en el mutante podrían deberse a alteraciones en los niveles locales de esta hormona.

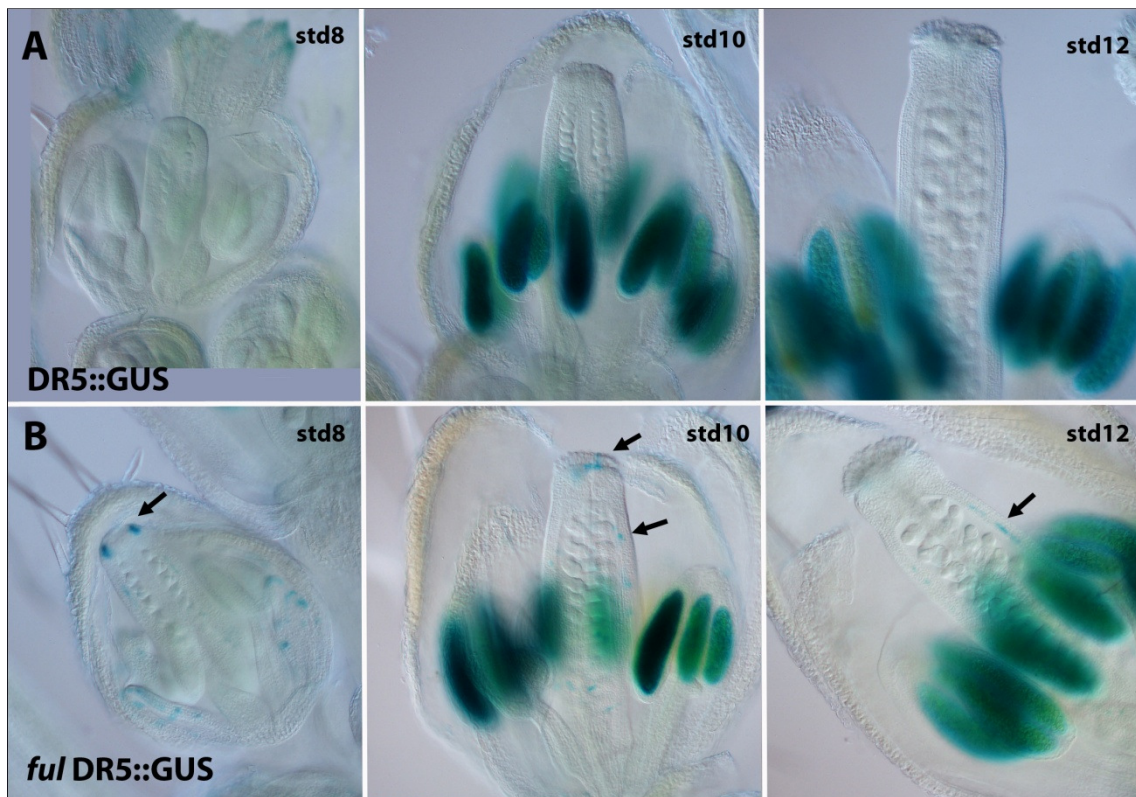


Figura 3-28: Localización de auxinas. Nuestra línea DR5::GUS presentaba niveles bajos de expresión, no detectándose expresión en el gineceo durante todo el desarrollo del carpelo (A). La misma línea delatora en fondo *ful* (B), señalaba la acumulación de auxinas en la parte apical del fruto (flecha en la derecha) desde el inicio del desarrollo del gineceo. Posteriormente la señal también se detectó en pequeños parches en las valvas (flechas centro) y posteriormente en la zona abaxial de las valvas (flecha izquierda).

Discusión

FUL es un factor de transcripción dual

La diferencia de fenotipos existentes entre el mutante *ful* y la línea FUL:VP16 indica que FUL no debe presentar un único mecanismo de acción. Los datos moleculares disponibles acerca de la actividad reguladora de FUL también sugieren que este factor de transcripción se comporta tanto como un represor (Ferrándiz et al., 2000b) como un activador de la transcripción (Ferrándiz et al., 2000a). Los resultados obtenidos en este capítulo de tesis sugieren que FUL se comporta mayoritariamente como un represor durante el desarrollo del fruto, pero que a la vez, también puede comportarse como un activador de la transcripción. Este tipo de comportamiento dual se ha observado en otros factores de transcripción, entre los que se encuentran también algunos factores de transcripción que pertenecen a la familia MADS (Kaufmann et al., 2009; Kaufmann et al., 2010).

A nivel global, los cambios provocados en la expresión génica por el mutante *ful* y la línea FUL:VP16 son similares (68% de los genes presentan un comportamiento idéntico), pero las diferencias encontradas a nivel fenotípico entre ambas líneas son considerables. Estas diferencias podrían explicarse mediante variaciones en muy pocos genes. Tras clasificar los genes significativos obtenidos entre posibles dianas directas e indirectas, se identificaron 37 posibles dianas directas de FUL que presentaban un patrón de expresión opuesto entre el mutante y la línea FUL:VP16. El análisis detallado de estos genes podría poner de manifiesto cuáles de ellos serían los responsables de las diferencias observadas entre el mutante *ful* y la línea FUL:VP16, así como desvelar nuevos genes implicados en el desarrollo del fruto en Arabidopsis.

FUL regula de forma diferente a los genes de identidad de margen de valva

Se ha descrito que FUL reprime la expresión de los genes de identidad de margen de valva, y que gran parte de los fenotipos asociados a *ful* se deben a la expresión ectópica de estos genes en las valvas de los frutos *ful*, como los genes *SHP* e *IND* (Ferrándiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2000; Liljegren et al., 2004). Gracias a la línea FUL:VP16 hemos podido establecer que FUL regula a estos genes de forma diferente. FUL podría regular de forma directa la expresión de *SHP*, mientras que regularía de forma indirecta la expresión de *IND* (Fig. 3-29).

IND se expresa ectópicamente en las valvas del mutante *ful* (Ferrándiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2004), incluso en ausencia de los genes *SHP* que median su activación (Liljegren et al., 2000), indicando que FUL reprimiría su expresión. El hecho que *IND* no se exprese ectópicamente en las valvas de los frutos FUL:VP16, a pesar que los genes *SHP* si lo hagan, sugiere una regulación indirecta de este gen independiente del efecto de los genes *SHP*. Nuestros datos indican que FUL limita la expresión de *IND* de forma indirecta, posiblemente a través de la activación de algún gen que reprimiría la expresión de *IND* en la valva (Fig. 3-29).

En nuestro laboratorio hemos tenido acceso a los datos preliminares de un experimento de CHIP-seq, realizado por el laboratorio de Gerco Angenent, a partir de muestras de inflorescencia entera. Apoyando la idea de que FUL regula de forma diferente a los genes *SHP* e *IND*, entre los promotores a los que se une FUL se encontró uno de los genes *SHP*, *SHP2*, pero no se encontró a *IND*.

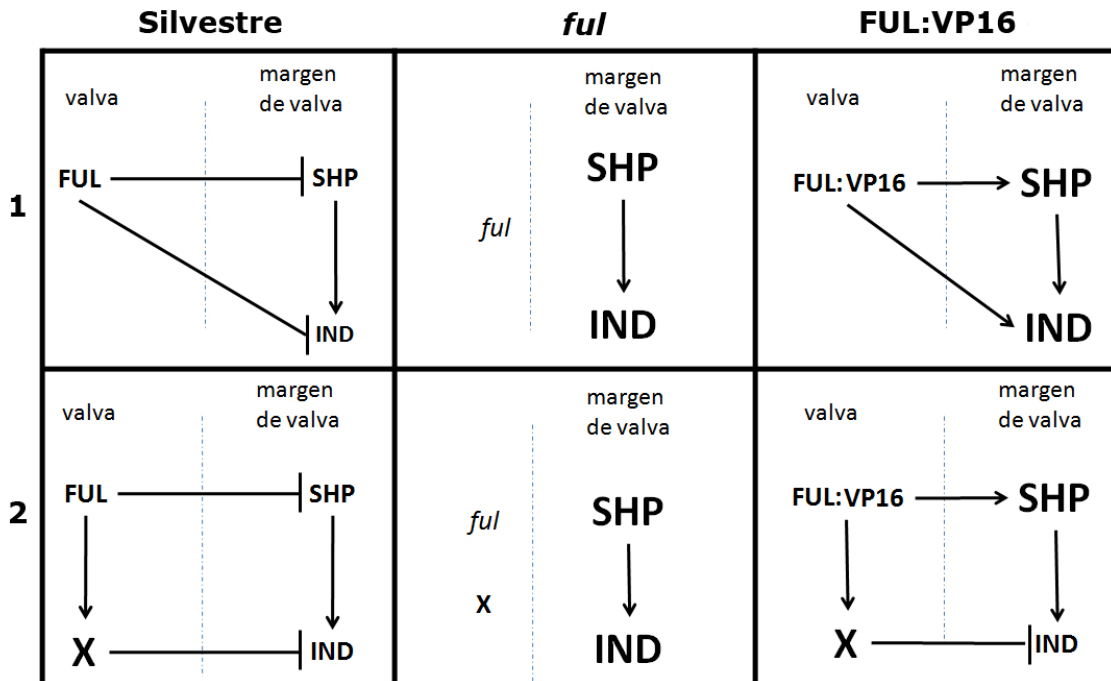


Figura 3-29: FUL restringe la expresión de SHP e IND de forma diferente. Los modelos explican la relación existente entre FUL, SHP y IND, bien considerando que FUL actúa directamente sobre SHP e IND (opción 1) o bien considerando una regulación directa sobre SHP e indirecta sobre IND (opción 2), así como los efectos esperados en plantas silvestres (izquierda), *ful* (centro) y FUL:VP16 (derecha). FUL reprime directamente la expresión de SHP, restringiendo su expresión a la zona del margen de valva. Por otro lado FUL reprime la expresión de IND de forma indirecta. El uso de la línea FUL:VP16 permite establecer un posible mecanismo de regulación de estos genes que explica los resultados del análisis de expresión realizado. La opción 2 explica los resultados obtenidos en nuestro análisis.

Procesos afectados durante el desarrollo del fruto en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16.

Pared celular

Tanto los frutos del mutante *ful* como los de la línea FUL:VP16 son mucho más cortos que los frutos de las plantas silvestres. Al examinar de cerca los frutos del mutante *ful* se observa que las células de la valva son mucho más pequeñas que las de las plantas silvestres, por lo que una explicación de por qué los frutos *ful* son más cortos podría ser por la falta de elongación en sus células.

Nuestro análisis transcriptómico nos ha permitido identificar un listado de genes implicados en la modificación y mantenimiento de la pared celular que presentan alterada su expresión en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16. Puesto que existe una clara relación entre las propiedades de la pared celular y la elongación, podríamos pensar que la alteración en la expresión de estos genes sería la responsable de la falta de elongación de los frutos *ful* y FUL:VP16. Analizando los genes alterados en este grupo en los frutos *ful* tendríamos células con una composición de pared celular alterada, posiblemente por una menor síntesis de celulosa y la alteración del metabolismo de sus componentes (Fig. 3-14 A) (Gantulga et al., 2008; Hamann et al., 2004; Xu et al., 2004). Estos frutos también presentarían una capacidad de elongación reducida debido a la represión de diferentes expansinas (Fig. 3-14 B) (Kende et al., 2004), que participan y median en la elongación celular (Cosgrove, 2000a; Cosgrove, 2005; Cosgrove, 2000b), y a la

alteración del metabolismo de la pectina (las pectinas unen entre sí las diferentes hebras de glicanos que constituyen la pared celular) (Fig. 3-14 C) (Arsovski et al., 2009; Louvet et al., 2006). Estas modificaciones explicarían la escasa elongación de las células de los frutos *ful*. Al analizar los genes alterados en este grupo en los frutos FUL:VP16 observamos que la respuesta general es muy similar a la de los frutos *ful*, pero las células de la valva de los frutos FUL:VP16 difieren en gran medida de las del mutante *ful*, siendo más parecidas a las de los frutos silvestres. De los genes que presentan un cambio de patrón de expresión entre ambos alelos destacan *CSLE1* y *EXPA5*, que podrían estar activados por FUL. Estos genes favorecen el crecimiento y la elongación celular (Hamann et al., 2004; Park et al., 2010), por lo que su ausencia podrían ser la responsable de los fenotipos observados en las células de la valva de *ful*, y a su vez ser los responsables de la diferente elongación celular observada en la línea FUL:VP16.

Por otro lado, el fenotipo de las células de la valva del mutante *ful* se ha atribuido a la expresión ectópica de los genes de identidad del margen de valva, y especialmente a la expresión ectópica de *IND* (Ferrándiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2004). De acuerdo con estos datos, algunos de los genes identificados del metabolismo de pectina, las pectin liasas *At5g63180*, *At1g67750*, *At2g24230* y *At5g2681*, están relacionados con la separación celular, proceso que ocurre en los tejidos del margen de valva. En frutos silvestres la expresión de estos genes se detecta únicamente en la zona de dehiscencia del fruto (Sun y van Nocker, 2010), por lo que el incremento en la expresión de estos genes en el mutante *ful* podría deberse a la expresión ectópica de *SHP* y *IND*, que provocan la adquisición de identidad de margen de valva en la valva (Ferrándiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2004) y la subsecuente activación de las pectin liasas. En los frutos FUL:VP16, donde *IND* no se expresa ectópicamente, la expresión de tres de estos genes disminuye respecto al silvestre (*At1g67750* y *At2g24230*) o no varía (*At5g63180*), indicando que la regulación de estos genes podría ser dependiente de *IND*.

Nuestros resultados respaldan la hipótesis de que las células de la valva del mutante *ful* adquieren identidad de células del margen de valva al detectarse fuertes incrementos de la expresión de genes característicos de este tejido. Por otro lado, nuestros resultados también indican que FUL podría participar activamente en el proceso de crecimiento y elongación del fruto, no sólo impidiendo la expresión de los genes de identidad de margen de valva, sino también activando la expresión de genes importantes en los procesos de expansión celular como la *EXPA5*.

Hormonas

Nuestros resultados también muestran que gran parte de las diferencias encontradas entre el mutante *ful* y la línea FUL:VP16 respecto a las plantas silvestres se centra en la respuesta a estímulos, y en concreto en la respuesta a hormonas.

El análisis de los genes incluidos en estas categorías resulta complicado partiendo únicamente de los datos obtenidos a partir de las micromatrices, debido principalmente, a la existencia de respuestas cruzadas entre diferentes hormonas, y a que en muchas ocasiones las bases de datos utilizadas para realizar estos análisis incluyen gran cantidad de datos no testados biológicamente, y no incluyen otros relevantes debido a problemas de actualización. Por éste

motivo, en la discusión de este apartado nos centraremos tan sólo en aquellas hormonas sobre las que dispongamos de información adicional a las micromatrices, o de las que el análisis de categorías funcionales sugiera fuertemente una relación con la actividad de FUL, basándonos principalmente en las posibles alteraciones de los niveles que éstas pudieran presentar en nuestros alelos.

Auxinas:

Nuestros resultados muestran que una parte importante de los fenotipos del mutante *ful* podrían estar relacionados con la acción de las auxinas. El mutante *ful* podría considerarse, en cierto modo, similar a mutantes que presentan defectos en la respuesta a auxinas, como el mutante *ett*, o a frutos tratados con inhibidores del transporte polar de auxinas como el NPA (Fig. 3-30 B) (Sessions y Zambryski, 1995; Staldal et al., 2008). Los frutos *ett* o los frutos tratados con NPA (Fig. 3-30 A) son más cortos que los frutos silvestres al presentar un desarrollo de la zona del ovario limitado, a la vez que desarrollan un ginóforo más alargado y más tejido apical. En el caso de *ful*, la zona apical presenta una marcada elongación del estilo, se alarga ligeramente la zona del ginóforo y se desarrollan valvas cortas (Fig. 3-30 C), por lo que podría existir alguna relación entre las auxinas y el fenotipo del mutante. Por su parte, el fenotipo de los frutos de la línea FUL:VP16 es similar al observado en frutos tratados con auxinas (Fig. 3-30 D y E) (Staldal et al., 2008), que al igual que los frutos FUL:VP16, muestran un ensanchamiento de la región apical de las valvas adquiriendo aspecto triangular o acorazonado.

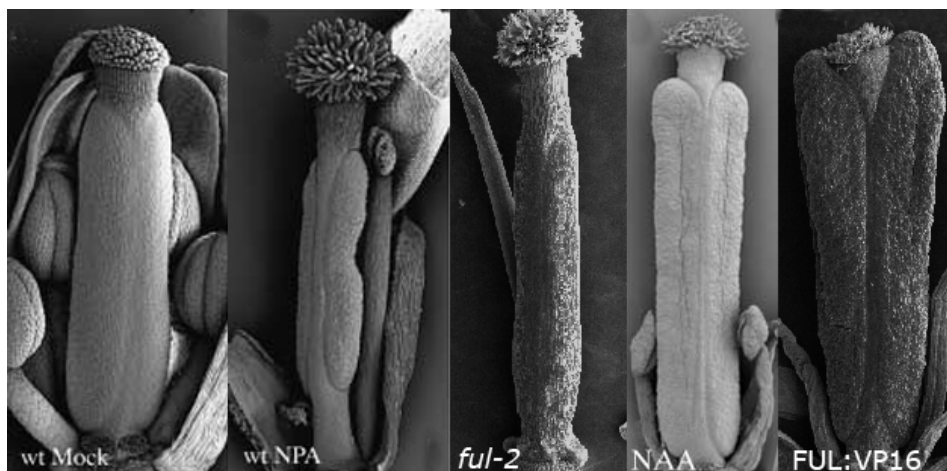


Figura 3-30: Morfología del fruto silvestre sin tratamiento (A), tratado con el inhibidor del transporte de auxinas NPA (B) y tratados con la auxina NAA (D), así como la morfología de los frutos *ful* (C) y FUL:VP16 (E) sin tratamiento.

FUL podría participar en el establecimiento del gradiente de auxinas que controla el desarrollo del gineceo a través de la regulación de PIN7

El transportador de auxinas PIN7 se identificó entre los genes diferencialmente expresados en el análisis transcriptómico realizado en este capítulo de tesis, como un posible gen regulado positivamente por FUL de forma directa. El análisis de su expresión en las plantas silvestres, el mutante *ful* y la línea FUL:VP16, confirmó los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico. La expresión y localización de este transportador se había descrito previamente en raíz, pero no se disponía de ninguna información sobre su mecanismo de acción en otros tejidos (Feraru y Friml, 2008; Vieten et al., 2005). El análisis de expresión, junto con un estudio de la localización de la proteína nos permitió establecer que PIN7 se expresaba

en el gineceo, desde estadios tempranos del desarrollo de gineceo, en la región apical y en los tejidos marginales de los repla, donde se mantenía hasta después de la polinización. La proteína PIN7 se localizó siempre en la zona basal de las células, dirigiendo el flujo de auxinas en dirección basipétala, es decir de la región apical de síntesis (estilo) hacia la región basal (ginóforo). En el mutante *ful* se produce una disminución de la expresión de este gen, que a su vez provoca la acumulación de auxinas en la región apical del mutante. Este efecto sería similar al provocado por la aplicación de inhibidores del transporte de auxinas, que como hemos comentado, provocan defectos en el desarrollo del fruto que podrían mimetizar a los observados en el mutante *ful*. De este modo la ausencia de *PIN7* podría ser la responsable de parte de los fenotipos mostrados por *ful*. En un examen preliminar de un mutante *pin7* (Friml et al., 2003) (datos no mostrados) no se han apreciado defectos durante el desarrollo del fruto, sugiriendo que la ausencia de *PIN7* no explicaría por sí sola los fenotipos observados en *ful*, pero hay que tener en cuenta que los genes *PIN* presentan un alto grado de redundancia, de modo que la ausencia de alguno de ellos es suplida por otros (Vieten et al., 2005). De este modo, el fuerte fenotipo observado en *ful*, podría explicarse si *FUL* estuviera regulando a la vez a otros genes *PIN*. De acuerdo con este razonamiento, en los resultados del CHIP-seq del laboratorio de G. Angenent se encontró que *FUL* se unía al promotor de *PIN4*, sugiriendo un papel de *FUL* en el control de la distribución y transporte de las auxinas durante diferentes etapas del desarrollo de *Arabidopsis*. Sería interesante analizar la expresión de los diferentes transportadores *PIN* en el mutante *ful* y la línea *FUL:VP16*, así como observar los resultados de las combinaciones genéticas de los diferentes mutantes existentes de estos transportadores con los alelos de *FUL*.

Además de la posible regulación directa de los transportadores *PIN* por *FUL*, podría existir también otro tipo de regulación indirecta del transporte polar de auxinas dependiente de *FUL*. En el mutante *ful*, *IND* se expresa ectópicamente en toda la valva (Ferrándiz et al., 2000b; Liljegren et al., 2004). *IND* es el responsable de generar un mínimo de auxinas en la zona del margen de valva a través de la despolarización y desestabilización de las proteínas *PIN* (Sorefan et al., 2009), por lo que en los mutantes *ful*, la presencia de estas proteínas podría estar comprometida. *FUL* e *IND* actúan de forma opuesta: *FUL* actuaría regulando positivamente la expresión de algunos transportadores *PIN*, mientras que *IND* actuaría desestabilizando las proteínas. La acción conjunta de ambos genes controlaría la distribución de las auxinas durante el desarrollo del fruto, y concretamente el correcto establecimiento de la región del margen de valva (Fig3-31).

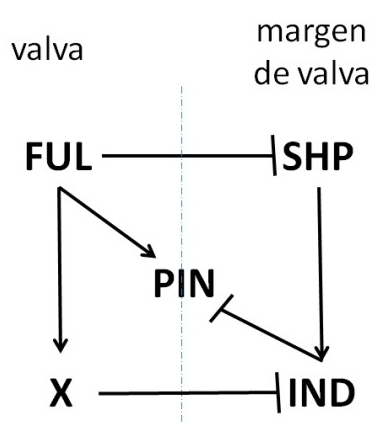


Figura 3-31: *FUL* e *IND* regulan los niveles de *PIN*. *FUL*, además de restringir la expresión de los genes de identidad de margen de valva *SHP* e *IND*, podría comportarse como un regulador de los transportadores de auxina tipo *PIN*, activando su expresión. Por su parte, *IND* estaría provocando lo contrario al deslocalizar y desestabilizar las proteínas *PIN*. La acción conjunta de ambos genes participaría en el correcto establecimiento de la zona del margen de valva.

El cambio observado sobre el patrón de acumulación de las auxinas en el mutante *ful* podría estar relacionado con la regulación de su síntesis. Entre los genes relacionados con la síntesis de auxinas identificados en el análisis de categorías funcionales, se encuentran tres que están directamente implicados en la síntesis de esta hormona, *YUC3*, *YUC6* y *TAA1*, que afectan a la síntesis de auxina a través de dos rutas supuestamente independientes (Cheng et al., 2006; Cheng et al., 2007; Kim et al., 2011; Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008). Aparentemente, la regulación de los genes de síntesis de auxinas por *FUL* parece ser indirecta, mientras sí que parece existir una regulación directa de los genes que regulan su distribución. Para explicar la variación en la expresión de los genes de síntesis hemos planteado la hipótesis de que la acumulación de auxinas podría estar afectando la regulación de la síntesis de la propia hormona. Este tipo de retroalimentación negativa se ha descrito para otras hormonas vegetales, como por ejemplo las giberelinas (Fleet y Sun, 2005; Hedden y Phillips, 2000) o las citoquininas (Miyawaki et al., 2004; Werner et al., 2006), que a través de diferentes mecanismos controlan sus niveles. En el caso de las auxinas existen también algunas evidencias que indican que este tipo de mecanismo también pueda existir (Ljung et al., 2005), aunque no se conoce exactamente como ocurre.

En el mutante *ful*, *YUC6* está reprimido mientras que *TAA1* está sobreexpresado. Los patrones de expresión de estos genes difieren notablemente. Se ha descrito que *YUC6* se expresa principalmente en estambres, pero contribuye a la síntesis de auxina en el gineceo junto a *YUC2* y *YUC4*, que se expresan principalmente en la región apical de éste (Cheng et al., 2006). Según nuestros resultados es en esa región donde se acumulan las auxinas inicialmente en el mutante *ful*, lo cual podría estar provocando una inhibición de la expresión de este gen (Ljung et al., 2005). Por su parte, *TAA1* se expresa principalmente en los tejidos marginales mediales, justo en la zona que dará lugar al replum y la placenta (Nole-Wilson et al., 2010; Stepanova et al., 2008). El hecho de que *ful* genere un replum mucho más grande que el desarrollado en los frutos silvestres podría estar relacionado con el incremento de expresión de este gen. En los frutos *FUL:VP16*, que generan un replum aparentemente normal, los niveles de expresión de este gen son inferiores a los de los frutos silvestres. En estos frutos los niveles de expresión de *YUC6* y *YUC3* también están bajos. El fenotipo de estos frutos, que recuerda al de frutos tratados con auxinas, sugiere la existencia de niveles altos de auxinas en la parte superior de las valvas. La alteración en la expresión de *PIN7* en la línea *FUL:VP16*, podría generar este fenotipo. La expresión ectópica de *PIN7* en toda la valva podría provocar la acumulación de las auxinas en estos tejidos aunque para verificar esta hipótesis sería necesario caracterizar la localización de *PIN7* y la acumulación de auxinas también en estos frutos.

Debido a las características de la línea *DR5::GUS* empleada, estos resultados tendrían que ser verificados mediante el uso de herramientas más sensibles para la detección de las auxinas, como podría ser una línea *DR5::GFP* (Friml et al., 2003).

En resumen, los resultados obtenidos ponen de manifiesto un papel regulador de *FUL* en el transporte y distribución de las auxinas durante el establecimiento del gineceo y desarrollo del fruto, posiblemente, a través de la regulación de algunos transportadores tipo *PIN*.

Giberelinas:

Las giberelinas, al igual que las auxinas, son claves en el desarrollo del fruto. En el análisis de categorías funcionales relacionadas con la síntesis o respuesta a esta hormona apenas se obtuvieron enriquecimientos en genes significativos, pero aún así, es interesante notar que 4 factores de transcripción bHLH del grupo PIF like, aparecían como diferenciales en nuestros análisis, así como un gen implicado en la regulación de los niveles de esta hormona.

Trabajos recientes han establecido que la respuesta a giberelinas está mediada, en parte, por estos factores de transcripción tipo PIF-like (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). De los 4 genes identificados, tan sólo *SPT* ha sido relacionado con el desarrollo del gineceo y del fruto (Alvarez y Smyth, 1999; Heisler et al., 2001), mientras que el resto, *PIL1*, *PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5* participan en la regulación de procesos de desarrollo relacionados con la percepción de la luz (Alabadi et al., 2008; Castillon et al., 2007; Toledo-Ortiz et al., 2003) y no existen indicios de su relación con el desarrollo del gineceo en Arabidopsis. Estos 4 genes están incluidos en el grupo de posibles dianas directas de FUL, pero en el caso de *PIL1* y *SPT* estarían reprimidas por FUL, mientras que *PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5* estarían activadas. Estos 4 genes PIF-like, presentan características diferentes en su modo de acción: Mientras que las proteínas *PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5* se ha mostrado que interactúan físicamente con el fitocromo B (Khanna et al., 2004), y a su vez estarían activados por FUL, *PIL1* y *SPT* no interactúan con este fitocromo (Khanna et al., 2004), y estarían reprimidos por FUL. La diferente regulación que ejerce FUL sobre estos genes, activando a un tipo de PIFs y reprimiendo al otro, podría indicar una posible modulación de la respuesta a giberelinas mediada por estos genes dependiente de FUL (Fig. 3-32).

El único gen significativo relacionado con la regulación de los niveles de giberelinas es la *GA2ox6*, que media en la inactivación de esta hormona (Rieu et al., 2008). La actividad de las giberelinas en la valva es clave para promover la elongación celular y el crecimiento del fruto, por lo que no sería descabellado pensar, en función del fenotipo mostrado por el mutante *ful*, que FUL pudiera participar en la generación de un ambiente de niveles altos de giberelinas, por ejemplo, reprimiendo la expresión de genes que inactivan esta hormona. Nuestros resultados podrían explicarse si FUL estuviera reprimiendo directamente la expresión de *GA2ox6*, aunque lo haría de forma redundante con otros factores, ya que sus niveles de expresión no varían en el mutante *ful* y sí aumentan en la línea FUL:VP16. Por otro lado el incremento en la expresión de *GA2ox6* en los frutos FUL:VP16 podría ser consecuencia de la mayor inducción observada en los genes *PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5*, que además de mediar algunas respuestas a las giberelinas, participan en la homeostasis de la hormona (Oh et al., 2007; Ozga et al., 2009).

Como hemos comentado, de los genes tipo PIF identificados, tan sólo se ha descrito un papel regulador durante el desarrollo del carpelo para *SPT*. *SPT* tiene un papel evidente durante el desarrollo de los tejidos marginales (Alvarez y Smyth, 1999; Heisler et al., 2001), y se ha relacionado con la percepción o señalización de la hormona auxina (Nemhauser et al., 2000). Nuestros datos indican que *SPT* puede ser reprimido de forma directa por FUL, aunque recientemente se ha descrito que también podría estar regulado directamente por IND, que actuaría activándolo (Groszmann et al., 2010). La relación antagonista entre FUL e IND podría explicar entonces el incremento de la expresión de *SPT* en los frutos *ful*. Puesto que la

expresión ectópica de *SPT* en las valvas de los frutos FUL:VP16 es independiente de la presencia de *IND*, podemos pensar que tanto *FUL* como *IND* regulan la expresión de *SPT*.

Además, *IND* genera en la zona del margen de valva un entorno adecuado para la actividad de *SPT*. *IND* activa la expresión de genes implicados en la biosíntesis de las GAs, como la *GA3ox1* (Arnaud et al., 2010). La expresión de este gen en los dominios de expresión de *IND* genera un incremento de las giberelinas activas que dirige la degradación de las proteínas DELLA. Ya que las proteínas DELLA interactúan con *SPT* (Gallego-Bartolome et al., 2010) la degradación de las DELLA liberaría a *SPT* permitiendo su acción reguladora en este tejido (Fig. 3-32). Según nuestros datos, *FUL* restringiría la expresión de *SPT* en la valva, mientras que favorecería la expresión de otros genes PIF como *PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5*. De este modo, tanto la valva como el margen de valva serían capaces de responder a las giberelinas, pero podrían hacerlo de forma diferente. Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de *SPT* provoca una disminución de la expansión celular en tejido foliar (Ichihashi et al., 2010). *SPT* también se ha relacionado con el control del crecimiento en plántulas, limitándolo (Josse et al., 2011), mientras que *PIL5/PIF1* y otros PIF se ha asociado con la promoción del crecimiento celular (Alabadi y Blazquez, 2009). La regulación por *FUL* de este tipo de proteínas podría establecer las bases del crecimiento y elongación característicos de la valva, que presentan células grandes y alargadas, activando la expresión de *PIL5/PIF1* y *PIL6/PIF5*, y excluyendo la expresión de *SPT* y *PIL1* a la zona del margen de valva, que presentan células pequeñas y cortas (Fig. 2-32).

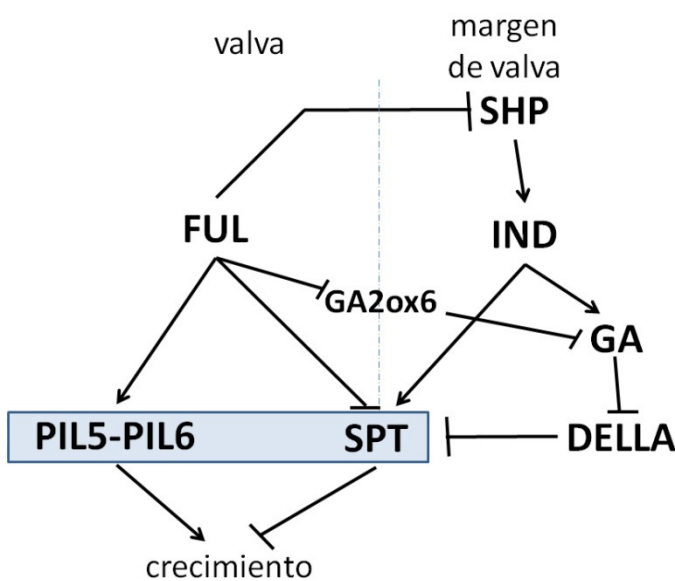


Figura 3-32: Regulación de los PIF. FUL actuaría reprimiendo la expresión de *SPT* en la valva, mientras favorecería la activación de *PIL5* y *PIL6*. Por otro lado, *IND* activaría la expresión de *SPT* en la zona del margen de valva, además de proporcionar un entorno rico en GAs. FUL también podría favorecer la presencia de GAs reprimiendo la degradación de esta hormona. La expresión diferencial de los genes PIF podría mediar los diferentes tipos de crecimiento celular observados durante el desarrollo del carpelo.

Etileno:

El etileno es una hormona clave en el desarrollo y correcta maduración de los denominados frutos climatéricos. Salvo un papel en la senescencia de los órganos florales asociada a la polinización del fruto (Butenko et al., 2006; van Doorn y Woltering, 2008), ninguna función relevante se ha asociado a esta hormona durante el desarrollo de los frutos en *Arabidopsis*, aunque existen evidencias de que en otras especies de brasicas el etileno estaría implicado en el desarrollo de la zona de dehiscencia (Child et al., 1998; Roberts et al., 2002), favoreciendo la expresión de diferentes poligalacturonasas implicadas en los procesos de separación celular

(Petersen et al., 1996). Recientemente se ha propuesto una función del etileno como promotor de la senescencia del pistilo en ausencia de polinización (Carbonell-Bejerano et al., 2011). Los óvulos no polinizados inician la producción de etileno que dirigiría la senescencia del pistilo, a través de la represión de la acción de las GA (Achard et al., 2003; Carbonell-Bejerano et al., 2011).

Los datos obtenidos de las micromatrices sugerían que los niveles de etileno en los frutos *ful* y FUL:VP16 debían ser elevados. Se ha descrito que el etileno puede interferir con el efecto de las giberelinas, estabilizando a las proteínas DELLA (Achard et al., 2007; Achard et al., 2003), por lo que los altos niveles de etileno podrían influir en los fenotipos de los frutos *ful* y FUL:VP16 limitando la elongación de las células de la valva al evitar la acción de las giberelinas.

Los tres genes implicados en la síntesis de etileno identificados podrían ser dianas de FUL. FUL podría estar reprimiendo la expresión de *ACS11* y *ACO*, y activar la expresión de *ACS6*. Los patrones de expresión de las *ACS11* y *ACS6* difieren considerablemente. *ACS6* se expresa en la región del estilo y la zona de dehiscencia basal del fruto, mientras que *ACS11* no se expresa durante el desarrollo del fruto (Tsuchisaka y Theologis, 2004; Tsuchisaka et al., 2009). FUL podría pues, controlar la síntesis de etileno en las valvas reprimiendo la expresión de *ACS11* y *ACO*, así como favorecer su producción en la zona del estilo activando a *ACS6*.

Otro posible mecanismo de regulación de la síntesis del etileno, aunque indirecto, podría estar relacionado con la alteración del flujo auxínico. La posible activación de la síntesis de etileno en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16 podría ser similar a la respuesta observada en ausencia de polinización (Carbonell-Bejerano et al., 2011). Se ha propuesto que tras la fecundación, las semillas se convierten en fuentes de auxinas (Dorcey et al., 2009). La generación de estos nuevos lugares de síntesis de auxinas redirige el flujo de la hormona hacia la valva donde promueven la acción de las giberelinas, estimulando la elongación. Las alteraciones descritas en el transporte polar de auxinas podrían influir en ésta comunicación semilla-valva, provocando respuestas similares a la ausencia de polinización, incrementándose la síntesis de etileno.

Nuestros resultados sugieren una posible interacción entre etileno y FUL, por lo que sería interesante analizar la expresión de los diferentes genes de síntesis de esta hormona en el mutante *ful* y la línea FUL:VP16, así como la dependencia de los fenotipos del mutante *ful* de la presencia de etileno, realizando combinaciones génicas con mutantes insensibles a etileno, o tratando estos frutos con inhibidores de la respuesta a etileno.

Ácido abscísico:

El ABA es una hormona implicada en numerosos procesos de adaptación a estrés, y un antagonista clásico de la acción de las GA, aunque no se le ha atribuido ninguna función durante el desarrollo del fruto.

Nuestros datos sugieren que la regulación de los niveles de esta hormona también podría estar influenciada por FUL ya que el gen *CYP707A3* se identificó como una posible diana de FUL. Este citocromo actúa mediando la hidrólisis del ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005; Okamoto et al., 2006; Umezawa et al., 2006), por lo tanto reduciendo sus niveles. Puesto que FUL actuaría

activando su expresión, podría, al igual que con el etileno, participar en la creación de un ambiente de niveles bajos de ABA, que permitiera la acción de las GA.

De acuerdo con un posible incremento de los niveles de ABA en el mutante *ful*, se detectó un enriquecimiento en genes que responden a esta hormona, donde prácticamente todos aparecían activados. Curiosamente, en la línea FUL:VP16, donde los niveles de ABA debían ser inferiores, también se observaba la activación de muchos de estos genes, por lo que tal vez los cambios en su expresión no se debieran exclusivamente al efecto del ABA. Muchos de los genes incluidos en los listados de respuesta a estímulo están presentes en diferentes listados específicos a la vez, debido a posibles respuestas cruzadas entre hormonas, o debido al estrés que supondrían los elevados niveles de etileno que podrían existir (Cheng et al., 2009b; Iwama et al., 2007; Linkies et al., 2009).

Nuestros resultados indican que FUL podría estar regulando el desarrollo del fruto al menos en parte a través de la regulación de los niveles hormonales y modulando la respuesta a estos. En general, podríamos pensar que FUL participa en la correcta distribución de las auxinas a la vez que modula la respuesta a giberelinas, además de mantener unas condiciones favorables al crecimiento limitando los niveles de ácido abscísico y etileno (Fig. 3-33).

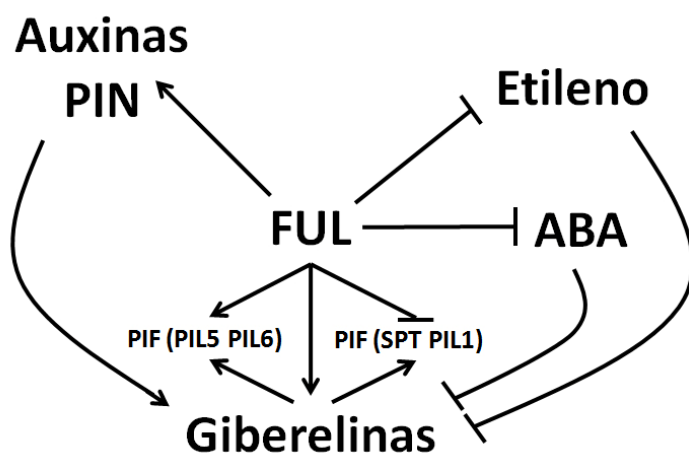


Figura 3-33: Relación de FUL con las diferentes hormonas que pueden participar durante el desarrollo del fruto. FUL participaría en establecer la correcta distribución de las auxinas, a la vez que controlaría el tipo de respuesta a giberelinas que tendría lugar en las valvas. Por otro lado, mantendría los niveles de etileno y ácido abscísico bajos, impidiendo que interfirieran con los procesos de crecimiento celular en la valva.

FUL podría participar en el establecimiento de los órganos florales reproductivos.

Entre los factores de transcripción identificados en el análisis transcriptómico realizado, se encontraron cuatro genes claves en el establecimiento de la identidad de los órganos reproductivos de la flor, *AP3*, *PI*, *AG* y *SEP4* (Irish, 2010). Durante el desarrollo floral, la acción combinada de *AP3*, *PI*, *AG* y *SEP* establecen la posición e identidad de los estambres, mientras que la combinación de *AG* y *SEP* establece la posición e identidad de los carpelos. Nuestro análisis indicaba que aunque la expresión de *SEP4* podría estar regulada indirectamente por FUL, la regulación de *AG*, *AP3* y *PI* podría ser directa. FUL actuaría participando en la activación de *AG*, mientras que actuaría reprimiendo la expresión de *AP3* y *PI*. De acuerdo con estos datos, en la línea FUL:VP16 se expresa ectópicamente *AP3* en las valvas, indicando una posible regulación de este gen por FUL. Aunque FUL podría estar reprimiendo tanto a *AP3* como a *PI*,

en el mutante *ful* sólo se observa desregulado el gen *PI*, por lo que la represión sobre ambos genes podría ser diferente. En la represión de *AP3* podrían participar más factores, por lo que la ausencia de *FUL* no provocaría cambios significativos en la expresión de *AP3*, mientras que el papel de *FUL* en la represión de *PI* podría ser más determinante.

Por otro lado, en los resultados del ChIP-seq del laboratorio de G. Angenent, se encontró que *FUL* se unía únicamente al promotor de *PI*, no detectándose unión de *FUL*, a los promotores de *AG* o *AP3*. De este modo, la activación de *AP3* en los frutos *FUL:VP16* podría ser consecuencia de la activación previa de *PI* ya que se ha demostrado que existe una activación mutua entre estos factores (Honma y Goto, 2000). La sobreexpresión conjunta de *PI* y *AP3* genera en ocasiones frutos que mimetizan la forma de los frutos *FUL:VP16* (Krizek y Meyerowitz, 1996) (Fig. 3-34), lo cual sugiere que la activación ectópica de estos genes podría ser relevante para producir la morfología característica de los frutos *FUL:VP16*.

El patrón de expresión de *AP3* y *PI* en el meristemo floral es complementario al de *FUL* (Gu et al., 1998; Irish, 2010). Mientras que *AG* se expresa en toda la zona central del meristemo floral (verticilos 3 y 4), *AP3* y *PI* se expresan en el dominio que comprende los verticilos 2 y 3, mientras que *FUL* se expresa exclusivamente en el cuarto verticilo. A nivel temporal *AP3* y *PI* inician su expresión durante el estadio de desarrollo floral 2, apareciendo en el centro del meristemo (Goto y Meyerowitz, 1994). En el estadio de desarrollo floral 3, *AP3* ya presenta una expresión delimitada a los verticilos 2 y 3, pero *PI* todavía se mantiene en el centro del meristemo floral (Goto y Meyerowitz, 1994). Justo en este estadio es cuando se inicia la expresión de *FUL* (Gu et al., 1998) que podría iniciar la represión de *PI* en el cuarto verticilo del meristemo floral. De acuerdo con sus patrones de expresión y con el posible mecanismo de acción deducido a partir de este trabajo, podríamos plantear la siguiente hipótesis: *FUL* podría estar reprimiendo la expresión de *PI*, e indirectamente y de forma redundante la de *AP3*, en la zona central del meristemo floral, a la vez que favorecer la expresión de *AG* (Fig. 3-34). De este modo *FUL* colaboraría en el correcto establecimiento de las zonas donde se generaran los diferentes órganos reproductivos.

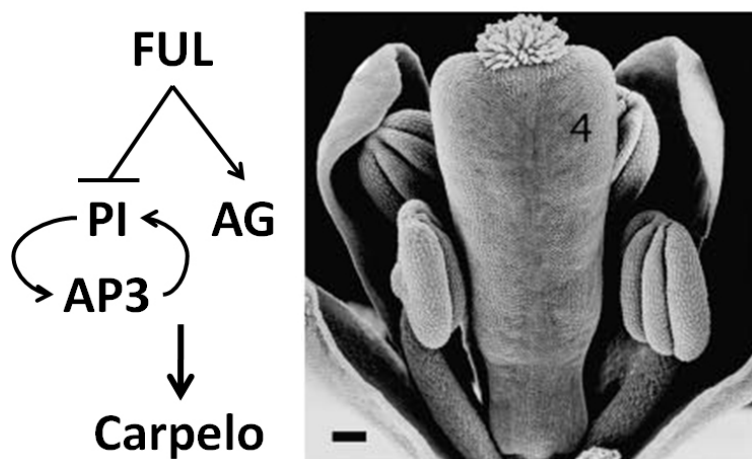


Fig. 3-34: *FUL* podría regular la expresión de los genes de clase B y C que dirigen el desarrollo de los órganos florales reproductivos. A la izquierda se muestra un modelo que explica el mecanismo de acción de *FUL* sobre estos genes: *FUL* reprime la expresión de *PI*, y posiblemente también la de *AP3*, en la zona central del meristemo floral, donde a su vez podría favorecer la expresión de *AG*. A la derecha se muestra una imagen de SEM de un gineceo *35S::AP3 35S::PI pi/+*

(tomada y adaptada de Krizek y Meyerowitz, 1996) que recuerda a los frutos *FUL:VP16*, donde ambos *AP3* y *PI* están sobreexpresados.

Unos resultados que apoyarían esta hipótesis se obtuvieron al cruzar el mutante *superman*, con la línea *35S::FUL*. El mutante *sup* presenta defectos en el establecimiento de la frontera de

separación entre estambres y carpelos, detectándose la expresión de *AP3* y *PI* ectópicamente en el centro del meristemo floral, produciéndose un número extra de estambres a expensas de los carpelos (Bowman et al., 1992; Sakai et al., 1995). Al sobreexpresar *FUL* en este mutante se corrige parte de este fenotipo, reduciéndose el número de estambres producidos a la vez que se rescata parcialmente el desarrollo del carpelo (datos no mostrados), al igual que cuando se elimina la actividad de los genes de clase B (Sakai et al., 2000).

En resumen, nuestros resultados indican que *FUL* podría estar regulando diferentes etapas del desarrollo del fruto. En las etapas iniciales del desarrollo del gineceo podría participar en el correcto establecimiento de este órgano a través de la represión de los genes de clase B. Durante el establecimiento, cuajado y elongación del fruto, podría funcionar modulando las propiedades de las paredes celulares de la valva, así como la distribución y la respuesta a diferentes hormonas, como las auxinas, las giberelinas y el etileno. Por último, durante los últimos eventos de diferenciación del fruto, *FUL* podría participar en el establecimiento y diferenciación de los diferentes tejidos que componen el margen de valva.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

-La línea FUL:VP16 es una herramienta válida para la identificación de dianas moleculares del gen *FUL*.

-El factor de transcripción *FUL* presenta un comportamiento dual en la regulación de sus dianas actuando principalmente como un represor de transcripción, y en menor medida como un activador transcripcional.

-Durante el desarrollo del gineceo, *FUL* parece funcionar reprimiendo directamente la expresión de *SHP* en la valva y de forma indirecta la expresión de *IND*. En este proceso *FUL* también participa reprimiendo la expresión de *SPT* de forma independiente de *IND*.

-*FUL* participa en el desarrollo del fruto, al menos en parte, controlando los niveles y respuestas de diferentes hormonas:

-*FUL* participa en el control de la distribución de las auxinas durante el desarrollo del fruto regulando positivamente la expresión del transportador de auxinas *PIN7*. *PIN7* se expresa en la zona apical del fruto y en el tejido marginal del replum dirigiendo el flujo de auxinas en dirección basipétala. Asumiendo la existencia de un gradiente de auxinas iniciado en la región apical del fruto, *FUL* controlaría su correcto establecimiento a través de la regulación de los niveles de *PIN7*.

-*FUL* podría mediar una respuesta diferencial frente a la giberelinas en las valvas y la zona del margen de valva a través de la activación de *PIL5* y *PIL6* y la represión de *PIL1* y *SPT*.

-*FUL* también regularía los niveles de otras hormonas vegetales, como el etileno y el ácido abscísico. *FUL* actuaría reprimiendo la síntesis de etileno que media la senescencia del fruto en respuesta a esterilidad, y activando la degradación del ácido abscísico. Ambas acciones permitirían la elongación del fruto.

-Por último, *FUL* también participa en la represión directa del gen homeótico de tipo B *PI* implicado en el establecimiento de la identidad de los estambres, impidiendo que se exprese durante el desarrollo del gineceo y posteriormente durante el desarrollo del fruto de *Arabidopsis*.

Discusión general

Discusión general

Mecanismo de acción de FUL

Este trabajo de tesis ha identificado a FUL como un regulador dual implicado en diferentes procesos de desarrollo a lo largo de la vida de *Arabidopsis*. Nuestro trabajo aporta nueva información sobre su función en procesos en los cuales estaba demostrada su participación, como la promoción de la transición floral y el desarrollo del fruto, a la vez que identifica nuevas funciones de este factor de transcripción, como su papel en el control de la función meristemática. Además, se han obtenido indicios que sugieren otras funciones de FUL, como por ejemplo en la regulación del flujo de auxinas, o en el establecimiento de las diferentes identidades o dominios que tienen lugar durante el desarrollo floral.

Al comparar la secuencia de FUL con otros factores de transcripción no se observa en el ningún dominio con similitud a otros dominios descritos que confieran actividad transcripcional, como dominios EAR (represión) o dominios ricos en aminoácidos ácidos (activación) (Adamczyk et al., 2007; Honma y Goto, 2001). Además cuando se fusiona el factor de transcripción FUL con el dominio de unión a DNA de la proteína GAL4 en ensayos de dos híbridos, esta proteína de fusión no presenta ninguna actividad (comunicación personal de C. Ferrandiz). Esta información sugiere que la actividad de FUL pueda estar marcada por su interacción con otros factores que le confieran actividad reguladora, pudiéndose comportar tanto como un activador o un represor de la transcripción en función de sus interactores.

Como hemos visto, los procesos en los que participa FUL tienen lugar en diferentes tejidos y etapas de la vida de *Arabidopsis*, y aparentemente, en cada uno de estos procesos regula genes diferentes.

Existen diferentes posibilidades que explicarían como un mismo gen puede participar en tan diferentes procesos.

Formación de múltiples complejos

Una posibilidad que se deduce a partir del trabajo realizado en el capítulo 1 sería la capacidad de formar diferentes complejos con otros factores de transcripción. Nuestro trabajo muestra que FUL puede interactuar físicamente con diferentes factores de la familia MADS, como SVP, SOC o AG. Las diferentes combinaciones de FUL con estas proteínas podrían determinar tanto las dianas reguladas por este gen, como la actividad que presentaría. Un ejemplo de esta dualidad reguladora dependiente del complejo formado lo ofrece la interacción de FUL con SVP. SVP actúa reprimiendo la expresión de SOC1 cuando interactúa con FLC, mientras que cuando interactúa con FUL se comportaría como un activador de SOC1. De este modo, la capacidad de formar complejos con otros factores de transcripción podría ser clave para establecer los mecanismos de acción seguidos por FUL. FUL, además de las interacciones aquí mostradas, es capaz de formar complejos con otros MADS como AGL24, AGL21, AGL14, AGL6, SEP1, SEP2 y SEP3 (de Folter et al., 2005), a la vez que puede interactuar con otros factores de transcripción pertenecientes a otras familias (comunicación personal de S. de Folter, Balanza y Ferrandiz, resultados no mostrados). En la bibliografía se encuentran ejemplos de otras proteínas MADS que modifican su mecanismo de acción en función de sus interacciones. Un ejemplo podría ser AP1, que al igual que FUL forma complejos con diferentes proteínas

MADS. Durante las etapas iniciales del desarrollo floral AP1 participa junto a SVP y AGL24 en la represión de los genes homeóticos florales de clase B y C (Gregis et al., 2009). En esta represión también participan los corepresores transcripcionales LUG y SEU, que interactúan físicamente con los complejos formados por AP1 (Gregis et al., 2006; Gregis et al., 2009). Por otro lado, el complejo formado por AP1 y CAL actuaría como un activador de la transcripción del gen de identidad de meristemo floral *LFY* (Kaufmann et al., 2010; Kempin et al., 1995; Liljegren et al., 1999).

Las dianas de *FUL* participan en múltiples procesos

Es posible que los diferentes genes identificados como dianas de *FUL* en procesos concretos tengan también un papel en el resto de procesos donde participa *FUL*. Por ejemplo, hemos observado que *FUL* controla la actividad del SAM y los meristemos florales a través de la regulación directa de *AP2*, a la vez que participa en el control de la transición floral a través de su interacción con SVP y *SOC1* y la regulación de *SOC1* y *LFY*. Trabajos recientes han identificado al clado formado por *AP2* y 5 genes más, como represores de la transición floral (Jung et al., 2007; Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010), actuando sobre FT y *SOC1* (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009). La represión de *AP2* observada, además de ser importante para la actividad meristemática también podría tener un efecto en el control del tiempo de floración.

Por otro lado, los genes MADS que interactúan con *FUL* podrían estar también regulando la actividad del SAM o de los meristemos florales. El doble mutante *ful soc* presenta defectos en la determinación de SAM, que pierde su identidad de meristemo inflorescente para adquirir de nuevo identidad de meristemo vegetativo (Melzer et al., 2008) (Capítulo 1). La transformación observada en este doble mutante sugiere un papel de *SOC1* en el control de la actividad del SAM, por lo que la acción conjunta de *FUL* y *SOC1* durante la transición floral podrían tener también un efecto sobre la actividad meristemática.

Además, algunos de los genes identificados como posibles dianas de *FUL* durante el desarrollo del fruto también se expresan durante otras etapas del desarrollo y tejidos de la planta, como los genes *PIF* o el gen *PIN7*, por lo que también podrían estar participando en el resto de procesos controlados por *FUL*. También es interesante notar, que aunque ninguna función durante el desarrollo del fruto se ha atribuido a los genes *SOC1* y SVP, la expresión de estos genes sí que se detecta en este órgano (Samach et al., 2000) (Balanza y Ferrandiz, resultados no mostrados), al igual que la de *AP2* (Wollmann et al., 2010).

***FUL* como componente de un macrocomplejo de regulación**

Un último aspecto a tener en cuenta podría ser que *FUL*, y los MADS en general, podrían formar parte de algún mecanismo molecular que controlara el estado de la cromatina, modulando la accesibilidad de la maquinaria de la transcripción. El desarrollo está marcado por cambios en el estado de la cromatina que establecen los genes que se expresan en cada etapa. Un ejemplo podría ser la transición floral. En *Arabidopsis* este proceso está considerado como un proceso irreversible, y una vez iniciado, no existe la posibilidad de vuelta atrás. Durante este proceso en el SAM se deben producir cambios que determinan su futuro desarrollo a la producción de flores, a pesar de las condiciones externas que actúen sobre la planta. Este tipo de cambios que determinan el desarrollo se asocian normalmente con cambios epigenéticos estables de la cromatina que habilitan ciertas regiones del genoma para ser transcritas

mientras que limitan otras. La reversión del SAM observada en el doble mutante *ful soc1* sugiere defectos en estos procesos de determinación del desarrollo, por lo que tal vez, FUL y SOC1, y los MADS en general – muchos de ellos considerados genes homeóticos-podrían estar implicados en el establecimiento de este tipo de modificaciones del genoma que determinan o establecen nuevos patrones de expresión. Apoyando esta hipótesis, recientemente se han descrito algunas interacciones entre proteínas MADS y proteínas que participan en la remodelación de la cromatina: SVP interacciona físicamente con TFL2 (Liu et al., 2009), que participa en procesos de represión epigenética, mientras que SOC1 interacciona con SAP18, un miembro del complejo de deacetilación de histonas SIN3 (Liu et al., 2009). También se han descrito mecanismos de acción donde los MADS provocan cambios en el estado de la cromatina: AG media la activación de *KNU* en un proceso que implica la eliminación de marcas epigenéticas represivas de la histona3 (Sun et al., 2009).

Por estos motivos sería interesante analizar la relación existente entre FUL y otras proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina, al igual que analizar el estado de cromatina asociada a dianas moleculares de FUL durante los diferentes procesos de desarrollo donde FUL participa

FUL podría controlar el tiempo de floración por diferentes caminos

Nuestro trabajo muestra que *FUL* podría considerarse como un integrador de la transición floral, afectando a este proceso principalmente en condiciones no inductivas de floración. Su papel inductor se ejercería a través de la activación del integrador floral *SOC1* y la subsiguiente activación del gen de identidad floral *LFY*. En el proceso de activación de *SOC1*, participaría SVP, un represor clásico de la transición floral, al formar un complejo con FUL. El reclutamiento de SVP por parte de FUL proporcionaría además, un mecanismo mediante el cual se impediría el efecto represor de FLC sobre *SOC1*.

Además de este mecanismo descrito, FUL podría regular la transición floral por otros caminos. En el análisis transcriptómico realizado en frutos, se identificaron un grupo de factores de transcripción relacionados con la transición floral que mostraban alterada su expresión. Algunos de ellos, considerados represores de la transición floral, como TEM1 (Castillejo y Pelaz, 2008) y MAF5 (Fujiwara et al., 2010; Ratcliffe et al., 2003), presentaban niveles altos de expresión en el mutante *ful*, mientras que otros, considerados promotores de la transición floral, como AGL42, SPL9 y SPL10 (Dorca-Fornell et al., 2011; Shikata et al., 2009; Wang et al., 2009), presentaban niveles bajos de expresión. Si FUL estuviera afectando a la expresión de estos genes también durante la transición floral podrían constituir un nuevo nivel de regulación asociado a FUL durante este proceso. De entre estos genes, SPL9 y SPL10 son activadores directos de FUL en el proceso de la transición floral mediado por la ruta endógena de la edad (Wang et al., 2009). Sus bajos niveles de expresión en el mutante *ful* sugieren que podría existir una especie de auto regulación entre ellos, posiblemente indirecta, ya que también muestran valores bajos en la línea FUL:VP16.

Como hemos comentado anteriormente, además de su papel en el control de la actividad meristemática, *AP2* también reprime la transición floral. *AP2* actúa en este proceso a través de la regulación negativa de los genes *SPL*, *FT* y *SOC1* (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Yant et al., 2010). La represión de *AP2* por FUL podría establecer un mecanismo regulador adicional durante la transición floral, al eliminar los efectos represores de *AP2* sobre sus dianas.

DISCUSIÓN GENERAL

La ruta del fotoperiodo permite que la planta inicie la transición floral cuando la duración del día es la adecuada, mientras que la ruta endógena de la edad, promueve la transición floral a la vez que regula los sucesivos cambios morfológicos asociados a los cambios de fase en función del tiempo. Ambas rutas han de estar coordinadas, y puesto que *AP2* reprime la expresión de los genes que median la respuesta al fotoperiodo y a la ruta endógena de la edad, y *FUL*, además de reprimir la expresión de *AP2* (y posiblemente la de otros tres miembros del clado *AP2*), es capaz de responder a los estímulos de ambas rutas, podríamos considerar que la represión ejercida por *FUL* sobre *AP2* podría ser la responsable de la coordinación entre ambas rutas (Fig. D-1).

La hipótesis planteada propone que la activación de *FT* por el fotoperiodo activaría la expresión de *FUL*. El incremento en los niveles de *FUL* provocaría la represión de *AP2*, permitiendo la activación de los genes *SPL* de forma independiente a la ruta endógena de la edad, permitiendo que se produjeran los cambios morfológicos asociados a los cambios de fase. Del mismo modo, la presencia de las proteínas *SPL* provocaría la activación de *FUL*, que a su vez provocaría la disminución de los niveles de *AP2*, eliminándose la represión de *FT* y *SOC1*, contribuyendo a favorecer la transición floral.

De acuerdo con esta hipótesis, la expresión ectópica de *FUL* en la vasculatura de *Arabidopsis* es capaz de dirigir la activación de *FT* (Wang et al., 2009), que podría ocurrir por la represión de *AP2*. Otro dato que sugiere un papel de *FUL* en la sincronización de ambas rutas es el retraso o falta de cambios morfológicos asociados a los cambios de fase observados en el mutante *ful*, donde las hojas caulinares retienen características vegetativas (Capítulo 1).

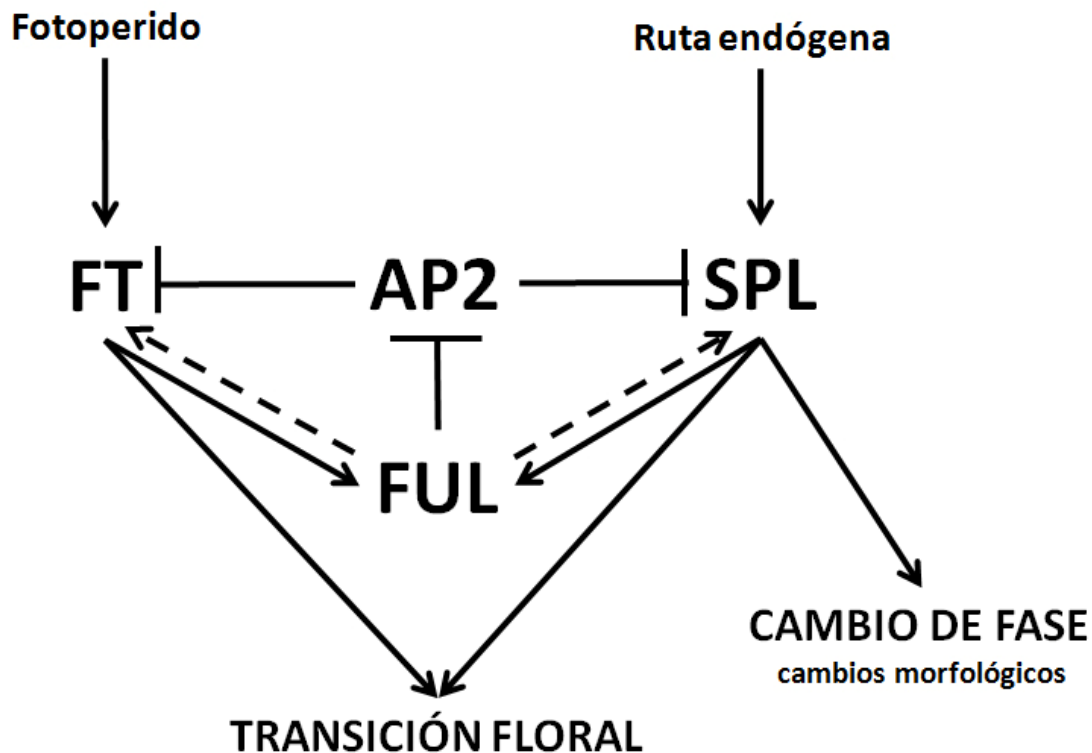


Figura D-1: Coordinación de la ruta del fotoperiodo y la ruta endógena de la edad. *FUL* podría coordinar la ruta endógena de la edad y la ruta del fotoperiodo mediante la represión de *AP2*. *FUL* responde tanto a la ruta endógena de la edad como a la ruta del fotoperiodo. La activación de su expresión por alguna de estas rutas provocaría la represión de *AP2*, desbloqueando la activación de la otra. De este modo se asegura que ambas rutas se activen en el momento que lo haga una de ellas, sincronizando la transición floral y los cambios morfológicos asociados a los cambios de fase.

El equilibrio entre *FUL* y *AP2* podría estar controlando la identidad del SAM

Nuestros resultados muestran que *FUL* participa tanto en la promoción de la transición floral como en la regulación de la actividad del SAM. Durante la transición floral, el SAM cambia su identidad. Por un lado genera meristemas determinados que darán lugar a las flores, y por otro lado, debe de preservar su actividad manteniéndose indeterminado para suministrar células que sustenten los nuevos meristemas y la elongación de los entrenudos. El equilibrio entre estos procesos dependientes del SAM debe estar coordinado. Se ha propuesto que la relación entre estas dos actividades, indeterminación-determinación, podría ser uno de los factores que influirían en la especificación de la gran diversidad de tipos de inflorescencias que encontramos en la naturaleza (Benlloch et al., 2007; Lippman et al., 2008; Prusinkiewicz et al., 2007). De nuevo, la relación entre *FUL* y *AP2* podría regular este tipo de equilibrio (Fig. D-2), contribuyendo a mantener el SAM en un estado indeterminado. Tanto la sobreexpresión de *FUL* como la ausencia de *AP2* provocan la determinación del SAM, indicando que podrían actuar de forma opuesta en mantener su identidad. Además esta relación podría afectar también al resto de meristemas presentes en la inflorescencia, contribuyendo así en la modelación de la arquitectura de la inflorescencia, controlando tanto el número de coflorescencias producidas como el de flores.

Sería interesante testar la relación existente entre estos genes con otros que participen o se hayan relacionado con este proceso como podría ser *TFL1* (Bradley et al., 1997; Ratcliffe et al., 1998).

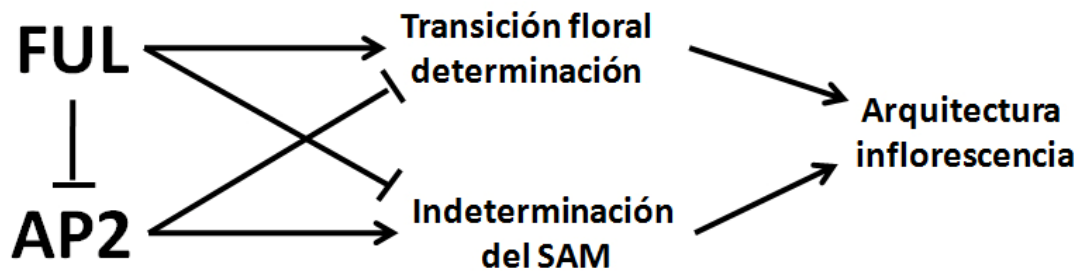


Figura D-2: La acción conjunta de *AP2* y *FUL* podrían participar en el control de la identidad del SAM, modulando el equilibrio entre la determinación, estimulada por la transición floral, y la indeterminación, necesaria para mantener la actividad del meristemo inflorescente. El equilibrio entre estas actividades podría participar en el desarrollo de diferentes tipos de inflorescencia.

General conclusions

Conclusions of Chapter 1:

From the results obtained in this part of the work we can conclude that:

-*FUL* is a floral transition integrator. Its role on flowering time seems to be more relevant in winter-annual ecotypes, where *FLC* levels are high.

-*FUL* regulates both developmental phase changes that occurred through the floral transition (V to I1 y I1 to I2) differently y depending of growth conditions. Under inductive conditions, as in long day conditions, *FUL* participates mainly in the I1 to I2 transition, but in non inductive conditions as in short day conditions, *FUL* controls both, the V to I1 transition as the I1 to I2 transition.

-*FUL* promotes the I1 to I2 transition, at least in part, through the direct activation of the floral meristem identity gene *LFY*.

-*FUL* participates in the V to I1 transition through the direct activation of another floral integrator, *SOC1*. Both proteins, *FUL* y *SOC1*, are able to interact physically y to bind to the *LFY* promoter.

-The promoter effect of *FUL* on floral transition depends of the presence of *SVP*.

-*FUL* y *SVP* interact physically y bind the *SOC1* promoter.

-*SVP* shows a dual behaviour in floral transition. This dual mode of action depends on the nature of protein complexes where *SPV* participates. The dimer *SVP-FLC* represses *SOC1* expression. The dimer formed by *FUL* y *SVP* could show a different activity, activating *SOC1* expression y therefore becoming an activator of floral transition.

Conclusions of Chapter 2:

From the results obtained in this chapter we can conclude:

-*FUL* participates in the regulation of meristem activity, both in the SAM y the floral meristems, controlling the expression of *WUS*. This regulation is achieved, at least in part, through direct negative regulation of *AP2*.

-The regulation of *AP2* levels is controlled jointly between the miR172, that reduces both *AP2* RNA levels as well as *AP2* translation, y *FUL*, that directly represses the expression of *AP2*. This combined action contributes to the fine-tune regulation of *AP2* protein, both in the SAM y the floral meristem.

-The *FUL* function is important in the establishment of the annual monocarpic growth habit of *Arabidopsis thaliana*, working actively in the GPA process. Our results are the first molecular evidence about the existence of a genetic control of this process, which is present in a long number of plant species, including many of agronomical interest. In this process *FUL* represses gradually the expression of *AP2* in the SAM, causing the progressive fall of *WUS* expression. When *WUS* ceases its expression, inflorescence development is arrested, y the GPA takes place.

Conclusions of Chapter 3:

From the results obtained in this chapter we can conclude:

- The FUL:VP16 line is a valid tool for the identification of molecular targets of *FUL*.
- The transcription factor FUL shows a dual behaviour in the regulation of its targets, working mainly as a transcriptional repressor, y in a lesser degree as a transcriptional activator.
- Throughout the gynoecium development, FUL could work repressing directly the expression of *SHP* in the valves, an indirectly the expression of *IND*. In this process FUL also participates repressing the expression of *SPT* independently of *IND*.
- FUL participates in fruit development, at least in part, controlling the level y response of different hormones:
 - FUL participates in the control of auxin distribution during fruit development through the positive regulation of the auxin transport gene *PIN7*. *PIN7* is expressed in the apical zone of the fruit y in the marginal tissue of the replum, directing the auxin flow basipetaly. Accepting the existence of an auxin gradient with higher levels in the apical side of the fruit, FUL would control its correct establishment by *PIN7* regulation. For this, FUL could be considered a new morphogenetic determinant during fruit development, participating in the establishment of the auxin gradient.
 - FUL could mediate a differential response to GAs in the valves y in the valve margin through the activation of *PIL5* y *PIL6* y the repression of *PIL1* y *SPT*.
 - FUL could also regulate the level of other hormones, like ethylene y abscisic acid. FUL would act repressing the ethylene synthesis, which mediates fruit senescence in response to sterility, y activating the abscisic acid degradation. Both actions would allow fruit elongation.
- FUL also participates in the direct repression of the class B homeotic gene *PI*, involved in the specification of stamen identity, repressing *PI* expression during gynoecium y fruit development Arabidopsis.

Materiales y Métodos

Material biológico.

Material vegetal.

Genotipos de Arabidopsis utilizados.

Durante la realización de este trabajo se han empleado los ecotipos silvestres de Arabidopsis Columbia-0 (Col.), *Lansberg erecta* (Ler.) y *Wassilewskija* (Ws). En la tabla M-1 se muestran los diferentes genotipos de Arabidopsis empleados en este estudio. En las combinaciones genéticas realizadas, cuando los diferentes genotipos estaban en un fondo genético distinto, los dobles mutantes obtenidos se intrograsaron al menos dos veces más en el fondo genético de uno de los parentales, normalmente en el fondo Col.

Gen	Línea	Ecotipo	Procedencia	Referencia
mutantes				
AG	<i>ag-1</i>	Ler	TAIR (código CS25)	Bowman <i>et al.</i> , 1989
AP2	<i>ap2-102</i>	Col	este trabajo	No publicada
	<i>ap2-12</i>	Col	M. Schmid (MPI, Alemania)	Yant <i>et al.</i> , 2010
CLV3	<i>clv3-2</i>	Ler	TAIR (código CS29)	Clark <i>et al.</i> , 1995
CRC	<i>crc-1</i>	Ler	D. Smyth (SBSMU, Australia)	Alvarez and smith, 1999
FIL	<i>fil</i>	Col	TAIR (código CS853104)	Siegfried <i>et al.</i> , 1999
FRI	<i>FRI Col</i>	Col	A. Locascio (IBMCP, España)	Johanson <i>et al.</i> , 2000
FUL	<i>ful-1</i>	Ler	C. Ferrándiz (IBMCP, España)	Gu <i>et al.</i> , 1998
	<i>ful-2</i>	Col	C. Ferrándiz (IBMCP, España)	Ferrándiz <i>et al.</i> , 2000a
HEC3	<i>hec3-1</i>	Col	M. yanofsky (UCSD, USA)	Gremsky <i>et al.</i> , 2007
KNU	<i>knu-1</i>	Ws	A.M. Koltunow (CSIRO, Australia)	Payne <i>et al.</i> , 2004
PI	<i>pi-1</i>	Ler	TAIR (CS77)	Bowman <i>et al.</i> , 1989
SOC1	<i>soc1-2</i>	Col	TAIR (T-DNA insertion)	Lee <i>et al.</i> , 2000
SPT	<i>spt-11</i>	Col	TAIR (CS857133)	Penfield <i>et al.</i> , 2005
SUP	<i>sup-2</i>	Col	TAIR (código CS6225)	Schultz <i>et al.</i> , 1991
SVP	<i>svp-32</i>	Col	TAIR (SALK_072930)	Alonso <i>et al.</i> 2003
WUS	<i>wus-1</i>	Ler	TAIR (código CS15)	Laux <i>et al.</i> , 1996
Líneas transgénicas				
AG	AG::GUS	Col	C. Gómez-Mena (IBMCP, España)	Busch <i>et al.</i> , 1999
	35S::AP2	Col	este trabajo	No publicada
AP2	35S::ap2-102	Col	este trabajo	No publicada
	AP2:AP2::GFP	Ler	J.A. Long (SIBS, USA)	Wollmann <i>et al.</i> 2010
AP3	AP3::GUS	Col	T. Jack (DBS-DC, USA)	Tilly <i>et al.</i> , 1998
FLC	35S::FLC	Col	A. Locascio (IBMCP, España)	Michaels and Amasino, 1999
	FLC::GUS	Col	A. Locascio (IBMCP, España)	Sheldon <i>et al.</i> , 2002
FUL	35S::FUL	Col	C. Ferrándiz (IBMCP, España)	Ferrándiz <i>et al.</i> , 2000b
	35S::FUL::GFP	Col	este trabajo	No publicada
	FUL:FUL::VP16	Col	C. Ferrándiz (IBMCP, España)	No publicada
LFY	LFY::GUS	Col	M.A. Blazquez (IBMCP, España)	Blazquez <i>et al.</i> , 1997
PIN7	PIN7:PIN7::GFP	Col	M.A. Perez-Amador (IBMCP España)	Vieten <i>et al.</i> 2005
	PIN7::GUS	Col	L. Ostergaard (JIC, Reino Unido)	Vieten <i>et al.</i> 2005
SOC1	35S::SOC1	Ler	M.A. Blazquez (IBMCP, España)	Lee <i>et al.</i> , 2000
SPT	SPT::GUS	Ler	D. Smyth (SBSMU, Australia)	Groszmann <i>et al.</i> , 2010
SVP	35S::SVP	Col	H.Sommer (MPI, Alemania)	Masiero <i>et al.</i> 2004
WUS	WUS::GUS	Ler	R. Simon (HHUD, Alemania)	Grob-Hardt <i>et al.</i> , 2002

Tabla M-1: Genotipos y líneas transgénicas utilizadas es este trabajo, donde se indica ecotipo y procedencia de las líneas.

Cultivo de Arabidopsis en invernadero.

Las semillas de Arabidopsis se sembraron en alveolos, de 6.5 x 6.5 x 5 cm, o en macetas, de 11 ó 13 cm de diámetro, según el tipo de experimento a realizar, con una mezcla 2:1:1 de turba

negra:perlita:vermiculita, previamente esterilizada a una atmósfera de presión durante 20 min. Tras la siembra, los alveolos y/o las macetas se colocaron en bandejas que se regaron abundantemente y se cubrieron con un plástico para mantener una humedad alta durante la germinación y evitar contaminaciones de otras semillas. Las semillas se estratificaron durante 5 días en oscuridad a 4 °C para sincronizar la germinación, tras lo cual las bandejas se pasaron a la cabina de cultivo. Cuando las plántulas habían desarrollado el primer par de hojas, o la condensación era muy alta, se agujereó el plástico en varios puntos y, 2 ó 3 días después, se retiró completamente. Las plantas fueron regadas por inmersión una vez a la semana con agua destilada y otra vez con solución Hoagland nº 1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

Dentro de las cámaras de cultivo, la iluminación procedía de tubos fluorescentes “Sylvania Standard F58W/133-T8” que emitían luz blanca fría con un flujo de 4600 lm. Las plantas se cultivaron bajo dos fotoperiodos diferentes: día largo, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, o día corto, 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. La temperatura se mantuvo estable entre 21 y 23 °C.

Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en placas de Petri.

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en placas de Petri, se realizó en cabinas con temperatura constante de 25° C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). En este caso la luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36W (Sylvania) con una intensidad de 90 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las semillas se esterilizaron por inmersión, durante 5 minutos en una solución de lejía comercial al 40% (v/v) y 0.02% Tritón X-100 (v/v) con agitación, 5 minutos en etanol 70% (v/v) y, posteriormente se lavaron 5 veces con agua Mili-Q estéril, en la campana de flujo laminar, antes de la siembra.

Fertilización cruzada.

Para realizar cruzamientos entre los diferentes genotipos de *Arabidopsis*, se emascularon las flores receptoras con unas pinzas, retirando todos los órganos excepto el pistilo sobre el que se depositó el polen de las plantas donantes. Los pistilos polinizados de esta forma se mantuvieron embolsados hasta que elongaron, iniciándose el desarrollo de la silicua correspondiente. Estas silicuas se recogieron una vez las valvas empezaron a abrirse.

Conservación de las semillas de *Arabidopsis*.

Una vez las plantas de *Arabidopsis* habían completado su ciclo vital, se recogieron las semillas que se dejaron secando durante, al menos, 7 días a 37 °C. A continuación, se almacenaron estas semillas dentro de una cámara con una temperatura de 10 °C y una humedad del 25%, aproximadamente, y en oscuridad.

Microorganismos.

Cepas bacterianas utilizadas.

Durante la realización de esta Tesis se han utilizado las cepas bacterianas descritas en la tabla M-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa	Uso	Origen/Referencia
<i>Escherichia Coli</i> DH5 α	Transformación de bacterias	Hanahan, 1993
<i>Escherichia Coli</i> One Shot®TOP10	Transformación de bacterias	Invitrogen
<i>Escherichia Coli</i> Supercharge EZ10	Transformación de bacterias	Clontech
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMO90	Transformación de Arabidopsis y Nicotiana	Koncz y Schell, 1986

Tabla M-2: Cepas bacterianas empleadas durante la realización de este trabajo.

Condiciones y medios de cultivo de microorganismos.

Los cultivos líquidos de *Escherichia Coli* (*E. Coli*) y *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) se incubaron toda la noche a 37 °C o a 28 °C, respectivamente, con agitación de 200 rpm. Los cultivos en medio sólido se incubaron a 37 °C durante una noche para *E. Coli*, o a 28 °C durante 2 ó 3 días para *A. tumefaciens*.

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB (Luria-Bertani médium), que consta de :

- 1 g/l de triptona,
- 5 g/l de extracto de levadura
- 1 g/l de NaCl,
- pH 7.

El medio sólido se obtuvo añadiendo 1.5 g/l de agar.

Los antibióticos selectivos y las concentraciones a las que se utilizaron se detallan en la tabla M-3.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Bacteria
Kanamicina	50	<i>E. Coli/A. tumefaciens</i>
Espectinomina	100	<i>E. Coli</i>
Rifampicina	100	<i>A. tumefaciens</i>

Tabla M-3: Antibióticos y concentraciones utilizadas.

Conservación de cepas bacterianas en glicerol.

Para conservar las cepas bacterianas durante un periodo largo de tiempo, se añadió glicerol a un cultivo, crecido bajo las condiciones descritas en el apartado 2.1.2.2, según se describe en Sambrook *et al.* (1989) con ligeras modificaciones. Así, los glicerizados se prepararon en tubos estériles de 2 ml "Cryovial" de "Simport" (www.simport.com), con 900 μl del cultivo bacteriano y 700 μl de glicerol al 60%. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad. Una vez homogeneizada la mezcla, los tubos se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

Métodos de biología molecular.

Vectores.

Las características, uso y origen de los vectores utilizados durante la realización de este trabajo están resumidos en la tabla M-4.

Vector	Características	Uso	Origen/Referencia
pCR8/TOPO/GW	Spect ^r , sitios de unión para los cebadores M13 directo y reverso, y GW1 y GW2. Vector de origen para el sistema de recombinación Gateway	Clonación de productos de PCR	Invitrogen
pEarly100	Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Gateway. Kan ^r (bacteria) y Basta ^r (plantas).	Sobreexpresión de cDNAs mediante el promotor 35S	Invitrogen
pEarly101	Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Gateway. Kan ^r (bacteria) y Basta ^r (plantas).	Sobreexpresión de cDNAs fusionados a GFP en el extremo Cterminal mediante el promotor 35S	Invitrogen
pYFN43	Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Gateway. Kan ^r (bacteria).	Ensayo BiFC. Expresión transitoria de cDNAs fusionados al extremo Nterminal de la proteína GFP mediante el promotor 35S	pMDC43 / A. Ferrando
pYFC43	Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Gateway. Kan ^r (bacteria).	Ensayo BiFC. Expresión transitoria de cDNAs fusionados al extremo Cterminal de la proteína GFP mediante el promotor 35S	pMDC43/A. Ferrando

Tabla M-4: Vectores utilizados durante este trabajo. Para más información acerca de los vectores pYFN43 y pYFC43 se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.

Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.

Aislamiento DNA plasmídico.

Aislamiento de DNA plasmídico de *E coli*.

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema Fast Plasmid Mini Kit de Eppendorf siguiéndose las recomendaciones suministradas por la casa comercial. Las preparaciones de DNA plasmídico a media escala se realizaron a partir de cultivos crecidos durante una noche en 100 ml de medio líquido LB suplementado con antibiótico, según el procedimiento de extracción y purificación de DNA plasmídico del sistema de Qiagen Plasmid Midi Kit (columnas Qiagen tip-100), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de DNA plasmídico de *A tumefaciens*.

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

Aislamiento DNA genómico.

Se han utilizado dos protocolos distintos de extracción de DNA genómico durante el desarrollo de esta tesis, ambos con óptimos resultados. El material obtenido se destino a la realización de genotipados mediante PCR.

Quick DNA Prep for PCR:

Descrito en "Arabidopsis: a Laboratory Manual" (Weigel D. y Glazebrook J.) pag:168-169. Se partió de hojas de roseta (aproximadamente 1/2-3/4 del tamaño de una tapa de eppendorf) y se utilizó un protocolo de extracción consistente en homogeneizar las hojas en una solución de extracción [200mM Tris.Hcl, (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25mM EDTA (pH8), 0.5% SDS y agua estéril]. Posteriormente se mezcló con el vortex, tras centrifugar se pasó el sobrenadante a otro eppendorf, se precipitó el DNA con isopropanol y se hizo un lavado con etanol 70% y se resuspendió el DNA en un volumen de 100µl de agua estéril.

Método de extracción de ácidos nucleicos para genotipado por PCR

Descrito en (Berendzen et al., 2005). Se partió de aproximadamente de 10 mg de material (una hoja joven pequeña o un disco del tamaño de una tapa de eppendorf) y se congeló la muestra en nitrógeno líquido. Con la ayuda de una varilla de plástico autoclavada se molió el tejido con 100 µl de la disolución de sacarosa (se debe preparar en el momento y usar en una semana como mucho): 50mM Tris-HCl; pH7.5, 300mM NaCl, 300mM Sacarosa y agua hasta 20ml. Posteriormente se añadieron 100 µl más de esta disolución y se incubó inmediatamente a 95-100°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 8000 rpm durante 5-10 segundos. Opcionalmente, si no se iba a continuar la extracción con una PCR, se transferían 50- 100 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se guardaban a -20°C. Si se continuaba con una PCR, se utilizaban 2 µl del sobrenadante para la reacción de PCR.

Extracción de RNA de Arabidopsis.

Para la extracción de RNA total se llevaron a cabo dos protocolos diferentes en función del uso final del RNA:

Extracción y purificación de RNA total para síntesis de cDNA.

Para la extracción de RNA total de plantas Col-0 que posteriormente se utilizó para la obtención de cDNA, se utilizó el sistema RNeasy Plant Minikit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la unión selectiva del RNA a membranas acopladas a columnas de centrifugación. Posteriormente se utilizaron 4 µg de RNA total para sintetizar el cDNA utilizando el Kit First Strand cDNA synthesis (Amersham Biosciences).

Extracción y purificación de RNA total para micromatrices.

Para la extracción de RNA total destinado a la obtención de cDNA con el que se realizaría la hibridación de las micromatrices se utilizó un protocolo diferente, puesto que con el kit comercial descrito anteriormente no conseguíamos los criterios mínimos de cantidad y calidad requeridos para el experimento:

Se recolectaron entre 150 y 300 mgr de frutos en estadio 15-16, y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. El tejido congelado se machacó en un mortero previamente enfriado con N₂ e impidiendo que se descongelara durante el proceso. Una vez machacado, a cada muestra se le añadió 1ml de tampón de extracción (4% de ácido p-amino salicílico (Sigma A-3505) y 1% de ácido 1,5-naftalendisulfónico, disodio), 1ml de fenol y 10 µl de βmercaptoetanol. Tras homogeneizar la muestra se transfirió a un tubo corex de 15 ml, y se le añadió 1 ml de cloroformo. El contenido del corex se agitó mediante el uso de un vortex a máxima velocidad durante 30-40 seg., y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos en un rotor basculante. Tras la centrifugación se recogió la fase acuosa. A la fase

acuosa se le añadió 1/10 de su volumen de NaOAc 3M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, se agitó y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos. Tras este tiempo se volvió a centrifugar del mismo modo que anteriormente, pero se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 600µl de agua libre de RNAasas, y se transfirió a un tubo eppendorf. Al volumen transferido se le añadieron 300µl de LiCl 10M, que tras mezclar bien, se incubó durante una noche en la nevera (0-4°C). Tras esta incubación la muestra se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm. El pellet obtenido se lavó con etanol al 80% y se centrifugo levemente. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar ligeramente el pellet, para después resuspenderlo en 50µl de agua libre de RNAasas. La pureza y concentración del RNA obtenido se determinó con "Nanodrop® ND-1000". Asimismo, se comprobó su integridad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa bajo condiciones desnaturalizantes (Sambrook et al., 1989).

Manipulación de ácidos nucleicos.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para la realización de esta técnica se siguió el protocolo empleado por Sorefan et al. (Sorefan et al., 2009), utilizando un anticuerpo frente a GFP (Ab290). El material biológico fueron plantas 35S::FUL como control y 35S::FUL:GFP. El control lo establecerían las plantas 35S::FUL tratadas con el anticuerpo.

Entrecruzamiento

Se recolectaron 700mg de inflorescencias de unos 2cm de altura, que tras ser lavadas con agua, se sumergieron inmediatamente en 20 ml de solución A (solución de entrecruzamiento: 0.4M sacarosa, 10mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF y 1% formaldehído (el PMSF y el formaldehído se añaden en el momento de utilizar la solución)) en un falcon de 50ml, y se les aplico 2 pulsos de vacío de 5 y 10 minutos. Con este paso se consigue el entrecruzamiento de las proteínas al DNA al que están asociadas.

Para detener la reacción de entrecruzamiento se añade 1ml de glicina 2M y se continúa aplicando vacío durante 10 minutos más.

Tras detener la reacción de entrecruzamiento se lava el tejido con exceso de agua destilada (unos 5 enjuagues), se elimina el exceso de agua secando con un poco de papel absorbente y se vuelven a pesar las muestras, para congelarlas en nitrógeno líquido. Las muestras se pueden almacenar ahora a -80°C pero hay que evitar periodos de almacenamiento prolongados

Preparación de las "beads"

Este paso se lleva a cabo el mismo día que se realiza la inmunoprecipitación (IP). Se utilizaron beads magnéticas (Protein A magnetic beads, New England BioLabs, S1425S), que facilitan en gran medida los lavados y recuperación del anticuerpo utilizado, mediante el uso de un soporte imantado. Se utilizan 25µl de beads en cada prelavado de las muestras y de 30 a 50 µl por IP (15 µl por cada 100 µl de extracto).

Una vez calculado el volumen que necesitaremos de beads, estas se lavan 3 veces con solución B (50 mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholato sódico, 0.1% SDS, 10mM butirato sódico, 1mM PMSF, 1mg/ml BSA y 20ng/ml de DNA de esperma de salmón sonicado) en el mismo volumen inicial de las beads. En cada lavado las beads se incuban al menos durante una hora con agitación a temperatura ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por último se lavan una vez con la solución de lisis (50 mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholato sódico, 0.1% SDS, 10mM butirato sódico, 1mM PMSF y 1X del cocktail inhibidor de proteinasas para plantas (sigma, P9599) (el PMSF y el cocktail se añaden en el momento de utilizar la solución) y luego se resuspenden en el volumen inicial de las beads.

Extracción y sonicación del DNA

Las muestras entrecruzadas se machacan en nitrógeno líquido minuciosamente y se resuspenden en 150 µl de solución de lisis por cada 100mg de tejido (1050 µl en nuestro caso), obteniéndose una papilla densa, que se transfiere a un tubo eppendorf de 2ml.

El siguiente paso es romper el DNA por sonicación, aproximadamente en fragmentos de entre 100 y 1000 pares de bases. La sonicación es un paso crítico en el experimento, por lo que la puesta a punto de las condiciones del sonicador es muy importante. Se debe evitar la formación de burbujas durante el sonificado ya que reduce su eficiencia. El rango óptimo de fragmentos sería entre 300 y 500 pares de bases. Nosotros utilizamos un sonicador UP200S Hielscher Ultrasonics GmbH , utilizando una amplitud del 70% y 70 ciclos/seg. Se realizaron tres sonicaciones de 20 pulsos, manteniéndolas muestras siempre en hielo y dejando pasar 2 minutos entre cada sonicación.

Tras haber sonificado se centrifuga las muestras durante 10 minutos a máxima velocidad y a 4°C en una centrifuga de mesa.

El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se realiza el prelavado de cada muestra con 25µl de las beads preparadas anteriormente, al menos durante una hora con rotación a 4°C.

Inmunoprecipitación

Tras el prelavado con las beads se transfieren volúmenes fijos, normalmente 150-300 µl, a tubos nuevos que contienen el anticuerpo. En nuestro caso se transfirieron 300 µl de las muestras 35S::FUL y 35S::FUL:GFP a tubos que contenían 15 µl de anticuerpo antiGFP. También se transfirieron 300 µl de cada muestra a tubos sin anticuerpo, que constituirían nuestro "control sin anticuerpo". De cada muestra se reservó un volumen superior a 30 µl que después se utilizó como fracción del material de partida o IMPUT.

Las muestras se incuban toda la noche a 4°C con rotación.

Al día siguiente se añaden 15 µl por cada 100 µl de extracto utilizado, en nuestro caso 45 µl, y se continúa la incubación durante al menos dos horas más.

Lavados

Los lavados se realizan en una cámara fría (4°C) utilizando el soporte imantado, y descartando el sobrenadante en cada paso. Cada lavado se realiza con un volumen de 800 µl:

-lavado breve con solución de lisis (invirtiendo el tubo 7-8 veces hasta resuspender las beads).

-lavado largo con solución de lisis (5 minutos de incubación con rotación).

-lavado breve con solución LNDET (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P40, 1% deoxicholato sódico y 1mM EDTA).

-lavado largo con solución LNDET

-lavado breve con TE (10mM Tris, pH 8, 1mM EDTA)

-lavado largo con TE

Elución

A las beads obtenidas se le añaden 40 μ l de solución de elución (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃ y 0.25 mg/ml de proteinasa K) y se incuban a 65°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo, y se repite la elución de las beads con 40 μ l más de solución de elución y se repite el proceso. Finalmente tendremos un volumen de elución de 80 μ l.

De la fracción del material de partida que habíamos reservado se toman 30 μ l y se le añaden 50 μ l de solución de elución. Esto corresponde a un 10% del material de partida utilizado en la IP.

Reversión del entrecruzamiento

Para revertir el entrecruzamiento, todas las muestras se incuban durante toda la noche a 65°C. se recomienda el uso de un termociclador.

El DNA se recupera al día siguiente usando el Kit comercial PCR purification kit (QUIAGEN), eluyendo en un volumen final de 50 μ l. En nuestro caso la el volumen final se diluyó a la mitad, aunque este paso depende de la cantidad de DNA recuperado.

Es aconsejable testar la calidad de la sonicación en la fracción del IMPUT después de la purificación mediante el kit de QUIAGEN, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

La determinación del grado de enriquecimiento en secuencias de nuestras muestras se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

PCR

PCR tipo para amplificar cDNAs.

Para la amplificación de los diferentes cDNAs obtenidos en esta tesis se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction). El DNA molde de la reacción procedía de la retrotranscripción realizada sobre RNA total obtenido de plantas silvestres, salvo para el clonaje de *AP2*¹⁰² donde el RNA se obtuvo a partir de plantas *AP2*¹⁰². Las condiciones generales seguidas fueron:

1-1.25 μ M de cada cebador; 1.25 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; 0.5 U Taq Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs); Tampón de PCR 1X (New England Biolabs) y 200 ngr de DNA molde. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador "PTC-150" ("MJ Research") con una incubación inicial de 95 °C 2 min; seguida de 30 a 35 ciclos de 95 °C 30 seg, T_{anillamiento} 30 seg y 72 °C t_{extensión}; con una incubación final de 72 °C 10 min. La temperatura de anillamiento (T_{anillamiento}) se estimó en función de la temperatura de fusión aproximada (T_m) de los cebadores empleados en la reacción. El tiempo de extensión (t_{extensión}) dependía de la longitud del fragmento a amplificar y, en general, con esta polimerasa, se utilizó 30 seg por kb.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para comprobar que la reacción de PCR había funcionado, se analizó 1/10 (5 μ l) del volumen de la reacción mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (ver apartado electroforesis de DNA en geles de agarosa).

La polimerasa utilizada en estas PCR posee una tasa de error mínima, y actividad exonucleasa 3'-5'. Para su posterior clonaje en el vector pCR8/TOPO/GW, se procedió a añadir la base adenina libre requerida. A 10 μ l del producto de PCR purificado se le añadió 1,25mM de adenina, 1 U Taq DNA polimerasa EcoTaq (Ecogen), Tampón de PCR 1X (Ecogen) y agua hasta un volumen de 25 μ l. La mezcla se incubó en un termociclador "PTC-150" ("MJ Research") 2 min a 95 $^{\circ}$ C, seguida otra incubación a 72 $^{\circ}$ C durante 20 min. El producto de esta reacción se utilizó como inserto en el clonaje en pCR8/TOPO/GW.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron sintetizados por la empresa INVITROGEN (<http://www.invitrogen.com>) con grado de purificación máximo. En el Anexo I se recogen todos los cebadores empleados en esta Tesis.

PCR tipo para genotipados.

Para la amplificación de regiones genómicas y genotipado de los diferentes mutantes empleados en este trabajo también se utilizó la técnica de la PCR. El DNA molde de la reacción procedía de las extracciones de DNA genómico de las diferentes planas a analizar, utilizando 2 μ l del volumen final de extracción. Las condiciones generales seguidas fueron similares a las empleadas en la PCR tipo para amplificar cDNAs:

1-1.25 μ M de cada cebador; 1.25 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; MgCl₂ 1.25 mM; 1 U Taq DNA polimerasa EcoTaq (Ecogen); Tampón de PCR 1X (Ecogen) y DNA molde en concentración variable (2 μ l). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador "PTC-150" ("MJ Research") con una incubación inicial de 95 $^{\circ}$ C 2 min; seguida de 35 ciclos de 95 $^{\circ}$ C 30 seg, $T_{\text{anillamiento}}$ 30 seg y 72 $^{\circ}$ C $t_{\text{extensión}}$; con una incubación final de 72 $^{\circ}$ C 10 min. La temperatura de anillamiento ($T_{\text{anillamiento}}$) se estimó en función de la temperatura de fusión aproximada (T_m) de los cebadores empleados en la reacción. El tiempo de extensión ($t_{\text{extensión}}$) dependía de la longitud del fragmento a amplificar y, en general, con esta polimerasa, se utilizó 1min por Kb.

Para comprobar que la reacción de PCR había funcionado, se analizó 1/10 (5 μ l) del volumen de la reacción mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (ver apartado electroforesis de DNA en geles de agarosa).

En el anexo II se muestran las combinaciones de cebadores utilizadas para el genotipado, así como el tamaño de los fragmentos esperados. En el caso de algunos mutantes aplicamos la técnica de dCAPS, donde el tamaño del fragmento obtenido para el alelo silvestre y el mutante es el mismo, pero la diferencia entre ellos es visible tras el tratamiento con un enzima de restricción. En el anexo II también se muestran los cebadores empleados en esta técnica, así como el enzima empleado y los fragmentos esperados para cada alelo.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron sintetizados por la empresa INVITROGEN (<http://www.invitrogen.com>) con grado de purificación máximo. En el Anexo I se recogen todos los cebadores empleados en esta Tesis.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Esta técnica se utilizó para calcular el enriquecimiento de secuencias obtenido en el experimento de ChIP. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos para cada promotor en las reacciones de PCR cuantitativa fueron diseñados a partir de las regiones promotoras de los diferentes genes donde habíamos identificado la presencia de posibles sitios de unión para FUL mediante el programa Primer Express 2.0 utilizando los parámetros por defecto, que incluye entre otros, T^a m entre 58-60 °C, contenido en GC 30-80 % y amplicones entre 50-150 p.b. En la tabla S-2 se muestran las combinaciones de cebadores utilizados en el experimento de ChIP.

En primer lugar, se realizaron pruebas para cada pareja de cebadores modificando la concentración de éstos (300, 600 ó 900 nM) con el fin de encontrar la combinación más óptima. Al final de cada PCR, se realizó una cinética de T^am (curva de disociación) aplicando un gradiente de temperaturas creciente para analizar la especificidad del producto y la presencia de dímeros de los cebadores. Además, se añadieron en cada experimento controles negativos de la reacción para descartar contaminaciones. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen final de 20µl empleando 10µl de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1.2µl de cada uno de los dos cebadores a una concentración de 5µM para dejarlos a una concentración final 0.3µM y 4µl de DNA final de cada muestra. La mezcla de reacción SYBR[®] Green PCR Master Mix incluye el compuesto fluoróforo SYBR[®] Green I que emite fluorescencia cuando se intercala en las moléculas de DNA de doble cadena y permite por tanto cuantificar la cantidad de producto a lo largo de los ciclos de amplificación, el fluoróforo ROX que permite ajustar las posibles variaciones entre las muestras debidas a errores en el pipeteo, el tampón de la reacción y la enzima AmpliTaq Gold[®] DNA Polimerasa. Para cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas empleando placas *MicroAmp[™] Optical 96-well reaction plate* (Applied Biosystems) y se llevaron a cabo en el aparato *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), se trata de un termociclador con cámara CDD que registra fluorescencia, acoplado al programa informático *7500 System Software* (Applied Biosystems). Se utilizó el programa de amplificación recomendado por la casa comercial para los oligos diseñados con Primer Express (2 min. 50 °C, 10 min. 95 °C, 40 ciclos de 15 s 95 °C, 1 min., 60 °C). La cantidad de DNA se calculó mediante la cuantificación de la fluorescencia en un punto de la fase exponencial de la reacción de amplificación (umbral) asociado a un número de ciclos concreto para cada gen (Ct). A partir del parámetro Ct se calcularon para cada experimento los niveles de DNA relativos de las regiones de interés en las distintas muestras, respecto a un control interno (normalmente utilizamos dos, una región codificante del gen UBQ10 y una región codificante del gen de la ACT). Una vez obtenidos estos valores relativos se normalizaron los resultados obtenidos entre las muestras de partida o IMPUT, y las muestras inmunoprecipitadas o IP. Posteriormente se calculó la relación existente entre el IMPUT y el IP, estableciendo el grado de enriquecimiento según se describe en la siguiente fórmula:

$$\text{Enriquecimiento} = \frac{2^{\Delta Ct_{\text{IMPUT}} - \Delta Ct_{\text{UBQ10 o ACT}}} / 2^{\Delta Ct_{\text{IMPUT control}} - \Delta Ct_{\text{UBQ10 o ACT}}}}{2^{\Delta Ct_{\text{IP}} - \Delta Ct_{\text{UBQ10 o ACT}}} / 2^{\Delta Ct_{\text{IP control}} - \Delta Ct_{\text{UBQ10 o ACT}}}}$$

Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de DNA, se utilizaron geles de agarosa con una concentración del 0.6 al 2% (p/v) en tampón TBE (tris-borato EDTA) a 1x, según se describe en Sambrook *et al.* (1989). La concentración de agarosa en el gel fue inversamente proporcional al tamaño de las moléculas de DNA a separar, es decir, moléculas grandes se separaron mejor en geles con porcentajes bajos de agarosa y viceversa. Además, los geles contenían 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron en sistemas horizontales "Sub-Cell GT" y "Mini-Sub Cell GT" conectados a una fuente de alimentación "PowerPack™ Basic" de "Bio-Rad" (www.bio-rad.com).

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

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, según se describe en el apartado anterior. Los fragmentos de interés se recortaron del gel con ayuda de una cuchilla y el DNA se purificó con el sistema "QIAquick Gel Extraction Kit" de "QIAGEN", siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema permite la purificación de fragmentos de DNA de 70 p.b. a 10 Kb, aunque fragmentos ligeramente más grandes también pueden ser purificados eficientemente. La elución del DNA se llevó a cabo en agua para biología molecular de "Sigma-Aldrich" (www.sigmaaldrich.com).

Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Para cada enzima se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 1.5 ml, con 5-10 unidades de enzima por µg de DNA, durante al menos 2 horas a la temperatura óptima en cada caso. A continuación, se analizó el resultado de las diferentes reacciones mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa

Clonaje de los fragmentos amplificados por PCR en el vector pCR8/TOPO/GW.

Los cDNAs obtenidos mediante PCR se clonaron en el plásmido intermedio pCR8/TOPO/GW, que permitían su posterior secuenciación, y su rápida clonación en otros vectores mediante el sistema de recombinación Gateway. Todos los vectores obtenidos durante esta tesis se muestran en el anexo 2. Los vectores obtenidos se comprobaron por digestión con enzimas de restricción específicos, y posteriormente por secuenciación.

Clonaje de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway

Para la clonación utilizando el sistema Gateway se mezclan en un tubo de 1,5ml entre 50-150ng (1-7µl) del vector que contiene el fragmento de interés, 150ng del vector de destino, 2 µl de la enzima LR Clonase™II (Invitrogen) y tampón TE a pH 8 hasta completar un volumen final de 10 µl. la reacción se incubó durante una hora a 25°C. Transcurrido este tiempo se añadió 1 µl de la solución de proteinasa K y se incubó a 37°C durante 10 min. Todos los vectores obtenidos durante esta tesis se muestran en el anexo 2. Los vectores finales obtenidos se comprobaron por digestión con encimas de restricción específicos.

Secuenciación de DNA y análisis de las secuencias obtenidas.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el “Servicio de Secuenciación de DNA” del “Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas” (UPV-CSIC, Valencia) con el sistema “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” de “Applied Biosystems”. La reacción de secuenciación se realizó en termocicladores “ABI GeneAmp PCR System 9700” y la resolución y análisis de los productos se realizó en un secuenciador capilar “ABI 3100” de “Applied Biosystems”. Las muestras de DNA se prepararon según se indica en www.ibmcp.upv.es.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el programa de análisis de secuencias MacVector (MacVector.com).

Transformación de bacterias.

La preparación de células electrocompetentes para transformación se llevó a cabo según el protocolo descrito en el catálogo “Pulse controller, operation instructions y applications guide, accessory for bacterial y fungal electro-transformation” (Bio-Rad Laboratories, 1992) en el caso de *E. coli*, y según Shen y Forde (Shen y Forde, 1989) en el caso de *A. tumefaciens*.

Para llevar a cabo la transformación de bacterias por electroporación, se descongeló en hielo una alícuota de 40 µl de células competentes a la que se añadió 1 µl de la reacción de ligación o, aproximadamente, 100 ng de DNA en el caso de que se tratara directamente de un plásmido. La mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación, con 0.1 cm de separación entre los electrodos, de “Bio-Rad”, que previamente se había enfriado en hielo. El pulso eléctrico se aplicó con un aparato “GenePulser™” de “Bio-Rad” bajo las siguientes condiciones:

- Para *E. coli*: 200 Ω, 25 µF, 1.8 kV.
- Para *A. tumefaciens*: 400 Ω, 25 µF, 1.8 kV.

Tras el pulso eléctrico, las células se recogieron inmediatamente de la cubeta de electroporación con 1 ml de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 200 rpm para *E. coli*, y durante 3 horas a 28 °C y 200 rpm para *A. tumefaciens*. Finalmente, las células transformadas se sembraron en placas con medio selectivo.

Generación de plantas transgénicas de Arabidopsis.

Transformación genética mediante infiltración al vacío.

Para la generación de plantas transgénicas de Arabidopsis se utilizaron los ecotipos silvestres Col y Ler. La transformación se realizó según el protocolo de infiltración por vacío descrito en Bechtold *et al.* (Bechtold *et al.*, 1993) con algunas modificaciones introducidas en Clough y Bent (Clough y Bent, 1998).

Aproximadamente 60 semillas de Arabidopsis (Col o L.er.) se cultivaron en macetas de 11 cm de diámetro en condiciones de día largo. Unas dos semanas después de la siembra, se eliminaron algunas plantas para facilitar el crecimiento homogéneo de la población. Cuando la altura de las plantas era de unos 10 cm, aproximadamente tras un mes de cultivo, se decapitó el ápice de la inflorescencia principal, induciendo de este modo la proliferación de las inflorescencias de roseta. Tras la decapitación del ápice, las plantas se cultivaron durante 4 días más en día largo antes de la infiltración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tres días antes de la infiltración, se inoculó la cepa de *A. tumefaciens*, en nuestro caso C58 pMP90 con la construcción de interés, en un tubo de 50 ml con 10 ml de LB más rifampicina y kanamicina a las concentraciones indicadas en la M-3. Este precultivo se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28 °C con agitación de 200 rpm. A la mañana siguiente, se inoculó el precultivo en un matraz de 1 l que contenía 600 ml de medio LB con kanamicina. Este cultivo se incubó en las mismas condiciones durante 48 horas. El día de la infiltración se centrifugó el cultivo, a 6000 rpm durante 15 min, y el sedimento obtenido se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2.2 g/l de sales MS, 5% p/v de sacarosa, 1 mg/l de BAP, 100 mg/l MES, pH 5.9) al que se le había añadido detergente “Silwet L.77” (“Lehle Seeds”), a una concentración final de 0.05% (v/v).

Antes de la infiltración, se eliminaron todas las flores abiertas y las silicuas fertilizadas de las plantas. Para llevar a cabo la infiltración, las inflorescencias se sumergieron durante 8 seg en un recipiente con los 200 ml de la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración. Inmediatamente después, se sometió a las plantas a un pulso de vacío de 1 min. A continuación, se secaron ligeramente las plantas con papel absorbente, se cubrieron con bolsas de plástico y se continuaron cultivando en condiciones de día largo. Durante los días siguientes se agujerearon las bolsas de plástico, permitiendo que las plantas se aclimataran gradualmente. Las plantas se cultivaron en el invernadero hasta que se obtuvieron las semillas maduras.

Selección de plantas transgénicas.

Para identificar transformantes primarios (T_1), las semillas procedentes de las plantas transformadas se sembraron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro, unas 3000 semillas por caja, con medio de selección con Basta (15 µg/ml). Tras unos 10 días de cultivo “in vitro”, las plantas resistentes, verdes y con raíces desarrolladas, se trasplantaron a tierra y se cultivaron en el invernadero según las condiciones descritas en el primer apartado de este capítulo. La identificación de transformantes primarios también se llevó a cabo mediante la siembra de las semillas procedentes de las plantas transformadas en macetas. Cuando las plantas iniciaron el desarrollo de las dos primeras hojas reales se rociaron con una solución de Basta al 0,05%. Este tratamiento se repitió a los dos días. Las plantas resistentes se desarrollaron con normalidad mientras que las sensibles se decoloraron y murieron.

Para estimar, en las líneas transgénicas T_1 , el número de “loci” con integración del T-DNA, se sembraron unas 60 semillas T_2 por línea en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de selección con Basta. Tras 12-15 días, se determinó el porcentaje de plantas resistentes al herbicida. Aquellas líneas T_1 cuya progenie T_2 segregaba en una proporción 3:1, aproximadamente 45 plantas resistentes y 15 plantas sensibles por placa, se consideraron como portadoras de la inserción en un único “locus”.

Para obtener líneas homocigotas, se trasplantaron a tierra las plantas T_2 resistentes a la selección con Basta. Estas plantas se cultivaron en el invernadero hasta obtener semillas T_3 . A continuación, se sembraron unas 60 semillas T_3 por línea en cajas de Petri con medio de selección con Basta. Se consideraron homocigotas aquellas líneas T_2 cuyos descendientes T_3 eran 100% resistentes a la selección con kanamicina.

Estudios de expresión

Hibridación *IN SITU*.

Se siguió el protocolo descrito por Cristina Ferrándiz y Allen Sessions en (Pelletier et al., 1997) pag. 195- 203. Este protocolo se utilizó para analizar la expresión de *WUS* y de *AP2* en dos experimentos de hibridación *in situ* distintos.

Generación de ribosondas marcadas con digoxigenina.

Para la obtención de las sondas se partió de los plásmidos pMHwus16 y pHW083 cedidos por R. Simon y H. Wollmann respectivamente. El vector pMHwus16 contenía un fragmento de 550 p.b. del cDNA del gen *WUS* clonado en un plásmido pBS, mientras que el plásmido pHW083 contenía un fragmento de 634 p.b. del extremo 3' del RNAm del gen *AP2* que incluía parte de la 3' UTR, clonado en pCRII. El plásmido pBS y el pCR II poseen los promotores para las polimerasas de RNA de los bacteriófagos SP6 y T7 a cada lado del sitio de clonación múltiple, por lo que se linearizaron los plásmidos pMHwus16 y pHW083 con la enzima BamHI y se utilizó como molde de transcripción *in vitro* para generar las ribosondas antisentido. Se usaron 2 µg de los plásmidos cortados como molde para una reacción de 20 µl (de cada uno) en presencia de digoxigenina-11-dUTP de la mezcla *DIG-RNA labeling mix* (Roche Diagnostics), 40 U de inhibidor de RNasas, 20 U de la polimerasa de RNA T3 (Roche Diagnostics) (coincidió la misma en ambos casos) y 2µl del tampón 10X correspondiente (Roche Diagnostics). La reacción tuvo lugar a 37°C durante 90 minutos. Tras la incubación se añadieron 10 U de DNasal libre de RNasas (Roche Diagnostics) a la mezcla de reacción y se mantuvo 15 minutos a 37°C. Se precipitaron las sondas con tRNA de levadura (1 µg/µl, Roche Diagnostics), acetato amónico 0,6 M y 220 µl de etanol absoluto, y se almacenó a -20°C hasta el momento de cuantificar el rendimiento del marcaje de las sondas. La verificación de la integridad de las sondas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa .

Cuantificación de las sondas.

Se centrifugaron las sondas a 4°C y 13.000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70%, se dejó secar al aire y se resuspendieron en 10 µl de agua tratada con DEPC. Con 1 µl de esta disolución (de cada una de las sondas) se prepararon las diluciones empleadas en la cuantificación (1/20, 1/250, 1/1.000 y 1/2.500). Se aplicó 1 µl de cada una de las diluciones anteriores a una membrana de nailon (*dot blot*) que, tras secarse, se irradió con luz UV. El revelado de esta membrana se realizó junto con una tira control con distintas concentraciones de RNA marcado con digoxigenina (*RNA Scripts Test*, Roche Diagnostics; Fig. M-1). Se mojaron las tiras en TBS 1X (stock preparado a concentración 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 4 M; pH 7,5) durante 2 minutos, y a continuación se incubaron 10 minutos en TBS 1X con agente bloqueante 0.5% (m/v, Roche Diagnostics). Se incubaron durante 15 minutos en TBS 1X con el anticuerpo anti-DIG-ab (1/3.000, Roche Diagnostics), y se lavaron 1 minuto en tampón de detección 1X sin sustratos (stock preparado 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 1 M; MgCl₂ 0.5 M; pH 9.5). Por último, se reveló incubando con tampón de detección 1X con sustrato [150 µl de NBT (100 mg/ml) y 150 µl de BCIP (50 mg/ml) por cada 100 ml de tampón; Roche Diagnostics] durante el tiempo suficiente para que se viera el último punto de la tira control. La concentración de sonda a utilizar en cada caso fue la que más se aproximó al penúltimo punto de la tira.

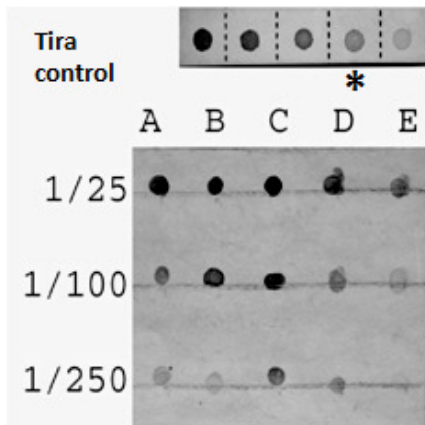


Fig. M-1: Cuantificación simultánea de varias ribosondas (A-E). En la parte superior aparece una tira control que contiene cantidades estandarizadas de RNA marcado con digoxigenina. La concentración de sonda cuya mancha se aproxime al penúltimo punto de la tira (asterisco) es, en principio, la más adecuada.

Prehibridación e hibridación.

Se obtuvieron cortes histológicos de las muestras vegetales a analizar previamente incluidas en parafina (ver apartado inclusión en parafina). A continuación se procedió como se describe en Ferrándiz y Sessions (2002). El tejido se desparafinó en los portas con histoclear, y a continuación se rehidrató en series de etanol a concentraciones decrecientes de 2 minutos cada una. Se llevó a cabo la hidrólisis de las proteínas mediante un tratamiento de 20 minutos en HCl 0.2 M, y posteriormente se sometió el tejido a una incubación con proteinasa K (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante 30 minutos a 37°C. Los portas se lavaron durante 2 minutos con PBS 1X (stock preparado a concentración 20X: NaCl 2.75 M; KCl 50 mM; Na₂HPO₄ 200 mM; KH₂PO₄ 35 mM; pH 7.4) y se bloqueó la acción de la proteinasa K incubando 2 minutos en 1X PBS con glicina (0.2% m/v). Tras dos lavados con PBS 1X de 2 minutos cada uno, se refijó el tejido con una solución de PBS 1X y formaldehído (3.7% v/v) a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de dos pasos de 5 minutos con PBS 1X. Se prosiguió con la deshidratación del tejido en series crecientes de etanol de 2 minutos cada paso hasta llegar al etanol absoluto. Tras secar un poco los portas, se sometieron a vacío durante 20 minutos a una presión de 100 mb. Para la hibridación, se precalentaron los portas con el tejido en una placa calefactora (Barnstead, BI) a 45°C durante unos minutos. Las sondas se diluyeron en tampón de hibridación [SSC 6X (stock preparado 20X: NaCl 3 M; citrato sódico 0.3 M; pH 7.0); SDS 1.5% (m/v); formamida 50% (v/v); tRNA de levadura (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)] hasta la concentración deseada, y se desnaturalizaron a 80°C durante unos minutos. Se aplicaron 300 μl de la solución de hibridación a cada porta con su muestra correspondiente, disponiéndose éstos enfrentados dos a dos. Gracias al sistema *Probe-On-Plus*, al enfrentar los portaobjetos en forma de sándwich con los tejidos hacia el interior, se genera un espacio donde la solución de hibridación contacta con el tejido. Los portas apareados se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche, a 55°C con la sonda de *WUS*, y a 53°C con la sonda de *AP2*.

Inmunodetección colorimétrica de la señal.

Tras realizar dos lavados de 90 minutos en una solución de SSC 2X con formamida (50% v/v), los portas se incubaron en TBS 1X durante 5 minutos, luego 1 hora con solución bloqueante [TBS 1X y agente bloqueante 0.5% (m/v; Roche Diagnostics)], y 30 minutos en TBS 1X, Tritón X-100 (0.3% v/v) y BSA (1% m/v). A continuación, se incubaron 90 minutos en esta última solución con el anticuerpo anti- DIG-ab (dilución 1:3.000). Se realizaron tres lavados de 20 minutos cada uno con la misma solución sin anticuerpo con el fin de eliminar su exceso. Para alcalinizar el medio incubamos con el tampón de detección 1X sin sustratos (stock preparado

10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 1 M; MgCl₂ 0,5 M; pH 9.5) durante 5-10 minutos. Esta solución se reemplazó por el tampón de detección con los sustratos. Por cada 100 ml de solución de detección se añadieron 150 µl de NBT (100 mg/ml) y otros 150 µl de BCIP (50 mg/ml). Se incubó en oscuridad durante un periodo que osciló entre una noche para la detección de *WUS* y varios días para la de *AP2*. La reacción se detuvo reemplazando la solución de detección por agua. En el montaje de los portas se deshidrató el tejido en series de etanol crecientes de forma rápida (2 minutos cada una), tras lo cual se añadió una gota de Eukitt (O. Kindler GmbH & Co) al portaobjetos y se dispuso el cubreobjetos. Las muestras se visualizaron mediante microscopia óptica aplicando la técnica Normasky.

Detección GUS

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado distintos protocolos de Tinción GUS dependiendo del experimento que se estuviera realizando. Para realizar detecciones GUS poco precisas en generaciones F1 y descartar en cruces las plantas que no fueran portadoras del gen delator se utilizó un protocolo GUS rápido: Se incubaron ápices de inflorescencias posiblemente portadoras de construcciones con el gen testigo de la β-glucuronidasa durante la noche a 37°C en placas de 96 o 12 pocillos (Iwaki microplate) en oscuridad en una disolución 13.42mM de NaH₂PO₂ 4, 11.58mM de Na₂HPO₄,, 2mM X-Gluc, 2mM Ferrocianuro potásico, 2mM de ferricianuro potásico y 0.02% de Tritón X-100. Posteriormente las muestras se observaron a la lupa, en algunos casos en los que la señal no se detectara con claridad, las muestras se lavaron en etanol 70%.

Para realizar detecciones GUS más precisas se siguió el protocolo descrito por Kirsten Bomblies en el Manual de Arabidopsis (Pelletier et al., 1997) pág. 243- 245 con algunas modificaciones. Los ápices e inflorescencias de plantas portadoras de construcciones con el gen testigo de la β-glucuronidasa se incubaron en acetona 90% durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se incubaron otros 20 minutos en la misma acetona a temperatura ambiente. A continuación se enjuagaron con solución de revelado sin X-Gluc (tampón fosfato sódico 25 mM pH 7; ferricianuro potásico 10 mM; ferrocianuro potásico 10 mM; Tritón-X100 0,25 mM) y por último se incubaron en solución de revelado con sustrato (X-Gluc 2 mM) durante una noche a 37°C y en oscuridad. Las concentraciones elevadas de ferrocianuro y ferricianuro (ej. 10mM) restringen el nivel de señal GUS, mientras que concentraciones más bajas permiten detectar señal GUS más débil (Sessions et al., 1999). Las detecciones realizadas durante este se llevaron a cabo en condiciones restrictivas. Posteriormente se realizaron series de etanol 20%, 35% y 50% 30 minutos cada una y por último se incubaron 30 minutos en FAA (50% etanol, 10% ácido acético glacial, 5% formaldehído, distinto al utilizado en la Hibridación *in situ*) y se pasaron a 70% etanol.

Las muestras se observaron y fotografiaron mediante una lupa binocular equipada con una cámara digital o mediante un microscopio óptico, previo aclarado del tejido con hidrato de cloral (próximo apartado).

Por otra parte, algunas muestras (SAM de plantas *WUS::GUS*) se incluyeron en parafina para la obtención de cortes histológicos (12µm). Se siguió el protocolo descrito para el protocolo de *in situ* con modificaciones para evitar la pérdida del GUS: La muestras en etanol 70% se dejaron sólo 30 minutos, posteriormente se deshidrataron en series de etanol: etanol 95% una hora y

MATERIALES Y MÉTODOS

etanol 100% una hora (este paso último se repitió dos veces). Posteriormente se realizó la imbibición de las muestras:

50%Etanol/50% HistoClear durante 10 minutos tres veces.

100% HistoClear 15 minutos 3 veces.

100% HistoClear 30 minutos.

50% HistoClear/50% parafina 3 horas

100% parafina toda la noche.

El día siguiente se hicieron tres cambios de parafina, el segundo día se hicieron dos cambios de parafina por la mañana y por la tarde se montaron los bloques.

Para desparafinar: 3 minutos en HistoClear dos veces.

Se montaron con ENTELLAN.

Aclarado con Hidrato de cloral

Se utilizó el protocolo de Sioux Christensen propuesto en (Pelletier et al., 1997) pág.104-105. Mediante este protocolo, se aclaran los tejidos vegetales, que se vuelven transparentes, permitiendo analizar la señal GUS mediante el uso de un microscopio. Es importante realizar todo el proceso en una campana de extracción de gases ya que el hidrato de cloral es tóxico. Una vez las muestras han sido fijadas, se han incubado con el tampón de detección y deshidratado hasta etanol al 70% (apartado anterior), se quitó el etanol al 70% y se reemplazó con una disolución de hidrato de cloral: Hidrato de cloral/ glicerol/ agua (8g/1ml/2ml). Se mantuvo en esta disolución al menos una noche (mejor dos o tres). Posteriormente se montaron las muestras sobre portaobjetos. Las muestras se colocaron sobre el portaobjetos al que previamente se le había añadido (normalmente un mínimo de 200 µl) disolución de hidrato de cloral. Para evitar que las muestras se aplastaran con el cubreobjetos se colocó en los extremos del portaobjetos unas pegatinas pequeñas (preferiblemente transparentes para que no destiñan con el hidrato de cloral) de forma que quedara espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Antes de analizar en el microscopio las muestras, es muy importante sellar (con laca de uñas transparente, por ejemplo) los portaobjetos ya que la disolución de hidrato de cloral puede dañar las lentes del microscopio. Las muestras fueron observadas con iluminación de campo claro, utilizando la técnica Normasky que permite detectar cierto volumen en las muestras.

Expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

La expresión transitoria se utilizó para llevar a cabo los ensayos de BiFC.

Ensayo BiFC.

Con el ensayo de BiFC nuestro objetivo es comprobar si dos proteínas de interés interaccionaban. Para ello, se utilizaron dos plásmidos de Gateway los cuales poseían cada uno de ellos una mitad de la proteína YFP, de ahí sus nombres YFC (contiene la mitad C-terminal de la proteína) e YFN (contiene la mitad N-terminal de la proteína) y un nexo de unión flexible entre el gen de la YFP y el gen de interés que permitiría la movilidad de la proteína de fusión.

Para más información sobre estos vectores se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>. Como controles positivos se utilizaron los plásmidos YFP^N-IN α e YFP^C-IN β , los cuales poseían una mitad de la proteína ubiquitina (estos plásmidos fueron facilitados por el Dr. Alejandro Ferrando).

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

Al día siguiente, se transfirió el cultivo a 50ml de medio de inducción con los correspondientes antibióticos en un matraz de 250ml y se creció o/n a 28°C. Se centrifugaron los cultivos durante 30min a 3000rpm. El sedimento se resuspendió en medio de infiltración y se ajustó la absorbancia a 1.0 (medida a una longitud de onda de 600nm). A continuación, los cultivos se incubaron con agitación suave (30rpm) o/n a temperatura ambiente.

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

Medios de cultivo:

Medio YEB: 0.5% Extracto de hueso, 0.1% Extracto de levadura, 0.5% Peptona, 0.5% Sacarosa, pH 7.4, tras ser autoclavado se le añade 2mM MgSO₄ *.

Medio de inducción: 0.5% Extracto de hueso, 0.1% Extracto de levadura, 0.5% Peptona, 0.5% Sacarosa, 10mM MES pH 5.6, Y tras ser autoclavado se le añade: 2mM MgSO₄ *. 20 μ M acetosiringona *.

Medio de infiltración: 10mM MgCl₂*, 10mM MES pH 5.6 (autoclavado), 200 μ M acetosiringona *.

*Esterilizados por filtración.

Biología celular/Análisis fenotípico. Técnicas de histología vegetal.

Observación y fotografía a bajo aumento.

Para obtener imágenes a bajo aumento de los distintos rasgos fenotípicos se utilizó una cámara digital CoolPix 5000 (Nikon). Para la obtención de imágenes a mayor aumento, nos servimos de las lupas binoculares Leica modelo SMZ800 y provistas de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Volpi Intralux 4000-1) y conectadas a una cámara digital CoolPix 5000 (Nikon) y también se utilizó el sistema de Nikon Digital Sight (DS-Fi1) en el que las fotos se capturan directamente en una pantalla digital acoplada a la cámara.

Microscopia óptica.

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

Microscopia electrónica de barrido.

Las muestras recolectadas para ser observadas con SEM requerían una manipulación previa que dejara al descubierto las partes de la planta que pretendíamos (normalmente el SAM), por lo que se decidió aplicar la técnica del punto crítico, que nos permite preservar la estructura de la muestra de forma prolongada a la vez que su manipulación. Con este propósito, se llevó a cabo la fijación del material vegetal en FAE (etanol 50%; ácido acético glacial 5%; formaldehído 3.7%), inmediatamente después de su recolección. Posteriormente, fue sometido a un pulso de vacío de 20min o en su defecto, hasta que las muestras cayeron al fondo del vial. El material se mantuvo en FAE toda la noche a cuatro grados y al día siguiente se sustituyó por etanol al 70%. En este punto las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente a 4°C hasta el momento en que vayan a ser analizadas al microscopio. Al día siguiente, se incubaron las muestras durante 30min en etanol al 80%, 30min en etanol al 90% y finalmente una hora en etanol absoluto, este último paso se repitió al menos 3 veces, la última vez antes de someterlas al punto crítico. El punto crítico, consiste en la sustitución del etanol de la muestra por CO₂ y su posterior sublimación, y se llevo a cabo en un aparato Polaron E300. Las muestras se montaron en portaobjetos con cinta adhesiva de carbono activado sobre los que fueron orientadas y diseccionadas convenientemente. Después del montaje, las muestras fueron recubiertas con un sombreado de partículas de oro-paladio de 200 nm, en atmósfera de argón ionizado en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC). Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma ISIS (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200 s por imagen, en un microscopio electrónico JEOL, modelo JSM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de entre 10-15 kV y una distancia de trabajo de 25 mm en el servicio de microscopia de la Universidad Politécnica de Valencia.

Microscopía confocal.

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

Histología.

Inclusión de muestras en parafina.

Las muestras se fijaron en FAA al vacío (400 mm Hg) durante 20 minutos. Posteriormente, se cambió el fijador por otro fresco y se mantuvo a temperatura ambiente una hora. A continuación se deshidrataron en series de etanol en concentraciones crecientes (70%, y 95%) de 30 minutos cada una tiñendo finalmente el tejido en Eosina-Y al 0.2% en etanol (95%) a 4°C durante la noche. Posteriormente se incubaron las muestras en etanol 100% durante 2 horas (se repitió el proceso dos veces). A continuación se realizaron series de 2 horas en concentraciones crecientes de HistoClear (25%, 50%, 75% y dos al 100%; National Diagnostics), compuesto básicamente de limoneno, en etanol. Se añadió entonces un volumen igual de parafina Paraplast-Plus (Sherwood Medical) fundida a 58°C y se incubó durante más de 8 horas a esa temperatura. A continuación se sustituyó la mezcla por parafina 100%, realizando cambios con parafina nueva cada 3 horas hasta la total eliminación del HistoClear. Debe evitarse que el proceso de imbibición dure más de 3 o 4 días. Por último las muestras se dispusieron en la orientación deseada en moldes de aluminio (Selecta) con parafina líquida, montando encima un soporte de plástico, y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Obtención de cortes histológicos.

Se utilizó un microtomo Microm HM330 para la obtención de cortes histológicos. Sobre las muestras incluidas en parafina, los cortes se realizaron a 8 µm (12 µm en el caso de los guses) con cuchillas Accu-Edge (Bakura) y se extendieron en un baño con agua destilada a 42°C antes de colocarlos en el portaobjetos. Las secciones se desparafinaron con HistoClear (National Diagnostics) y se visualizaron al microscopio óptico.

Análisis de expresión génica mediante micromatrices

Extracción de RNA total

El protocolo de extracción de RNA empleado se describe en el apartado Extracción y purificación de RNA total para micromatrices

Amplificación del RNA

El RNA extraído se amplificó mediante el sistema MessageAmp™ II RNAA Kit (Ambion Inc., Austin, TX, EEUU), incluyendo para la retrotranscripción en la mezcla de ribonucleótidos el ribonucleótido modificado aminoalil-UTP al que se pueden acoplar los fluorocromos Cy3 o Cy5.

Acoplamiento del cebador T7 oligo-dT

El oligonucleótido T7 Oligo-dT se une a las colas poliA de los RNAm y sirve como cebador para retrotranscribir la población de mensajeros generando una copia de ADNc. Además este oligonucleótido contiene la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7 que permite transcribir *in vitro* el ADNc obteniéndose el RNA amplificado. Para cada reacción de amplificación se empleó 1 µg de RNA total, original de cada muestra biológica, en 5.5 µL de H₂O a los que se añadieron 0.5 µL de cebador T7 Oligo-dT. La mezcla se incubó 10 min a 70°C en un termociclador Perkin Elmer Cetus DNA thermal cycler para el acoplamiento de los oligonucleótidos al RNAm. A continuación se dejó enfriar en hielo.

Transcripción reversa. Síntesis de ADNc

Se añadió a cada muestra 1 μL de tampón “10x First Strand Buffer”, 0.5 μL del inhibidor de ribonucleasas Ribonuclease Inhibitor, 2 μL de la mezcla de desoxirribonucleótidos “dNTP mix” y 0.5 μL de la enzima retrotranscriptasa “Array Script™”. La reacción se incubó durante 2 h a 42°C en un termociclador Perkin Elmer Cetus.

Síntesis de la segunda hebra de ADNc

A cada muestra se añadieron 31.5 μL de H₂O, 5 μL de tampón “10x Second Strand Buffer”, 2 μL de la mezcla de desoxirribonucleótidos “dNTP Mix”, 1 μL de la enzima “DNA Polymerase” y 0.5 μL de la ribonuclease “RNase H”. La reacción se incubó durante 2 h a 16°C en un termociclador Perkin Elmer Cetus.

Purificación del ADNc

El ADNc sintetizado se purificó mediante el sistema DNA Clear (Ambion Inc., Austin, TX, EEUU). Cada muestra se purificó en una columna “cDNA Filter Cartidge” previamente equilibrada durante 5 min con el tampón “cDNA Binding Buffer”. A cada muestra se añadieron 50 μL de H₂O libre de ribonucleasas para llevar el volumen hasta 100 μL , se añadieron 250 μL del tampón “cDNA Binding Buffer” y se pasó por una columna “cDNA Filter Cartidge” previamente equilibrada durante 5 min con tampón “cDNA Binding Buffer”, centrifugando 1 min a 10,000 rpm y desechando el eluido. Se añadieron a la columna 500 μL del tampón de lavado “cDNA Wash Buffer”, se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min y se desechó el eluido. Con el fin de eliminar restos de tampón y etanol de la columna se realizó una centrifugación extra sin añadir tampón de lavado. Para eluir el ADNc purificado la columna se transfirió a un tubo de elución, depositando sobre la membrana de la columna 10 μL de H₂O libre de ribonucleasas previamente calentada a 50°C. La columna se incubó 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min a 10,000 rpm. Se hizo una segunda elución con otros 10 μL de H₂O, juntando ambos eluidos.

Obtención de RNA amplificado mediante transcripción *in vitro*

Se redujo el volumen del ADNc secando hasta 7 μL en un sistema “Speed Vacuum”. Para la transcripción *in vitro* se añadió a cada reacción 9 μL de la mezcla de ribonucleótidos (16.7 mM de ATP, CTP y GTP 8.3 mM de UTP y 8.3 mM de aminoalilo-UTP (5-(3-aminoalil)-UTP. Ambion Inc., Austin, TX, EEUU), 2 μL del tampón “10X T7 Reaction Buffer” y 2 μL de la enzima RNA polimerasa “T7 Enzyme Mix”. La reacción se incubó en horno de hibridación a 37°C durante 16 h.

Purificación del aminoalil-RNA amplificado

Para purificar el RNA amplificado se empleó el sistema Mega Clear (Ambion Inc., Austin, TX, EEUU). A cada reacción de amplificación se añadieron 60 μL de “Elution Solution”, 20 μL de H₂O libre de ribonucleasas, 350 μL del tampón “RNAA Binding Buffer” y 250 μL de 96% etanol y, tras mezclar suavemente, se introdujo en la columna “RNAA Filter Cartidge”. Se centrifugó la columna durante 1 min a 10,000 rpm y se desechó el eluido. Se añadieron 500 μL del tampón de lavado “RNAA Wash Buffer” y se centrifugó durante 1 min a 10,000 rpm y se desechó el eluido. Se repitió otro lavado con “RNAA Wash Buffer” y se realizó finalmente una centrifugación extra con el fin de eliminar restos de tampón y etanol de la columna. El RNA amplificado purificado se eluyó 2 veces con 10 μL de H₂O libre de ribonucleasas previamente

calentada a 65°C, incubando 5 min a 65°C previamente a centrifugar 1 min a 10,000 rpm, juntando las 2 eluciones. El aminoalil-RNA amplificado se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

Marcaje fluorescente del RNA amplificado

Se utilizaron 7.5 µg de aminoalil-RNA amplificado de cada una de las muestras. Como marcador se emplearon los fluoróforos Cy3 y Cy5 (CyTMDye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham/GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido). Los fluorocromos, en medio básico, se unen a los grupos amino de los aminoalilos del aminoalil-UTP presente en el RNA amplificado. Se resuspendió el contenido de cada vial de fluoróforo en 16 µL de DMSO de los cuales se emplearon 4µL para marcar cada muestra. El aminoalil-RNA amplificado se secó mediante "Speed Vacuum" y se resuspendió en 20 µL de 0.1M Na₂CO₃ pH 9.0. Se añadió 4 µL del fluoróforo correspondiente y se incubó 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación se neutralizó el medio añadiendo 35 µL de 100 mM acetato sódico pH 5.2.

Purificación del Cy dye-aminoalil-RNA amplificado

Se añadió a cada reacción de marcaje 45 µL de H₂O libre de ribonucleasas y se procedió a purificar el Cy-dye-aminoalil-RNA amplificado mediante el sistema MegaClear (Ambion) (ver apartado anterior). El rendimiento del marcaje fue cuantificado determinando la cantidad de RNA obtenido y el número de picomoles de cada fluoróforo en el NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, pudiendo así calcular la actividad específica de cada marcaje (picomoles Cy por µg de RNA).

Hibridación de Cy-dye-aminoalil-RNA amplificado con micromatrices de DNA de oligonucleótidos largos

Se emplearon micromatrices de ADN generadas en la Universidad de Arizona (<http://ag.arizona.edu/microarray/>), en las que se hallaban depositados oligonucleótidos largos (60-70 nucleótidos) del conjunto de Qiagen-Operon Arabidopsis Genome Array Ready Oligo Set (AROS) Version 3.0. Este conjunto de oligos representa una gran mayoría de los RNAs de *Arabidopsis*, ya que las 26,113 sondas depositadas en la micromatriz corresponden a 24,068 genes (sin redundancia). Para el marcaje del RNA se empleó un método fluorescente de 2 colores que consiste en hibridar sobre la micromatriz RNA procedente de 2 poblaciones, cada una marcada con un fluoróforo que emita a una longitud de onda diferente. De este modo, comparando la intensidad de fluorescencia en cada longitud de onda para cada oligonucleótido de la micromatriz, se puede inferir la diferencia entre los niveles de expresión que existe entre las dos poblaciones para el transcrito concreto que representa dicho oligonucleótido. Los fluoróforos empleados fueron Cy5 que presenta una longitud de onda óptima de emisión a 635 nm y Cy3 cuya longitud de onda óptima de emisión se es de 532 nm. La referencia (plantas silvestres) se marcó con uno de los fluoróforos y cada una de las muestras por separado (*ful* y FUL:VP16) con el fluoróforo contrario.

Preparación de los cristales

El ADN de las micromatrices se rehidrató exponiendo los cristales, 3 veces, durante 10 seg, al vapor procedente de agua a 60°C. Una vez hidratada la micromatriz, se entrecruzó el ADN al cristal sometándolo a 65 mJ de irradiación ultravioleta en el horno de entrecruzamiento UV Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla CA, EEUU). Tras esto, se lavaron los cristales 2 veces en

0.1% SDS y 4 veces en H₂O, realizándose cada lavado durante 2 min y en agitación. Se hizo un último lavado durante 30 segundos en 96% de etanol y se secaron los cristales centrifugando a 2,000 rpm durante 1 min.

Prehibridación

Se cubrió la zona del cristal donde está impreso el ADN con un cubre LifterSlip (Eries Scientific Company, Portsmouth, EEUU) y se pipeteó bajo el cubre la mezcla de prehibridación (6% de SSC, 1% de BSA y 0.5% de SDS). Se prehibridó el cristal en una cámara de hibridación (Arrayit Hybridization Cassette, TeleChem), incubando en un baño de agua durante 30-45 min a 42°C.

Tras la prehibridación, los cristales se sacaron de la cámara de hibridación y se sometieron a 5 lavados de 30 segundos cada uno en H₂O desionizada, secándose a continuación por centrifugación 1 min a 2000 rpm. Tras esto, se procedió inmediatamente a la hibridación de los cristales.

Preparación de la mezcla de marcaje para la hibridación

Se equilibraron las cantidades de fluorescencia de las dos poblaciones de RNA amplificado marcado que se iban a hibridar en cada micromatriz (220-300 picomoles de fluoróforo), siempre que las actividades específicas estuvieran en el mismo rango, evitando así utilizar poblaciones de RNA dispares en cuanto a la eficiencia del marcaje.

Se mezclaron los 230-300 pmoles de cada una de las 2 poblaciones a hibridar en una misma micromatriz, una marcada con el fluoróforo Cy3 y la otra con Cy5. Se redujo el volumen hasta 7 µL secando en "Speed Vacuum". Se añadió 1µg de RNAt de levadura (Ambion) y 1 µg de polyA (Roche), ambos preparados a 1 µg/µL, y se procedió al fragmentado de los RNAs con el sistema Fragmentation Reagents (Ambion Inc.) en un volumen total de 10 µL, añadiendo 1 µL de "10x Fragmentation Reagent". El RNA amplificado se fragmentó incubando a 70°C durante 15 min, tras lo cual se detuvo la reacción añadiendo 1 µL de "Stop Solution".

Previamente a la hibridación, a cada mezcla fragmentada se añadió tampón de hibridación hasta un volumen de 100 µL, de modo que la mezcla quedó en una solución con 50% de formamida desionizada (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.E. U.U.), 6x SSC (Molecular Sigma® Biology SSC buffer 20x, Sigma-Aldrich, Irving, Reino Unido) 5x de solución Dendhardt's (Sigma-Aldrich St. Louis E.E. U.U.) y 0.5% de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Solution, 10%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). La mezcla en tampón de hibridación fue desnaturalizada incubando durante 5 min a 95°C y usada inmediatamente en la hibridación.

Hibridación de las micromatrices

Se aplicó la mezcla marcada recién desnaturalizada a la micromatriz ya prehibridada pipeteando bajo un nuevo cubre LifterSlip. Se realizó la hibridación encerrando los cristales dentro de cámaras de hibridación que se introducían en un baño de agua donde se incubaron a 37°C durante 16h.

Lavado de los cristales

Una vez completadas las 16 h de hibridación, se procedió al lavado de los cristales para eliminar restos de mezcla marcada no hibridada y de solución de hibridación. Se realizaron lavados en SSC en orden creciente de astringencia del siguiente modo: 5 min con 1x SSC, 0.1%

SDS a 30°C; 5 min con 0.2x SSC, 0.1% SDS a 30°C; 2 min con 0.1x SSC a 28°C; 1 min con 0.1x SSC a 28°C; lavado final de 10 segundos con 0.01x SSC a temperatura ambiente. A continuación se secaron los cristales centrifugando durante 1 min a 2,000 rpm.

Escaneado de los cristales

Las imágenes de las micromatrices hibridadas se obtuvieron escaneando en el escáner Genepix 4000B (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale CA, EEUU) y mediante el uso de la aplicación informática GenePix 4.0 (Axon Instruments). Las imágenes se escanearon a 635 y a 532 nm. Se ajustó la ganancia del fotomultiplicador (PMT) en cada canal para obtener aproximadamente un 0.05 -0.1% de sondas alcanzando la saturación de señal y de modo que el cociente entre la señal media de cada canal (para cada fluoróforo) en la superficie escaneada se ajustase a 1.

Análisis de datos de las micromatrices

Análisis individual de las micromatrices

Para el análisis de las imágenes se empleó de nuevo la aplicación informática GenePix Pro 4.0 (Axon Instruments). Se eliminaron las sondas de baja calidad por presentar forma irregular, por situarse en una zona manchada, por su heterogeneidad, etc. Una vez identificadas las sondas no válidas, se calculó mediante la aplicación informática una serie de parámetros indicativos de la calidad de la micromatriz. De entre estos parámetros, se tomaron los valores de la mediana de la intensidad del fondo en cada canal para la aplicación de un filtro de intensidad mínima que debía superar una sonda para ser considerada en subsiguientes análisis. En concreto se seleccionaron como válidas las sondas en las que la mediana de sus intensidades fuese, al menos, dos veces mayor del valor medio de intensidad del fondo para ambos canales. A continuación, se realizó una normalización lineal de los datos, utilizando para el cálculo de las constantes de normalización el cociente de las señales medias de intensidad de cada canal para las sondas consideradas válidas, eliminando además el 5% de sondas con mayor y menor señal de hibridación. La normalización lineal multiplica el valor del ratio (cociente entre las intensidades de los 2 canales) por un factor constante que ajusta la media de los ratios para todas las sondas hasta un valor de 1, que es lo que cabe esperar que resulte en un análisis de expresión global. Una vez realizados estos ajustes se volvieron a calcular los parámetros de control de calidad y se comprobó si la micromatriz era adecuada para continuar con su análisis. Estos fueron, que al menos un 55% de las sondas fuesen válidas, y que el valor medio del fondo para alguno de los canales no superase las 250 unidades de fluorescencia.

Además de la normalización lineal, con el uso de la aplicación informática Acuity® 4.0 (Axon Instruments/Molecular Devices) se sometió a cada micromatriz a una segunda normalización no lineal, de Lowess (Wilmouth et al., 2002) que busca corregir efectos técnicos diferenciadores dependientes de intensidad. Así, al representar en escala logarítmica los cocientes de señal frente a las intensidades totales (plot M/A), tras la normalización lineal, la distribución queda centrada en torno a 0. Sin embargo, con la normalización de Lowess se persigue además que esta distribución sea simétrica en todos los intervalos a ambos lados del centro de la distribución en $\log_2(635/532) = 0$, independientemente del valor de intensidad total. En cualquier caso, las normalizaciones aplicadas no produjeron correcciones excesivas en los datos, indicando la fiabilidad y buena calidad de los mismos.

Generación de conjuntos de datos

Para el análisis de conjuntos de datos a partir de las micromatrices así como para el análisis de agrupamiento se utilizó el programa Acuity® 4.0 (Axon Instruments/Molecular Devices). Previamente a la construcción de los conjuntos de datos se aplicó un nuevo filtro de intensidad con el fin de evitar cocientes con valores artefactuales debido a bajas intensidades de fluorescencia en alguno de los 2 canales. Así, por una parte, se descartaron sondas en los que la diferencia entre la mediana de su señal y su fondo local fuese menor a 100 en alguno de los 2 canales. También se eliminaron las sondas que presentasen una diferencia entre la mediana de su señal y su fondo local menor a 200 en ambos canales. Se aplicó también un filtro que da por válidas aquellas sondas que superan los criterios de calidad anteriormente citados en un mínimo del 70% de las micromatrices utilizadas.

Análisis de significatividad estadística de los datos

Se empleó una serie de análisis estadísticos basados en test tipo T de student para una muestra mediante la aplicación informática Acuity® 4.0 (Axon Instruments/Molecular Devices) a cada grupo de micromatrices, para encontrar diferencias entre cada alelo de FUL y el silvestre, y entre los dos grupos de micromatrices, para encontrar diferencias entre los alelos.

Sobre los datos filtrados estadísticamente se procedió a promediar las 3 réplicas

Una vez se tuvieron los cambios en los niveles de los transcritos, se realizó un cribado final de los datos, aplicando un filtro de magnitud mínima de cambio. Así se eliminaron todas las sondas que, a pesar de haber sido identificados como diferenciales según los análisis estadísticos, no presentasen al menos un cambio de 2 veces de inducción o represión respecto al silvestre o entre los alelos de FUL. Se consideraron como genes con expresión diferencial en el proceso estudiado los que superaron todos los cribados descritos.

Análisis de agrupamiento y PCA

Los genes se agruparon en función de sus perfiles de expresión, en posibles dianas directas e indirectas de FUL. Para el análisis de la distribución de la variabilidad se realizó un 'Principal Component Analysis' (PCA) mediante la aplicación informática Acuity® 4.0 (Axon Instruments/Molecular Devices), utilizando 3 componentes principales.

Análisis de enriquecimiento de categorías de ontología génica

Se realizó mediante la aplicación EasyGO (Zhou y Su, 2007). Esta aplicación compara dos listas de genes, las convierte en listas de categorías de GO (Ashburner et al., 2000) mediante la correspondiente tabla de asociación gen-categoría de GO. Las 2 listas de GOs son comparadas, de modo que se busca sobre-representación significativa en una respecto a la otra, mediante el test de Fisher. Además, aplica corrección de test múltiples por las múltiples hipótesis testadas (los diferentes términos de GO).

ANEXO I

Cebadores utilizados para clonar CDS a partir de cDNA

Nombre	Secuencia5'-3'	Sentido	Posición	Gen	Incluye sitio de restricción
oVB1	GTCGACATGGGAAGAGGTAGGGTT	foward	ATG	FUL	Sall
oVB2	GGATCCTACCTCGTTCGTAGTGGTAGGACG	revers	STOP	FUL	BamHI
oVB3	GTCGACACGGCGTACCAATCGGAGCTAG	foward	ATG	AG	Sall
oVB4	GGATCCTTACACTAACTGGAGAGCGG	revers	STOP	AG	BamHI
oVB5	ATGGTGAGGGGCAAACCTCAGATGAAG	foward	ATG	SOC1	-
oVB6	TCACTTCTTGAAGAACAAGGTAACCCAATG	revers	STOP	SOC1	-
oVB7	ATGGCGAGAGAAAAGATTCAG	foward	ATG	SVP	-
oVB8	CTAACCACCATACGGTAAGCC	revers	STOP	SVP	-
oVB9	GTCGACATGTGGGATCTAAACGACGCA	foward	ATG	AP2	Sall
oVB10	GGATCCTCAAGAAGGTCTCATGAGAGG	revers	STOP	AP2	BamHI

Cebadores utilizados para secuenciar las CDS clonadas

Nombre	Secuencia5'-3'	Sentido	Posición	Diana
GW1	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC	foward	extremo AttL1	pCR8/TOPO/GW
GW2	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA	revers	extremo AttL2	pCR8/TOPO/GW

Cebadores utilizados para secuenciar la región genómica de AP2

Nombre	Secuencia5'-3'	Sentido	Posición respecto ATG del gen	
AP2 F1	TTCGTAGAAGCAATCTATCAA	foward	-225 a -205	AP2
AP2 R1	TGATGACATTTTCAACACCA	revers	598 a 518	AP2
AP2 F2	TGTGGGAAACAAGTTACTTA	foward	541 a 561	AP2
AP2 R2	TGCCGTTACATTTGATTGCAG	revers	1357 a 1377	AP2
AP2 F3	TCTCGTACTAATTGATTTTC	foward	1300 a 1320	AP2
AP2 R3	AAACTTATCCAATTTCCATA	revers	2359 a 2379	AP2

Cebadores empleados en los genotipados

Nombre	Secuencia5'-3'	Sentido	Posición respecto ATG del gen	
AG1FOR	GGA CAA TTC TAA CAC CGG ATC	foward	3269 a 3289	AG
AG1BACK	CTA TCG TCT CAC CCA TCA AAA GC	revers	3563 a 3585	AG
AP2 F3	TCTCGTACTAATTGATTTTC	foward	1300 a 1320	AP2
AP2 R3	AAACTTATCCAATTTCCATA	revers	2359 a 2379	AP2
RP-AP2	GATTTGACACTGCTCATGCAG	foward	652 a 672	AP2
LP-AP2	TGGTTTGAATTGGGAGTATGG	revers	1802 a 1822	AP2
LBb1-3 (ap2-12)	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	revers	T-DNA	-
ful-2F	CAAATGTTACACATTATAACATGTGAA	foward	987 a 1013	FUL
ful-2R	GCCTTGAGCTTAGCATGTTCTAGGGCC	revers	1251 a 1277	FUL
SOC1-2 1	GATATGGTGAGGGGCAAACCTC	foward	-3 a 19	SOC1
SOC1-2 2	CTGAAACATCTGATCAAAAGCTG	revers	925 a 947	SOC1
SOC1-2 3 T-DNA	TTGGGTTACGCTAGTGGCCATCG	revers	T-DNA	-
RP SVP-32	TCAGCGAACTTCAGAAAAAGG	foward	1842 a 1862	SVP
LP SVP-32	TCATCCATATCTTGCAATGCC	revers	2921 a 2941	SVP
LBb1 (svp-32)	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	foward	T-DNA	-
UJ26	AGATTTGCTGGATTTGATAAGG	foward	867 a 888	FRI
UJ34	ATATTTGATGTGCTCTCC	revers	1058 a 1075	FRI

ANEXO II

Genotipado	Cebadores	T° anillamiento	dCAPS		
			Enzima	mutante	silvestre
ag-1	AG1FOR AG1BACK	55°	HindIII	297 + 20 pb	317 pb
ap2-102	AP2 F3 AP2 R3	55°	-	737 + 343 pb	1081 pb
ap2-12	LP-AP2 RP-AP2 LBb1-3	58°	-	700	1171
ful-2	ful-2 f ful-2 r	56°	ApaI	291 pb	263 + 28 pb
FRI	UJ26 UJ34	51°	-	209 pb	226 pb
soc1-2	soc1-2 1 soc1-2 2 soc1-2 T-DNA	58°	-	600 pb	900 pb
svp-32	LP-SVP-32 RP-SVP-32 LBb1	59°	-	800 pb	1000 pb
wus-1	wus1A wus1S	55°	RsaI	246 + 93 pb	246 + 65+ 28 pb
spt-11					
sup-2					
pi-1	Las combinaciones génicas entre estos mutantes y <i>ful</i> o FUL::VP16 presentaron fenotipos muy evidentes y característicos, por lo que se seleccionaron analizando la segregación en la F2, e identificando los fenotipos correspondientes.				
crc-1					
clv3-2					
knu-1					
fil					

Abreviaturas:

%: por ciento

°C: grados centígrados

μF: microfaradios

μg: microgramos

μl: microlitros

μM: micromolar

Ω: ohmios

A: adenina

Arabidopsis: *Arabidopsis thaliana*

Basta: glufosinato de amonio

BiFC:

C: citosina

CaMV 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor

cDNA: DNA complementario

ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina (“Chromatine InmunoPrecipitation”)

ChIP-ChIP: ChIP acoplado a un experimento con micromatrices de DNA

ChIP-seq.: ChIP acoplado a un proceso de secuenciación masiva

cm: centímetros

Col: ecotipo Columbia

C-terminal: carboxilo terminal

DC: día corto

DEPC: dietilpirocarbonato

DL: día largo

DMF: N,N-dimetilformamida

DMSO.: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNasa: desoxirribonucleasa

dNTP: desoxinucleósidos trifosfato

DIG: digoxigenina

DO: densidad óptica

Ed. o ed.: edición

Eds. o eds: editores

EDTA: etilen-diamino-tetraacetato sódico

EMS: etilmetanosulfonato

et al.: y otros

Fig.: figura

g: gramos

G: guanina

GPA: Paro global de la proliferación (“Global Proliferative Arrest”)

h: horas

His: histidina

IAA: ácido indolacético

IAN: indol acetonitrilo

IAOx: indol-3-acetaldoxima

IBA: ácido indol-3-butírico

IPA: ácido indolpirúvico

ISH: hibridación *in situ*

Kan : kanamicina

ABREVIATURAS

Kan ^R o KanR: resistencia a kanamicina	p.b.: pares de bases
kb: kilobases	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
kg: kilogramos	PEG: polietilen glicol
lacZ: β-galactosidasa	pM: picomolar
LB: medio Luria-Bertani	RNA: ácido ribonucleico
Ler: ecotipo Landsberg, portador de la mutación <i>erecta</i>	RNA poli(A) ⁺ : RNA mensajero poliadenilado
LiAC: acetato de Litio	RNasa: ribonucleasa
LRRRK: receptor quinasa con repeticiones ricas en leucina ("Leucine Rich Repeat Receptor Kinase")	rpm: revoluciones por minuto
m: metros	RT-PCR: retrotranscripción y PCR semicuantitativa
M: molar	SAM: meristemo apical del tallo ("Shoot Apical Meristem")
Mb: megabases	SDS: n-dodecil sulfato sódico
mbar: milibares	seg: segundos
MES: ácido 4-morfolino-etano-sulfónico	SEM: microscopía electrónica de barrido ("Scanning Electron Microscopy")
mg: miligramos	T: timidina
min: minutos	TAE: Tris-acético-EDTA
ml: mililitros	TBE: Tris-borato-EDTA
mm: milímetros	TE: Tris-EDTA
mM: milimolar	tRNA: RNA de transferencia
mRNA: RNA mensajero	Trp: triptófano
MS: medio de Murashige y Skoog (incluyendo vitaminas)	U: unidades
NPA: ácido naftilftalámico	UV: ultravioleta
ng: nanogramos	v/v: volumen por volumen
nM: nanomolar	V: voltios
pág.: página	W: vatio
Pa: pascales	

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. y Araki, T.** (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052-6.
- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T. y Harberd, N. P.** (2007). The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6484-9.
- Achard, P. y Genschik, P.** (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* **60**, 1085-1092.
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C. y Harberd, N. P.** (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* **131**, 3357-65.
- Achard, P., Vriezen, W. H., Van Der Straeten, D. y Harberd, N. P.** (2003). Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* **15**, 2816-25.
- Adamczyk, B. J., Lehti-Shiu, M. D. y Fernandez, D. E.** (2007). The MADS domain factors AGL15 y AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J* **50**, 1007-19.
- Adrian, J., Farrona, S., Reimer, J. J., Albani, M. C., Coupland, G. y Turck, F.** (2010). cis-regulatory elements y chromatin state coordinately control temporal y spatial expression of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **22**, 1425.
- Adrian, J., Torti, S. y Turck, F.** (2009). From decision to commitment: the molecular memory of flowering. *Molecular plant* **2**, 628.
- Alabadi, D. y Blazquez, M. A.** (2009). Molecular interactions between light y hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* **69**, 409-17.
- Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Espinosa, A., Deng, X. W. et al.** (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* **53**, 324-35.
- Alexandre, C. M. y Hennig, L.** (2008). FLC or not FLC: the other side of vernalization. *J Exp Bot* **59**, 1127-35.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. y Ullrich, C. I.** (2006). Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**, 315-28.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J. J., Ochando, I., Vera, A., Ferrandiz, C. y Martinez-Laborda, A.** (2007). Common regulatory networks in leaf y fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Development* **134**, 2663-71.
- Alvarez, J. y Smyth, D.** (1999). CRABS CLAW y SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* **126**, 2377-2386.
- Alvarez, J. P., Goldshmidt, A., Efroni, I., Bowman, J. L. y Eshed, Y.** (2009). The NGATHA distal organ development genes are essential for style specification in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 1373-93.
- Alvarez, J. P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z. y Eshed, Y.** (2006). Endogenous y synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, y localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**, 1134-51.
- Amasino, R.** (2010). Seasonal y developmental timing of flowering. *Plant J* **61**, 1001-13.
- Amasino, R. M. y Michaels, S. D.** (2010). The timing of flowering. *Plant Physiol* **154**, 516-20.
- An, H., Roussot, C., Su-rez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piòeiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S. y Turnbull, C.** (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development* **131**, 3615.

- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T. A., Lawrenson, T., Sablowski, R. y Ostergaard, L.** (2010). Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **24**, 2127-32.
- Arsovski, A. A., Popma, T. M., Haughn, G. W., Carpita, N. C., McCann, M. C. y Western, T. L.** (2009). AtBXL1 Encodes a Bifunctional β -D-Xylosidase/ α -L-Arabinofuranosidase Required for Pectic Arabinan Modification in *Arabidopsis* Mucilage Secretory Cells. *Plant Physiol* **150**, 1219-1234.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T. et al.** (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**, 25-9.
- Aukerman, M. J. y Sakai, H.** (2003). Regulation of flowering time y floral organ identity by a MicroRNA y its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* **15**, 2730-41.
- Ausin, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J. A., Ruiz-Garcia, L. y Martinez-Zapater, J. M.** (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet* **36**, 162-6.
- Ausin, I., Alonso-Blanco, C. y Martinez-Zapater, J. M.** (2005). Environmental regulation of flowering. *Int J Dev Biol* **49**, 689-705.
- Azhakanandam, S., Nole-Wilson, S., Bao, F. y Franks, R. G.** (2008). SEUSS y AINTEGUMENTA mediate patterning y ovule initiation during gynoecium medial domain development. *Plant Physiol* **146**, 1165-81.
- Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M. y Ferrandiz, C.** (2006). Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* **57**, 3457-3469.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J. y Weigel, D.** (2006). Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet* **2**, e106.
- Balasubramanian, S. y Weigel, D.** (2006). Temperature Induced Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **1**, 227-8.
- Barkoulas, M., Hay, A., Kougioumoutzi, E. y Tsiantis, M.** (2008). A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*. *Nat Genet* **40**, 1136-41.
- Barton, M. K.** (2010). Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev Biol* **341**, 95-113.
- Baurle, I. y Dean, C.** (2008). Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins y chromatin regulators in the silencing of *Arabidopsis* targets. *PLoS One* **3**, e2733.
- Baurle, I., Smith, L., Baulcombe, D. C. y Dean, C.** (2007). Widespread role for the flowering-time regulators FCA y FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science* **318**, 109-12.
- Becker, A. y Theissen, G.** (2003). The major clades of MADS-box genes y their role in the development y evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* **29**, 464-89.
- Bechtold, N., Ellis, J. y Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci.* **316**, 1194-1199.
- Bell, E., Creelman, R. A. y Mullet, J. E.** (1995). A chloroplast lipooxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8675-9.
- Bemer, M., Wolters-Arts, M., Grossniklaus, U. y Angenent, G. C.** (2008). The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules. *Plant Cell* **20**, 2088-101.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G. y Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A. y Madueño, F.** (2007). Floral Initiation y Inflorescence Architecture: A Comparative View. *Annals of Botany* **100**, 659-676.
- Bennett, S. R. M., Alvarez, J., Bossinger, G. y Smyth, D. R.** (1995). Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **8**, 505-520.

- Berardini, T. Z., Bollman, K., Sun, H. y Poethig, R. S.** (2001). Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40. *Science* **291**, 2405-7.
- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I. E. y Ulker, B.** (2005). A rapid y versatile combined DNA/RNA extraction protocol y its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 y *Landsberg erecta*. *Plant Methods* **1**, 4.
- Bhatt, A. M., Etchells, J. P., Canales, C., Lagodienko, A. y Dickinson, H.** (2004). VAAMANA--a BEL1-like homeodomain protein, interacts with KNOX proteins BP y STM y regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**, 103-111.
- Blázquez, M.** (2000). Flower development pathways. *Journal of Cell Science* **113**, 3547.
- Blázquez, M. y Weigel, D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 889-892.
- Blázquez, M. A., Ahn, J. H. y Weigel, D.** (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **33**, 168-71.
- Blázquez, M. A., Soowal, L., Lee, I. y Weigel, D.** (1997). *LEAFY* expression y flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* **124**, 3835-3844.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K. y Melzer, S.** (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**, 591-9.
- Bowman, J. y Smyth, D.** (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel y nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger y helix-loop-helix domains. *Development* **126**, 2387-2396.
- Bowman, J. L.** (1994). *Arabidopsis: an atlas of morphology y development*, (ed., pp. 450. New York: Springer.
- Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. y Smyth, D. R.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* y interacting genes. *Development* **119**, 721-743.
- Bowman, J. L. y Eshed, Y.** (2000). Formation y maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci* **5**, 110-115.
- Bowman, J. L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U. y Meyerowitz, E. M.** (1992). *SUPERMAN*, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development* **114**, 599-615.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. y Meyerowitz, E. M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.
- Bradley, D. J., Ratcliffe, O. J., Vincent, C., Carpenter, R. y Coen, E. S.** (1997). Inflorescence commitment y architecture in *Arabidopsis*. *Science* **275**, 80-83.
- Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. y Simon, R.** (2000). Dependence of Stem Cell Fate in *Arabidopsis* on a Feedback Loop Regulated by CLV3 Activity. *Science* **289**, 617-619.
- Broun, P.** (2005). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 272-279.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. y Jones, R. L.** (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists.
- Butenko, M. A., Stenvik, G. E., Alm, V., Saether, B., Patterson, S. E. y Aalen, R. B.** (2006). Ethylene-dependent y -independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter::reporter gene constructs in the *ida* abscission mutant. *J Exp Bot* **57**, 3627-37.
- Byrne, M., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J., Dunham, M., Hudson, A. y Martienssen, R.** (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning y stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.

- Byrne, M. E., Groover, A. T., Fontana, J. R. y Martienssen, R. A.** (2003). Phyllotactic pattern y stem cell fate are determined by the Arabidopsis homeobox gene BELLRINGER. *Development* **130**, 3941-3950.
- Byrne, M. E., Simorowski, J. y Martienssen, R. A.** (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* **129**, 1957-65.
- Carbonell-Bejerano, P., Urbez, C., Granell, A., Carbonell, J. y Perez-Amador, M. A.** (2011). Ethylene is involved in pistil fate by modulating the onset of ovule senescence y the GA-mediated fruit set in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **11**, 84.
- Carles, C. C., Choffnes-Inada, D., Reville, K., Lertpiriyapong, K. y Fletcher, J. C.** (2005). ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot y floral meristem activity in Arabidopsis. *Development* **132**, 897-911.
- Carles, C. C. y Fletcher, J. C.** (2009). The SAND domain protein ULTRAPETALA1 acts as a trithorax group factor to regulate cell fate in plants. *Genes Dev* **23**, 2723-8.
- Castillejo, C. y Pelaz, S.** (2008). The balance between CONSTANS y TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Curr Biol* **18**, 1338-43.
- Castillon, A., Shen, H. y Huq, E.** (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* **12**, 514-21.
- Causier, B., Cook, H. y Davies, B.** (2003). An antirrhinum ternary complex factor specifically interacts with C-function y SEPALLATA-like MADS-box factors. *Plant Mol Biol* **52**, 1051-62.
- Clark, S. E., Running, M. P. y Meyerowitz, E. M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem y flower development in Arabidopsis. *Development* **119**, 397-418.
- Clark, S. E., Williams, R. W. y Meyerowitz, E. M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot y floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**, 575-85.
- Clough, S. J. y Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-43.
- Coen, E. S. y Meyerowitz, E. M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**, 31-37.
- Colombo, M., Masiero, S., Vanzulli, S., Lardelli, P., Kater, M. M. y Colombo, L.** (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte y embryo development in Arabidopsis. *Plant J* **54**, 1037-48.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. et al.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* **316**, 1030-3.
- Cosgrove, D. J.** (2000a). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-6.
- Cosgrove, D. J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 850-61.
- Cosgrove, D. J. U.-h. w. s. c. s. a. B. V.-P.-f. a. f. d. e. e. e.** (2000b). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology y Biochemistry* **38**, 109-124.
- Crawford, B. C., Ditta, G. y Yanofsky, M. F.** (2007). The NTT gene is required for transmitting-tract development in carpels of Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* **17**, 1101-8.
- Cress, W. D. y Triezenberg, S. J.** (1991). Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science* **251**, 87-90.
- Chailakhyan, M. K.** (1936). On the hormonal theory of plant development. *Dolk. Acad. Sci. USSR* **12**, 443-447.
- Chen, C., Wang, S. y Huang, H.** (2000). LEUNIG has multiple functions in gynoecium development in Arabidopsis. *Genesis* **26**, 42-54.
- Chen, Q., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L. y Drews, G. N.** (1999). The Arabidopsis FILAMENTOUS FLOWER gene is required for flower formation. *Development* **126**, 2715-26.
- Chen, X.** (2004). A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science* **303**, 2022-2025.

- Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H. M., Cheng, Z., Xie, D. y Peng, J.** (2009a). Gibberellin Acts through Jasmonate to Control the Expression of *MYB21*, *MYB24*, y *MYB57* to Promote Stamen Filament Growth in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **5**, e1000440.
- Cheng, W. H., Chiang, M. H., Hwang, S. G. y Lin, P. C.** (2009b). Antagonism between abscisic acid y ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism y signaling pathways. *Plant Mol Biol* **71**, 61-80.
- Cheng, Y., Dai, X. y Zhao, Y.** (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs y vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**, 1790-9.
- Cheng, Y., Dai, X. y Zhao, Y.** (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis y leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2430 - 2439.
- Child, R., Chauvaux, N., John, K., Ulvskov, P. y Onckelen, H. V.** (1998). Ethylene biosynthesis in oilseed rape pods in relation to pod shatter. *J Exp Bot* **49**, 829-838.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R. et al.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-71.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. y Sommer, H.** (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO J.* **15**, 4330-4343.
- de Folter, S. y Angenent, G. C.** (2006). trans meets cis in MADS science. *Trends Plant Sci* **11**, 224-31.
- de Folter, S., Immink, R. G., Kieffer, M., Parenicova, L., Henz, S. R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M. M. et al.** (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**, 1424-33.
- de Folter, S., Urbanus, S. L., van Zuijlen, L. G., Kaufmann, K. y Angenent, G. C.** (2007). Tagging of MADS domain proteins for chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biol* **7**, 47.
- de Lucas, M., Daviere, J. M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M. A., Titarenko, E. y Prat, S.** (2008). A molecular framework for light y gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480-4.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I. y Wasternack, C.** (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*--enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**, 297-306.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C. A., Taylor, J. M., Peacock, W. J. y Dennis, E. S.** (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 6680-5.
- Dinneny, J. R., Weigel, D. y Yanofsky, M. F.** (2005). A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4687-96.
- Dinneny, J. R., Weigel, D. y Yanofsky, M. F.** (2006). NUBBIN y JAGGED define stamen y carpel shape in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 1645-55.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. y Yanofsky, M. F.** (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ y meristem identity. *Curr Biol* **14**, 1935-40.
- Dorca-Fornell, C., Gregis, V., Grandi, V., Coupland, G., Colombo, L. y Kater, M. M.** (2011). The *Arabidopsis* SOC1-like genes AGL42, AGL71 y AGL72 promote flowering in the shoot apical y axillary meristems. *Plant J.*
- Dorcey, E., Urbez, C., Blazquez, M. A., Carbonell, J. y Perez-Amador, M. A.** (2009). Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J* **58**, 318-32.
- Drews, G. N., Bowman, J. L. y Meyerowitz, E. M.** (1991). Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* **65**, 991-1002.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H. y Sommer, H.** (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS y GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* **18**, 5370-9.
- Engvild, K. C.** (1989). The death hormone hypothesis. *Physiol Plant* **77**: 282-285

- Eriksson, S., Bohlenius, H., Moritz, T. y Nilsson, O.** (2006). GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription y Arabidopsis floral initiation. *Plant Cell* **18**, 2172-81.
- Eshed, Y., Baum, S. y Bowman, J.** (1999). Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of Arabidopsis. *Cell* **99**, 199-209.
- Fan, H. Y., Hu, Y., Tudor, M. y Ma, H.** (1997). Specific interactions between the K domains of AG y AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J* **12**, 999-1010.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S. et al.** (2008). Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light y gibberellins. *Nature* **451**, 475-9.
- Feraru, E. y Friml, J.** (2008). PIN polar targeting. *Plant Physiol* **147**, 1553-9.
- Fernandez-Calvo, P., Chini, A., Fernandez-Barbero, G., Chico, J. M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J. M. et al.** (2011). The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 y MYC4 are targets of JAZ repressors y act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**, 701-15.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. y Yanofsky, M.** (2000a). Redundant regulation of meristem identity y plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 y CAULIFLOWER. *Development* **127**, 725-734.
- Ferrándiz, C., Liljegren, S. y Yanofsky, M.** (2000b). FRUITFULL negatively regulates the SHATTERPROOF genes during Arabidopsis fruit development. *Science* **289**, 436-438.
- Finzi, L. y Dunlap, D.** (2003). Single-molecule studies of DNA architectural changes induced by regulatory proteins. *Methods Enzymol* **370**, 369-78.
- Fleet, C. M. y Sun, T. P.** (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 77-85.
- Fletcher, J. C.** (2002). Shoot y floral meristem maintenance in arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 45-66.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. y Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911-4.
- Foat, B. C., Morozov, A. V. y Bussemaker, H. J.** (2006). Statistical mechanical modeling of genome-wide transcription factor occupancy data by MatrixREDUCE. *Bioinformatics* **22**, e141-9.
- Fornara, F. y Coupland, G.** (2009). Plant phase transitions make a SPLash. *Cell* **138**, 625-627.
- Fornara, F., Parenicova, L., Falasca, G., Pelucchi, N., Masiero, S., Ciannamea, S., Lopez-Dee, Z., Altamura, M. M., Colombo, L. y Kater, M. M.** (2004). Functional characterization of OsMADS18, a member of the AP1/SQUA subfamily of MADS box genes. *Plant Physiol* **135**, 2207-19.
- Franks, R. G., Liu, Z. y Fischer, R. L.** (2006). SEUSS y LEUNIG regulate cell proliferation, vascular development y organ polarity in Arabidopsis petals. *Planta*.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. y Jurgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**, 147-53.
- Fujita, H., Takemura, M., Tani, E., Nemoto, K., Yokota, A. y Kohchi, T.** (2003). An Arabidopsis MADS-Box Protein, AGL24, is Specifically Bound to y Phosphorylated by Meristematic Receptor-Like Kinase (MRLK). *Plant Cell Physiol.* **44**, 735-742.
- Fujiwara, S., Nakagawa, M., Oda, A., Kato, K. y Mizoguchi, T.** (2010). Photoperiod pathway regulates expression of MAF5 y FLC that encode MADS-box transcription factors of the FLC family in Arabidopsis. *Plant Biotechnology* **27**, 447-454.
- Fujiwara, S., Oda, A., Yoshida, R., Niinuma, K., Miyata, K., Tomozoe, Y., Tajima, T., Nakagawa, M., Hayashi, K., Coupland, G. et al.** (2008). Circadian clock proteins LHY y CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 2960-71.

- Furner, I. J. y Pumfrey, J. E.** (1992). Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **115**, 755-764.
- Gallego-Bartolome, J., Minguet, E. G., Marin, J. A., Prat, S., Blazquez, M. A. y Alabadi, D.** (2010). Transcriptional diversification y functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* **27**, 1247-56.
- Gamboa, A., Paez-Valencia, J., Acevedo, G. F., Vazquez-Moreno, L. y Alvarez-Buylla, R. E.** (2001). Floral Transcription Factor AGAMOUS Interacts in Vitro with a Leucine-Rich Repeat y an Acid Phosphatase Protein Complex. *Biochemical y Biophysical Research Communications* **288**, 1018-1026.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Hohmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H. y Huijser, P.** (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J* **49**, 683-93.
- Gantulga, D., Turan, Y., Bevan, D. R. y Esen, A.** (2008). The *Arabidopsis* At1g45130 y At3g52840 genes encode beta-galactosidases with activity toward cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* **69**, 1661-70.
- Garner, W. W. y Allard, H. A.** (1920). Effect of the relative length of day y night y other factors of the environment on growth y reproduction in plants. *J. Agricult. Res.* **18**, 553-606.
- Germann, S., Juul-Jensen, T., Letarnec, B. y Gaudin, V.** (2006). DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling in vivo, y its use to identify putative LHP1 target loci. *Plant J* **48**, 153-63.
- Gillaspy, G., Ben-David, H. y Gruissem, W.** (1993). Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* **5**, 1439-1451.
- Girin, T., Sorefan, K. y Ostergaard, L.** (2009). Meristematic sculpting in fruit development. *J Exp Bot* **60**, 1493-502.
- Gocal, G. F., Sheldon, C. C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D. J., MacMillan, C. P., Li, S. F., Parish, R. W., Dennis, E. S., Weigel, D. et al.** (2001). GAMYB-like genes, flowering, y gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 1682-93.
- Goethe, J. W. v.** (1790). Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären. Gotha: C. W. Ettinger.
- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S. D. y Koltunow, A. M.** (2006). AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1873-86.
- Gomez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M. M., Angenent, G. C. y Sablowski, R.** (2005). Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* **132**, 429-38.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C. y Meyerowitz, E. M.** (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16529-34.
- Goto, K. y Meyerowitz, E. M.** (1994). Function y regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* **8**, 1548-1560.
- Gramzow, L. y Theissen, G.** (2010). A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biol* **11**, 214.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L. y Kater, M. M.** (2006). AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, y APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1373-82.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L. y Kater, M. M.** (2008). AGAMOUS-LIKE24 y SHORT VEGETATIVE PHASE determine floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Plant J* **56**, 891-902.
- Gregis, V., Sessa, A., Dorca-Fornell, C. y Kater, M. M.** (2009). The *Arabidopsis* floral meristem identity genes AP1, AGL24 y SVP directly repress class B y C floral homeotic genes. *Plant J* **60**, 626-37.
- Gremski, K., Ditta, G. y Yanofsky, M. F.** (2007). The HECATE genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **134**, 3593-601.

- Groszmann, M., Bylstra, Y., Lampugnani, E. R. y Smyth, D. R.** (2010). Regulation of tissue-specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, y lateral organ growth in Arabidopsis. *J Exp Bot* **61**, 1495-1508.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M. F. y Martienssen, R.** (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development* **125**, 1509-1517.
- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. y Laux, T.** (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development* **131**, 657-68.
- Hake, S., Char, B. R., Chuck, G., Foster, T., Long, J. y Jackson, D.** (1995). Homeobox genes in the functioning of plant meristems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **350**, 45-51.
- Hamann, T., Osborne, E., Youngs, H. L., Misson, J., Nussaume, L. y Somerville, C.** (2004). Global expression analysis of CESA y CSL genes in Arabidopsis. *Cellulose* **11**, 279-286.
- Han, P., Li, Q. y Zhu, Y. X.** (2008). Mutation of Arabidopsis BARD1 causes meristem defects by failing to confine WUSCHEL expression to the organizing center. *Plant Cell* **20**, 1482-93.
- Hartmann, U., Hohmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. y Huijser, P.** (2000a). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J* **21**, 351-60.
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. y Huijser, P.** (2000b). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant Journal* **12**, 351-360.
- Haughn, G. W., Schultz, E. A. y Martínez-Zapater, J. M.** (1995). The regulation of flowering in Arabidopsis thaliana. *Can. J. Bot.* **73**, 959-981.
- Hay, A., Barkoulas, M. y Tsiantis, M.** (2006). ASYMMETRIC LEAVES1 y auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression y promote leaf development in Arabidopsis. *Development* **133**, 3955-61.
- Hay, A. y Tsiantis, M.** (2006). The genetic basis for differences in leaf form between Arabidopsis thaliana y its wild relative Cardamine hirsuta. *Nat Genet* **38**, 942-7.
- Hayes, T. E., Sengupta, P. y Cochran, B. H.** (1988). The human c-fos serum response factor y the yeast factors GRM/PRTF have related DNA-binding specificities. *Genes Dev* **2**, 1713-22.
- He, Y., Michaels, S. D. y Amasino, R. M.** (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. *Science* **302**, 1751-4.
- Hedden, P. y Phillips, A. L.** (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**, 523-30.
- Heisler, M., Atkinson, A., Bylstra, Y., Walsh, R. y Smyth, D.** (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development* **128**, 1089-1098.
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A. y Meyerowitz, E. M.** (2005). Patterns of auxin transport y gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**, 1899-911.
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., James Peacock, W. y Dennis, E. S.** (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 y FT chromatin y is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J* **46**, 183-92.
- Hempel, F. D. y Feldman, L. J.** (1994). Bi-directional inflorescence development in Arabidopsis thaliana: Acropetal initiation of flowers y basipetal initiation of paraclades. *Planta* **192**, 276-286.
- Hempel, F. D., Weigel, D., Mandel, M. A., Ditta, G., Zambryski, P., Feldman, L. J. y Yanofsky, M. F.** (1997). Floral determination y expression of floral regulatory genes in Arabidopsis. *Development* **124**, 3845-3853.
- Hempel, F. D., Welch, D. R. y Feldman, L. J.** (2000). Floral induction y determination: where is flowering controlled? *Trends Plant Sci* **5**, 17-21.

- Henderson, I. R., Liu, F., Drea, S., Simpson, G. G. y Dean, C.** (2005). An allelic series reveals essential roles for FY in plant development in addition to flowering-time control. *Development* **132**, 3597-607.
- Hennig, L., Bouveret, R. y Grissem, W.** (2005). MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly y remodeling complexes. *Trends in cell biology* **15**, 295-302.
- Hensel, L. L., Nelson, M. A., Richmond, T. A. y Bleecker, A. B.** (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **106**, 863-876.
- Hepworth, S. R., Klenz, J. E. y Haughn, G. W.** (2006). UFO in the *Arabidopsis* inflorescence apex is required for floral-meristem identity y bract suppression. *Planta* **223**, 769-78.
- Hewitt, Y.** (1966). Sand y Water Culture Methods used in the Study of Plant Nutrition: Farnham: Commonwealth Agricultural Bureau.
- Hildebrand, F.** (1881). Die Lebensdauer und Vegetationsweise der Pflanzen, ihre Ursache und ihre Entwicklung. *Bot Jahrb Syst Pflanzengesch Pflanzengeogr* **2**: 51-135
- Hill, J. P. y Lord, E. M.** (1989). Floral development in *Arabidopsis thaliana*: comparison of the wildtype y the homeotic *pistillata* mutant. *Can. J. Bot.* **67**, 2922-2936.
- Hill, K., Wang, H. y Perry, S. E.** (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant J* **53**, 172-85.
- Hisamatsu, T. y King, R. W.** (2008). The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) y gibberellin. *J Exp Bot* **59**, 3821-9.
- Hobe, M., Brand, U., Waites, R. y Simon, R.** (2001). Control of cell fate in plant meristems. *Novartis Found Symp* **237**, 235-43; discussion 243-7.
- Honma, T. y Goto, K.** (2000). The *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA is regulated by discrete cis-elements responsive to induction y maintenance signals. *Development* **127**, 2021-2030.
- Honma, T. y Goto, K.** (2001). Complexes of MADS box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**, 525-529.
- Hopkins, W. G. y Hüner, N. P. A.** (2008). Introduction to plant physiology. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Huang, K., Louis, J. M., Donaldson, L., Lim, F. L., Sharrocks, A. D. y Clore, G. M.** (2000). Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending y specificity by MADS-box transcription factors. *EMBO J* **19**, 2615-28.
- Hunter, C., Willmann, M. R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M. y Poethig, S. R.** (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN y ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 2973-81.
- Ichihashi, Y., Horiguchi, G., Gleissberg, S. y Tsukaya, H.** (2010). The bHLH transcription factor SPATULA controls final leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **51**, 252-61.
- Imaizumi, T., Schultz, T. F., Harmon, F. G., Ho, L. A. y Kay, S. A.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* **309**, 293-7.
- Immink, R. G., Ferrario, S., Busscher-Lange, J., Kooiker, M., Busscher, M. y Angenent, G. C.** (2003). Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family. *Mol Genet Genomics* **268**, 598-606.
- Immink, R. G., Kaufmann, K. y Angenent, G. C.** (2010). The 'ABC' of MADS domain protein behaviour y interactions. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 87-93.
- Immink, R. G., Tonaco, I. A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A. D., Busscher-Lange, J., Borst, J. W. y Angenent, G. C.** (2009). SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol* **10**, R24.
- Irish, V. F.** (2010). The flowering of *Arabidopsis* flower development. *Plant J* **61**, 1014-28.
- Irish, V. F. y Sussex, I. M.** (1992). A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* **115**, 745-753.

- Iwama, A., Yamashino, T., Tanaka, Y., Sakakibara, H., Kakimoto, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Nagatani, A. y Mizuno, T. (2007). AHK5 histidine kinase regulates root elongation through an ETR1-dependent abscisic acid y ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **48**, 375-80.
- Jack, T., Brockman, L. L. y Meyerowitz, E. M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS-box y is expressed in petals y stamens. *Cell* **68**, 683-697.
- Jacobsen, S. E. y Olszewski, N. E. (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**, 887-896.
- Jaeger, K. E. y Wigge, P. A. (2007). FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **17**, 1050-4.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P. y Tsiantis, M. (2005). KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin y gibberellin activities. *Curr Biol* **15**, 1560-5.
- Jeong, S., Trotochaud, A. E. y Clark, S. E. (1999). The *Arabidopsis* *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-34.
- Jiang, C. y Fu, X. (2007). GA action: turning on de-DELLA repressing signaling. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 461-465.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R. y Dean, C. (2000). Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* **290**, 344-7.
- Josse, E. M., Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, K. L., Gilday, A. D., Jeffree, C. E., Vaistij, F. E., Martinez-Garcia, J. F., Nagy, F., Graham, I. A. et al. (2011). A DELLA in disguise: *SPATULA* restrains the growth of the developing *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* **23**, 1337-51.
- Jung, J. H., Seo, Y. H., Seo, P. J., Reyes, J. L., Yun, J., Chua, N. H. y Park, C. M. (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2736-48.
- Kang, I. H., Steffen, J. G., Portereiko, M. F., Lloyd, A. y Drews, G. N. (2008). The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 635-47.
- Kania, T., Russenberger, D., Peng, S., Apel, K. y Melzer, S. (1997). *PPF1* promotes flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1327-1338.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. y Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development y miRNA uncton. *Dev Cell* **4**, 205-17.
- Kaufmann, K., Melzer, R. y Theissen, G. (2005). MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions y network evolution in land plants. *Gene* **347**, 183-98.
- Kaufmann, K., Muino, J. M., Jauregui, R., Airoidi, C. A., Smaczniak, C., Krajewski, P. y Angenent, G. C. (2009). Target genes of the MADS transcription factor *SEPALLATA3*: integration of developmental y hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower. *PLoS Biol* **7**, e1000090.
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muino, J. M., Ferrier, T., Wuest, S. E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E. M. et al. (2010). Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science* **328**, 85-9.
- Kelly, M. O. y Davies, P. J. (1988). The control of whole plant senescence. *CRC Crit Rev Plant Sa* **7**: 139-172
- Kempin, S. A., Savidge, B. y Yanofsky, M. F. (1995). Molecular basis of the *cauliflower* phenotype in *Arabidopsis*. *Science* **267**, 522-525.
- Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H.-t., Cosgrove, D., Fleming, A., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-mason, S., Rose, J. et al. (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes y proteins. *Plant Mol Biol* **55**, 311-314.

- Kerstetter, R., Bollman, K., Taylor, A., Bomblied, K. y Poethig, S.** (2001). KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* **411**, 706-709.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E. A., Al-Sady, B., Lanzatella, C. y Quail, P. H.** (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* **16**, 3033-44.
- Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. y Davies, B.** (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL y its functional homologue in Antirrhinum reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell* **18**, 560-73.
- Kim, D. H., Doyle, M. R., Sung, S. y Amasino, R. M.** (2009). Vernalization: winter y the timing of flowering in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 277-99.
- Kim, H. J., Hyun, Y., Park, J. Y., Park, M. J., Park, M. K., Kim, M. D., Kim, H. J., Lee, M. H., Moon, J., Lee, I. et al.** (2004). A genetic link between cold responses y flowering time through FVE in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet* **36**, 167-71.
- Kim, J. I., Murphy, A. S., Baek, D., Lee, S.-W., Yun, D.-J., Bressan, R. A. y Narasimhan, M. L.** (2011). YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **62**, 3981-3992.
- King, G. N.** (1947). Artificial Parthenocarpy in Lycopersicum esculentum; Tissue Development. *Plant Physiol* **22**, 572-81.
- Klebs, G.** (1918). Über die Blutentbildung bei Sempervivum. *Flora (Jena)* **128**, 111-112.
- Knott, J. E.** (1934). Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **31**, 152-154.
- Kooiker, M., Airoidi, C. A., Losa, A., Manzotti, P. S., Finzi, L., Kater, M. M. y Colombo, L.** (2005). BASIC PENTACYSSTEINE1, a GA binding protein that induces conformational changes in the regulatory region of the homeotic Arabidopsis gene SEEDSTICK. *Plant Cell* **17**, 722-9.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C. J. y Peeters, A. J. M.** (1998). Genetic interactions among late-flowering mutants of Arabidopsis. *Genetics* **148**, 885-892.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J. y van der Veen, J. H.** (1991). A genetic y physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 57-66.
- Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M. y Goto, K.** (2003). Arabidopsis TERMINAL FLOWER 2 Gene Encodes a Heterochromatin Protein 1 Homolog y Represses both FLOWERING LOCUS T to Regulate Flowering Time y Several Floral Homeotic Genes. *Plant Cell Physiol.* **44**, 555-564.
- Krizek, B. A. y Meyerowitz, E. M.** (1996). The Arabidopsis homeotic genes APETALA3 y PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* **122**, 11-22.
- Krizek, B. A., Prost, V. y Macias, A.** (2000). AINTEGUMENTA promotes petal identity y acts as a negative regulator of AGAMOUS. *Plant Cell* **12**, 1357-66.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. y Kyojuka, J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-5.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Long, J. A., Fridborg, I. y Sundberg, E.** (2002). STY1 y STY2 promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development. *Development* **129**, 4707-4717.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Magnus Eklund, D. y Sundberg, E.** (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J.*
- Kwon, C. S., Chen, C. y Wagner, D.** (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. *Genes Dev* **19**, 992-1003.
- Laux, T., Mayer, K. F. X., Berger, J. y Jürgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot y floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.

- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., Lee, J. S., Kwon, Y. M. y Lee, I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes Dev* **14**, 2366-76.
- Lee, H. K., Hsu, A. K., Sajdak, J., Qin, J. y Pavlidis, P. (2004). Coexpression analysis of human genes across many microarray data sets. *Genome Res* **14**, 1085-94.
- Lee, J. y Lee, I. (2010). Regulation y function of SOC1, a flowering pathway integrator. *J Exp Bot* **61**, 2247-54.
- Lee, J., Oh, M., Park, H. y Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant J* **55**, 832-43.
- Lee, J. H., Yoo, S. J., Park, S. H., Hwang, I., Lee, J. S. y Ahn, J. H. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes Dev* **21**, 397-402.
- Leibfried, A., To, J. P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J. y Lohmann, J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172-5.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G. y Laux, T. (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL y AGAMOUS. *Cell* **105**, 805-14.
- Lenhard, M., Jurgens, G. y Laux, T. (2002). The WUSCHEL y SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* **129**, 3195-3206.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E. y Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev Cell* **15**, 110-20.
- Liljegren, S., Ditta, G., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. y Yanofsky, M. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **404**, 766-769.
- Liljegren, S. J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. S. y Yanofsky, M. F. (1999). Interactions among APETALA1, LEAFY, y TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell* **11**, 1007-18.
- Liljegren, S. J., Roeder, A. H., Kempin, S. A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D. K. y Yanofsky, M. F. (2004). Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* **116**, 843-53.
- Lim, M. H., Kim, J., Kim, Y. S., Chung, K. S., Seo, Y. H., Lee, I., Kim, J., Hong, C. B., Kim, H. J. y Park, C. M. (2004). A new Arabidopsis gene, FLK, encodes an RNA binding protein with K homology motifs y regulates flowering time via FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell* **16**, 731-40.
- Lindsay, D. L., Sawhney, V. K. y Bonham-Smith, P. C. (2006). Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 y WUSCHEL expression temporally coincide with altered floral development in Arabidopsis. *Plant Science* **170**, 1111-1117.
- Linkies, A., Muller, K., Morris, K., Tureckova, V., Wenk, M., Cadman, C. S., Corbineau, F., Strnad, M., Lynn, J. R., Finch-Savage, W. E. et al. (2009). Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* y *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**, 3803-22.
- Lippman, Z. B., Cohen, O., Alvarez, J. P., Abu-Abied, M., Pekker, I., Paran, I., Eshed, Y. y Zamir, D. (2008). The Making of a Compound Inflorescence in Tomato y Related Nightshades. *PLoS Biol* **6**, e288.
- Liu, C., Chen, H., Er, H. L., Soo, H. M., Kumar, P. P., Han, J. H., Liou, Y. C. y Yu, H. (2008). Direct interaction of AGL24 y SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development* **135**, 1481-91.
- Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C. y Yu, H. (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Dev Cell* **16**, 711-22.
- Liu, Z., Franks, R. G. y Klink, V. P. (2000). Regulation of gynoecium marginal tissue formation by LEUNIG y AINTEGUMENTA. *Plant Cell* **12**, 1879-92.

- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. y Sandberg, G. (2005). Sites y Regulation of Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell Online* **17**, 1090-1104.
- Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Parcy, F., Simon, R. y Weigel, D. (2001). A molecular link between stem cell regulation y floral patterning in Arabidopsis. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. y Barton, M. K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene Arabidopsis. *Nature* **379**, 66-69.
- Louvet, R., Cavel, E., Gutierrez, L., Guénin, S., Roger, D., Gillet, F., Guerineau, F. y Pelloux, J. (2006). Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in Arabidopsis thaliana. *Planta* **224**, 782-791.
- Ma, H. (2009). Regulatory Genes in Plant Development: MADS, (ed.: eLS).
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S. y Cobbett, C. (1997). FCA, a gene controlling flowering time in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**, 737-745.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Markus Lange, B., Choi, G., Koo, Y. J., Yoo, Y. J., Choi, Y. D., Choi, G. y Browse, J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. *The Plant Journal* **46**, 984-1008.
- Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. y Yanofsky, M. F. (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* **360**, 273-277.
- Mandel, M. A. y Yanofsky, M. F. (1995). The Arabidopsis *AGL8* MADS box gene is expressed in inflorescence meristems y is negatively regulated by *APETALA1*. *Plant Cell* **7**, 1763-1771.
- Manzano, D., Marquardt, S., Jones, A. M., Baurle, I., Liu, F. y Dean, C. (2009). Altered interactions within FY/AtCPSF complexes required for Arabidopsis FCA-mediated chromatin silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8772-7.
- Marti, C., Orzaez, D., Ellul, P., Moreno, V., Carbonell, J. y Granell, A. (2007). Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant J* **52**, 865-76.
- Martínez-Zapater, J. M. y Somerville, C. R. (1990). Effect of light quality y vernalization on late-flowering mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **92**, 770-776.
- Masiero, S., Imbriano, C., Ravasio, F., Favaro, R., Pelucchi, N., Gorla, M. S., Mantovani, R., Colombo, L. y Kater, M. M. (2002). Ternary complex formation between MADS-box transcription factors y the histone fold protein NF-YB. *J Biol Chem* **277**, 26429-35.
- Masiero, S., Li, M. A., Will, I., Hartmann, U., Saedler, H., Huijser, P., Schwarz-Sommer, Z. y Sommer, H. (2004). INCOMPOSITA: a MADS-box gene controlling prophyll development y floral meristem identity in Antirrhinum. *Development* **131**, 5981-90.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F. y Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. *Curr Biol* **17**, 1055-60.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Murdter, F., Kuttner, F. y Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol* **7**, e1000148.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. y Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**, 805-15.
- McConnell, J., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. y Barton, K. (2001). Role of PHABULOSA y PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**, 709-713.
- McConnell, J. R. y Barton, M. K. (1998). Leaf polarity y meristem formation in Arabidopsis. *Development* **125**, 2935-42.
- Melzer, R. y Theissen, G. (2009). Reconstitution of 'floral quartets' in vitro involving class B y class E floral homeotic proteins. *Nucleic Acids Res* **37**, 2723-36.
- Melzer, R., Verelst, W. y Theissen, G. (2009). The class E floral homeotic protein SEPALLATA3 is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes in vitro. *Nucleic Acids Res* **37**, 144-57.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A. y Beckman, T. (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy y growth form in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet* **40**, 1489-92.

- Messenguy, F. y Dubois, E.** (2003). Role of MADS box proteins y their cofactors in combinatorial control of gene expression y cell development. *Gene* **316**, 1-21.
- Meyerowitz, E. M. y Somerville, C. R.** (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Michaels, S. D.** (2009). Flowering time regulation produces much fruit. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 75-80.
- Michaels, S. D. y Amasino, R. M.** (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**, 949-56.
- Michaels, S. D. y Amasino, R. M.** (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA y autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* **13**, 935-41.
- Michaels, S. D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Pelaz, S., Yanofsky, M. y Amasino, R. M.** (2003a). *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* y is positively regulated by vernalization. *Plant J* **33**, 867-874.
- Michaels, S. D., He, Y., Scortecci, K. C. y Amasino, R. M.** (2003b). Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10102-7.
- Michniewicz, M., Zago, M. K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, I., Heisler, M. G., Ohno, C., Zhang, J., Huang, F. et al.** (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A y PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**, 1044-56.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. y Kakimoto, T.** (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity y regulation by auxin, cytokinin, y nitrate. *Plant J* **37**, 128-38.
- Mizukami, Y. y Ma, H.** (1995). Separation of AG function in floral meristem determinacy from that in reproductive organ identity by expressing antisense AG RNA. *Plant Mol. Biol.*, in press.
- Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, C. B., Paek, N. C., Kim, S. G. y Lee, I.** (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization y gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* **35**, 613-23.
- Muller, R., Bleckmann, A. y Simon, R.** (2008). The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* **20**, 934-46.
- Mutasa-Gottgens, E., Qi, A., Mathews, A., Thomas, S., Phillips, A. y Hedden, P.** (2009). Modification of gibberellin signalling (metabolism & signal transduction) in sugar beet: analysis of potential targets for crop improvement. *Transgenic Res* **18**, 301-8.
- Mylne, J. S., Barrett, L., Tessadori, F., Mesnage, S., Johnson, L., Bernatavichute, Y. V., Jacobsen, S. E., Fransz, P. y Dean, C.** (2006). LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5012-7.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic acid biosynthesis y catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 165-85.
- Nemhauser, J., Feldman, L. y Zambryski, P.** (2000). Auxin y ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development* **127**, 3877-3888.
- Ng, M. y Yanofsky, M. F.** (2001). Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by APETALA1. *Plant Cell* **13**, 739-53.
- Noh, B., Lee, S. H., Kim, H. J., Yi, G., Shin, E. A., Lee, M., Jung, K. J., Doyle, M. R., Amasino, R. M. y Noh, Y. S.** (2004). Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time. *Plant Cell* **16**, 2601-13.
- Nole-Wilson, S., Azhakanandam, S. y Franks, R. G.** (2010). Polar auxin transport together with AINTEGUMENTA y REVOLUTA coordinate early *Arabidopsis* gynoecium development. *Developmental Biology* **346**, 181-195.

- Nole-Wilson, S. y Krizek, B. A.** (2006). AINTEGUMENTA contributes to organ polarity y regulates growth of lateral organs in combination with YABBY genes. *Plant Physiol.*
- Noodén, L. D. y Leopold, A. C.** (1988). Senescence y aging in plants. London ; San Diego: Academic Press.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. y Treisman, R.** (1988). Isolation y properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* **55**, 989-1003.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y. y Matsubayashi, Y.** (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H. S., Sun, T. P., Kamiya, Y. y Choi, G.** (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI y RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* **19**, 1192-208.
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. y Matsubayashi, Y.** (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in Arabidopsis thaliana. *Nat Chem Biol* **5**, 578-80.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. y Shimura, Y.** (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bu formation. *Plant Cell* **3**, 677-684.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T. y Nambara, E.** (2006). CYP707A1 y CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy y germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**, 97-107.
- Okamoto, J. K., Szeto, W., Lotys-Prass, C. y Jofuku, K. D.** (1997). Photo y hormonal control of meristem identity in the Arabidopsis flower mutants *apetala2* y *apetala1*. *Plant Cell* **9**, 37-47.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L. y Hake, S.** (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* **127**, 5523-32.
- Ostergaard, L.** (2009). Don't 'leaf' now. The making of a fruit. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 36-41.
- Ozga, J. A., Reinecke, D. M., Ayele, B. T., Ngo, P., Nadeau, C. y Wickramarathna, A. D.** (2009). Developmental y hormonal regulation of gibberellin biosynthesis y catabolism in pea fruit. *Plant Physiol* **150**, 448-62.
- Ozga, J. A., van Huizen, R. y Reinecke, D. M.** (2002). Hormone y seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiol* **128**, 1379-89.
- Parcy, F., Nilsson, O., Lee, I., Busch, M. y Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-566.
- Parenicova, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H. E., Ingram, R. M., Kater, M. M., Davies, B. et al.** (2003). Molecular y Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World. *Plant Cell* **15**, 1538-1551.
- Park, C. H., Kim, T.-W., Son, S.-H., Hwang, J.-Y., Lee, S. C., Chang, S. C., Kim, S.-H., Kim, S. W. y Kim, S.-K.** (2010). Brassinosteroids control AtEXPA5 gene expression in Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* **71**, 380-387.
- Passmore, S., Elble, R. y Tye, B. K.** (1989). A protein involved in minichromosome maintenance in yeast binds a transcriptional enhancer conserved in eukaryotes. *Genes Dev* **3**, 921-35.
- Pautot, V., Dockx, J., Hamant, O., Kronenberger, J., Grandjean, O., Jublot, D. y Traas, J.** (2001). KNAT2: evidence for a link between knotted-like genes y carpel development. *Plant Cell* **13**, 1719-34.
- Payne, T., Johnson, S. D. y Koltunow, A. M.** (2004). KNUCKLES (KNU) encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the Arabidopsis gynoecium. *Development* **131**, 3737-49.
- Pekker, I., Alvarez, J. P. y Eshed, Y.** (2005). Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* **17**, 2899-910.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Bauman, E., Wisman, E. y Yanofsky, M. F.** (2000). B y C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-203.

- Pelaz, S., Tapia-Lopez, R., Alvarez-Buylla, E. R. y Yanofsky, M. F.** (2001). Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. *Curr Biol* **11**, 182-4.
- Pellegrini, L., Tan, S. y Richmond, T. J.** (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* **376**, 490-8.
- Pelletier, M. K., Murrell, J. R. y Shirley, B. W.** (1997). Characterization of flavonol synthase y leucoanthocyanidin dioxygenase genes in Arabidopsis. Further evidence for differential regulation of "early" y "late" genes. *Plant Physiol* **113**, 1437-45.
- Petersen, M., Sander, L., Child, R., Onckelen, H. v., Ulvskov, P. y Borkhardt, B.** (1996). Isolation y characterization of a pod dehiscence zone-specific polygalacturonase from *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* **31**, 517-527.
- Phan-Dinh-Tuy, F., Tuil, D., Schweighoffer, F., Pinset, C., Kahn, A. y Minty, A.** (1988). The 'CC.Ar.GG' box. A protein-binding site common to transcription-regulatory regions of the cardiac actin, c-fos y interleukin-2 receptor genes. *Eur J Biochem* **173**, 507-15.
- Pineiro, M., Gomez-Mena, C., Schaffer, R., Martinez-Zapater, J. M. y Coupland, G.** (2003). EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodeling factors y regulates flowering in Arabidopsis by repressing FT. *Plant Cell* **15**, 1552-62.
- Pinyopich, A., Ditta, G. S., Savidge, B., Liljegren, S. J., Baumann, E., Wisman, E. y Yanofsky, M. F.** (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel y ovule development. *Nature* **424**, 85-8.
- Poethig, R. S.** (2003). Phase change y the regulation of developmental timing in plants. *Science's STKE* **301**, 334.
- Pollock, R. y Treisman, R.** (1990). A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6197-6204.
- Pouteau, S. y Albertini, C.** (2009). The significance of bolting y floral transitions as indicators of reproductive phase change in Arabidopsis. *J Exp Bot* **60**, 3367-77.
- Prunet, N., Morel, P., Negrutiu, I. y Trehin, C.** (2009). Time to stop: flower meristem termination. *Plant Physiol* **150**, 1764-72.
- Prunet, N., Morel, P., Thierry, A. M., Eshed, Y., Bowman, J. L., Negrutiu, I. y Trehin, C.** (2008). REBELOTE, SQUINT, y ULTRAPETALA1 function redundantly in the temporal regulation of floral meristem termination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **20**, 901-19.
- Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L. D. y Coen, E.** (2007). Evolution y Development of Inflorescence Architectures. *Science* **316**, 1452-1456.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. y Coupland, G.** (1995). The *CONSTANS* gene of Arabidopsis promotes flowering y encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**, 847-857.
- Ragni, L., Belles-Boix, E., Gunl, M. y Pautot, V.** (2008). Interaction of KNAT6 y KNAT2 with BREVIPEDICELLUS y PENNYWISE in Arabidopsis inflorescences. *Plant Cell* **20**, 888-900.
- Rajani, S. y Sundaresan, V.** (2001). The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology* **11**, 1914-1922.
- Ratcliffe, O., Amaya, I., Vincent, C., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. y Bradley, D.** (1998). A common mechanism controls the life cycle y architecture of plants. *Development* **125**, 1609-1615.
- Ratcliffe, O. J., Kumimoto, R. W., Wong, B. J. y Riechmann, J. L.** (2003). Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING Gene Family: MAF2 Prevents Vernalization by Short Periods of Cold. *Plant Cell* **15**, 1159-1169.
- Redei, G. P.** (1962). Supervital Mutants of Arabidopsis. *Genetics* **47**, 443-60.
- Reeves, P. H. y Coupland, G.** (2001). Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double y triple mutants. *Plant Physiol* **126**, 1085-91.
- Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. y Kuhlemeier, C.** (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-60.

- Riechmann, J. L., Krizek, B. A. y Meyerowitz, E. M.** (1996a). Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, y AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4793-8.
- Riechmann, J. L., Wang, M. y Meyerowitz, E. M.** (1996b). DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA y AGAMOUS. *Nucleic Acids Res* **24**, 3134-41.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S. J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S. G., Hedden, P. et al.** (2008). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 2420-36.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A. y Murray, J. A.** (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-4.
- Roberts, J. A., Elliott, K. A. y Gonzalez-Carranza, Z. H.** (2002). Abscission, Dehiscence, y Other Cell Separation Processes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **53**, 131-158.
- Roeder, A., Lijegren, S., Ferrandiz, C. y Yanofsky, M.** (2005). Drawing a line in the Arabidopsis fruit. *Developmental Biology* **283**, 658-658.
- Roeder, A. H., Ferrandiz, C. y Yanofsky, M. F.** (2003). The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the Arabidopsis fruit. *Curr Biol* **13**, 1630-5.
- Rupp, H. M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. y Schmullig, T.** (1999). Increased steady state mRNA levels of the STM y KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing Arabidopsis thaliana indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* **18**, 557-63.
- Saiga, S., Furumizu, C., Yokoyama, R., Kurata, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Suzuki, M. y Komeda, Y.** (2008). The Arabidopsis OBERON1 y OBERON2 genes encode plant homeodomain finger proteins y are required for apical meristem maintenance. *Development* **135**, 1751-9.
- Sakai, H., Krizek, B. A., Jacobsen, S. E. y Meyerowitz, E. M.** (2000). Regulation of SUP Expression Identifies Multiple Regulators Involved in Arabidopsis Floral Meristem Development. *Plant Cell* **12**, 1607-1618.
- Sakai, H., Medrano, L. J. y Meyerowitz, E. M.** (1995). Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries. *Nature* **378**, 199-203.
- Salome, P. A., Bomblies, K., Laitinen, R. A., Yant, L., Mott, R. y Weigel, D.** (2011). Genetic Architecture of Flowering Time Variation in Arabidopsis thaliana. *Genetics*.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F. y Coupland, G.** (2000). Distinct Roles of CONSTANS Target Genes in Reproductive Development of Arabidopsis. *Science* **288**, 1613-1616.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santelli, E. y Richmond, T. J.** (2000). Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol* **297**, 437-49.
- Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A. y Imaizumi, T.** (2007). FKF1 y GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* **318**, 261-5.
- Scortecci, K., Michaels, S. D. y Amasino, R. M.** (2003). Genetic interactions between FLM y other flowering-time genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **52**, 915-22.
- Scortecci, K. C., Michaels, S. D. y Amasino, R. M.** (2001). Identification of a MADS box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. *The Plant Journal* **26**, 229-236.
- Scutt, C. P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Finet, C. y Dumas, C.** (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *J Exp Bot*.
- Schmid, M., Uhlenhaut, N. H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D. y Lohmann, J. U.** (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* **130**, 6001-12.
- Schomburg, F. M., Patton, D. A., Meinke, D. W. y Amasino, R. M.** (2001). FPA, a gene involved in floral induction in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *Plant Cell* **13**, 1427-36.

- Schonrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Kohler, C., Gruissem, W. y Hennig, L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev* **20**, 1667-78.
- Schubert, D., Clarenz, O. y Goodrich, J. (2005). Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 553-561.
- Schultz, E. A., Pickett, F. B. y Haughn, G. W. (1991). The *FLO10* gene product regulates the expression domain of homeotic genes *AP3* y *PI* in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **3**, 1221-1237.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N. y Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121-33.
- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P. J., Hansen, R., Tetens, F., Lönnig, W.-E., Saedler, H. y Sommer, H. (1992). Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding y autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J.* **11**, 251-263.
- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H. y Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 y SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **67**, 183-95.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S., Amasino, R. A. y Coupland, G. (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence y systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**, 898-912.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C. y Machida, Y. (2001). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation y repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-1783.
- Sessions, A., Nemhauser, J., McColl, A., Roe, J., Feldmann, K. y Zambryski, P. (1997). *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem y reproductive organs. *Development* **124**, 4481-4491.
- Sessions, A., Weigel, D. y Yanofsky, M. (1999). The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems y young primordia. *Plant J.* **20**, 259-263.
- Sessions, R. A. y Zambryski, P. C. (1995). *Arabidopsis* gynoecium structure in the wild type y in *ettin* mutants. *Development* **121**, 1519-32.
- Shani, E., Yanai, O. y Ori, N. (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 484-9.
- Sheldon, C. C., Burn, J. E., Perez, P. P., Metzger, J., Edwards, J. A., Peacock, W. J. y Dennis, E. S. (1999). The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization y methylation. *Plant Cell* **11**, 445-58.
- Shen, W. J. y Forde, B. G. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **17**, 8385.
- Shikata, M., Koyama, T., Mitsuda, N. y Ohme-Takagi, M. (2009). *Arabidopsis* SBP-box genes SPL10, SPL11 y SPL2 control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. *Plant Cell Physiol* **50**, 2133-45.
- Shimada, S., Ogawa, T., Kitagawa, S., Suzuki, T., Ikari, C., Shitsukawa, N., Abe, T., Kawahigashi, H., Kikuchi, R., Handa, H. et al. (2009). A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an APETALA1/FRUITFULL-like gene, VRN1, is upstream of FLOWERING LOCUS T. *Plant J* **58**, 668-81.
- Shindo, C., Aranzana, M. J., Lister, C., Baxter, C., Nicholls, C., Nordborg, M. y Dean, C. (2005). Role of FRIGIDA y FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**, 1163-73.
- Siegfried, K. R., Eshed, Y., Baum, S. F., Otsuga, D., Drews, G. N. y Bowman, J. L. (1999). Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* **126**, 4117-28.
- Simpson, G. G. y Dean, C. (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* **296**, 285-9.

- Simpson, G. G., Dijkwel, P. P., Quesada, V., Henderson, I. y Dean, C.** (2003). FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the Arabidopsis floral transition. *Cell* **113**, 777-87.
- Smith, H. M. S. y Hake, S.** (2003). The Interaction of Two Homeobox Genes, BREVIPEDICELLUS y PENNYWISE, Regulates Internode Patterning in the Arabidopsis Inflorescence. *Plant Cell* **15**, 1717-1727.
- Smykal, P., Gennen, J., De Bodt, S., Ranganath, V. y Melzer, S.** (2007). Flowering of strict photoperiodic Nicotiana varieties in non-inductive conditions by transgenic approaches. *Plant Mol Biol* **65**, 233-42.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. y Meyerowitz, E. M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 755-767.
- Sohlberg, J. J., Myrenas, M., Kuusk, S., Lagercrantz, U., Kowalczyk, M., Sandberg, G. y Sundberg, E.** (2006). STY1 regulates auxin homeostasis y affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. *Plant J.*
- Sommer, H., Beltrán, J. P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.-E., Saedler, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* **9**, 605-613.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J. y Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM Domain Proteins Interact with the R2R3-MYB Transcription Factors MYB21 y MYB24 to Affect Jasmonate-Regulated Stamen Development in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **23**, 1000-1013.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S. J., Ljung, K., Robles, P., Galvan-Ampudia, C. S., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, M. F. y Ostergaard, L.** (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **459**, 583-6.
- Spence, J., Vercher, Y., Gates, P. y Harris, N.** (1996). 'Pod shatter' in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* y *B. juncea*. *Journal of Microscopy* **181**, 195-203.
- Sridhar, V. V., Surendrarao, A. y Liu, Z.** (2006). APETALA1 y SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development* **133**, 3159-66.
- Staldal, V., Sohlberg, J. J., Eklund, D. M., Ljung, K. y Sundberg, E.** (2008). Auxin can act independently of CRC, LUG, SEU, SPT y STY1 in style development but not apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. *New Phytol* **180**, 798-808.
- Steeves, T. A. y Sussex, I. M.** (1989). Patterns in plant development. Cambridge New York Melbourne: Cambridge University Press.
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D.-Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G. y Alonso, J. M.** (2008). TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk y Plant Development. *Cell* **133**, 177-191.
- Stracke, R., De Vos, R., Bartelniewoehner, L., Ishihara, H., Sagasser, M., Martens, S. y Weisshaar, B.** (2009). Metabolomic y genetic analyses of flavonol synthesis in Arabidopsis thaliana support the in vivo involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase. *Planta* **229**, 427-445.
- Stracke, R., Ishihara, H., Hupé, G., Barsch, A., Mehrtens, F., Niehaus, K. y Weisshaar, B.** (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the Arabidopsis thaliana seedling. *The Plant Journal* **50**, 660-677.
- Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D. y Kim, S. K.** (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science* **302**, 249-55.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. y Coupland, G.** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock y the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* **410**, 1116-20.
- Suh, S. S., Choi, K. R. y Lee, I.** (2003). Revisiting phase transition during flowering in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **44**, 836-43.

- Sun, B., Xu, Y., Ng, K. H. y Ito, T.** (2009). A timing mechanism for stem cell maintenance y differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *Genes Dev* **23**, 1791-804.
- Sun, L. y van Nocker, S.** (2010). Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **10**, 152.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Ma, H. y Martienssen, R.** (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap y gene trap transposable elements. *Genes Dev.* **9**, 1797-810.
- Sundberg, E. y Ostergaard, L.** (2009). Distinct y dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001628.
- Sung, S., He, Y., Eshoo, T. W., Tamada, Y., Johnson, L., Nakahigashi, K., Goto, K., Jacobsen, S. E. y Amasino, R. M.** (2006). Epigenetic maintenance of the vernalized state in Arabidopsis thaliana requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat Genet* **38**, 706-10.
- Takada, S. y Goto, K.** (2003). Terminal flower2, an Arabidopsis homolog of heterochromatin protein1, counteracts the activation of flowering locus T by constans in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* **15**, 2856-65.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. y Ohmiya, A.** (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains y carotenoids. *The Plant Journal* **54**, 733-749.
- Tang, W. y Perry, S. E.** (2003). Binding site selection for the plant MADS domain protein AGL15: an in vitro y in vivo study. *J Biol Chem* **278**, 28154-9.
- Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J. et al.** (2008). Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell* **133**, 164-176.
- Teper-Bamnolker, P. y Samach, A.** (2005). The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 y FRUITFULL accumulation in Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **17**, 2661-75.
- Theissen, G. y Saedler, H.** (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature* **409**, 469-71.
- To, J. P., Haberer, G., Ferreira, F. J., Deruere, J., Mason, M. G., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Kieber, J. J.** (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**, 658-71.
- Tognetti, V. B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W. et al.** (2010). Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture y water stress tolerance. *Plant Cell* **22**, 2660-79.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. y Quail, P. H.** (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749-70.
- Tournois, J.** (1914). Etudes sur la sexualite du houblon.
- Treisman, R.** (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* **46**, 567-74.
- Triebenberg, S. J., Kingsbury, R. C. y McKnight, S. L.** (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* **2**, 718-729.
- Trigueros, M., Navarrete-Gomez, M., Sato, S., Christensen, S. K., Pelaz, S., Weigel, D., Yanofsky, M. F. y Ferrandiz, C.** (2009). The NGATHA genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium. *Plant Cell* **21**, 1394-409.
- Tsuchisaka, A. y Theologis, A.** (2004). Unique y overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol* **136**, 2982-3000.
- Tsuchisaka, A., Yu, G., Jin, H., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Zhang, X., Gao, S. y Theologis, A.** (2009). A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **183**, 979-1003.
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. y Shinozaki, K.** (2006). CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration y rehydration response in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **46**, 171-82.

- Urbanus, S. L., de Folter, S., Shchennikova, A. V., Kaufmann, K., Immink, R. G. y Angenent, G. C.** (2009). In planta localisation patterns of MADS domain proteins during floral development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **9**, 5.
- Usami, T., Horiguchi, G., Yano, S. y Tsukaya, H.** (2009). The more y smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development* **136**, 955-64.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. y Coupland, G.** (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science* **303**, 1003-1006.
- van Doorn, W. G. y Woltering, E. J.** (2008). Physiology y molecular biology of petal senescence. *J Exp Bot* **59**, 453-80.
- Veley, K. M. y Michaels, S. D.** (2008). Functional redundancy y new roles for genes of the autonomous floral-promotion pathway. *Plant Physiol* **147**, 682-95.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benkova, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C. y Friml, J.** (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**, 4521-31.
- Vivian-Smith, A. y Koltunow, A. M.** (1999). Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **121**, 437-51.
- Vivian-Smith, A., Luo, M., Chaudhury, A. y Koltunow, A.** (2001). Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 2321-2331.
- Wagner, D., Sablowski, R. W. n. M. y Meyerowitz, E. M.** (1999). Transcriptional Activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* **285**, 582-584.
- Wang, H., Caruso, L. V., Downie, A. B. y Perry, S. E.** (2004). The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* **16**, 1206-19.
- Wang, J. W., Czech, B. y Weigel, D.** (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**, 738-49.
- Wang, J. W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E. y Weigel, D.** (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes y CYP78A5/KLUH on plastochron length y organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 1231-43.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F. y Meyerowitz, E. M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**, 843-859.
- Weigel, D. y Jurgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-4.
- Weigel, D. y Nilsson, O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**, 495-500.
- Wellmer, F. y Riechmann, J. L.** (2010). Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends Genet* **26**, 519-27.
- Werner, J. D., Borevitz, J. O., Uhlenhaut, N. H., Ecker, J. R., Chory, J. y Weigel, D.** (2005a). FRIGIDA-independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *Genetics* **170**, 1197-207.
- Werner, J. D., Borevitz, J. O., Warthmann, N., Trainer, G. T., Ecker, J. R., Chory, J. y Weigel, D.** (2005b). Quantitative trait locus mapping y DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2460-5.
- Werner, T., Kollmer, I., Bartrina, I., Holst, K. y Schmullig, T.** (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**, 371-81.
- West, A. G., Causier, B. E., Davies, B. y Sharrocks, A. D.** (1998). DNA binding y dimerisation determinants of *Antirrhinum majus* MADS-box transcription factors. *Nucleic Acids Res* **26**, 5277-87.
- West, A. G. y Sharrocks, A. D.** (1999). MADS-box transcription factors adopt alternative mechanisms for bending DNA. *J Mol Biol* **286**, 1311-23.

- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U. y Weigel, D.** (2005). Integration of spatial y temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**, 1056-9.
- Wilmouth, R. C., Turnbull, J. J., Welford, R. W., Clifton, I. J., Prescott, A. G. y Schofield, C. J.** (2002). Structure y mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* **10**, 93-103.
- Wilson, R. N., Heckman, J. W. y Somerville, C. R.** (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* **100**, 403-408.
- Wittwer, S. H., Bukovac, M. J., Sell, H. M. y Weller, L. E.** (1957). Some Effects of Gibberellin on Flowering y Fruit Setting. *Plant Physiol* **32**, 39-41.
- Wolpert, L.** (1998). Principles of development. London ; New York; Oxford ; New York: Current Biology ; Oxford University Press.
- Wollmann, H., Mica, E., Todesco, M., Long, J. A. y Weigel, D.** (2010). On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 y AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Development* **137**, 3633-42.
- Wood, C. C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W. J., Dennis, E. S. y Helliwell, C. A.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14631-6.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D. y Poethig, R. S.** (2009). The sequential action of miR156 y miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* **138**, 750-9.
- Wu, G. y Poethig, R. S.** (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 y its target SPL3. *Development* **133**, 3539-47.
- Wurschum, T., Gross-Hardt, R. y Laux, T.** (2006). APETALA2 regulates the stem cell niche in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell* **18**, 295-307.
- Wynne, J. y Treisman, R.** (1992). SRF y MCM1 have related but distinct DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res* **20**, 3297-303.
- Xu, Z., Escamilla-Treviño, L., Zeng, L., Lalgondar, M., Bevan, D., Winkel, B., Mohamed, A., Cheng, C.-L., Shih, M.-C., Poulton, J. et al.** (2004). Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol* **55**, 343-367.
- Yadav, R. K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M. y Reddy, G. V.** (2009). Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4941-6.
- Yalovsky, S., Rodriguez-Concepcion, M., Bracha, K., Toledo-Ortiz, G. y Gruissem, W.** (2000). Prenylation of the floral transcription factor APETALA1 modulates its function. *Plant Cell* **12**, 1257-66.
- Yamaguchi, A., Wu, M. F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S. y Wagner, D.** (2009). The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, y APETALA1. *Dev Cell* **17**, 268-78.
- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. y Ori, N.** (2005). *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* **15**, 1566-71.
- Yang, Y., Fanning, L. y Jack, T.** (2003). The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, APETALA3 y PISTILLATA. *Plant J* **33**, 47-59.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A. y Meyerowitz, E. M.** (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **346**, 35-39.
- Yanovsky, M. J. y Kay, S. A.** (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**, 308-12.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X. y Schmid, M.** (2010). Orchestration of the floral transition y floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* **22**, 2156-70.
- Yu, H., Xu, Y., Tan, E. L. y Kumar, P. P.** (2002). AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *PNAS* **99**, 16336-16341.

Bibliografía

- Yun, J.-Y., Weigel, D. y Lee, I.** (2002). Ectopic Expression of SUPERMAN Suppresses Development of Petals y Stamens. *Plant Cell Physiol.* **43**, 52-57.
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T. T. y Chen, X.** (2007). miR172 regulates stem cell fate y defines the inner boundary of APETALA3 y PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems. *Plant J* **51**, 840-9.
- Zhao, Y.** (2010). Auxin Biosynthesis y Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 49-64.
- Zhao, Z., Andersen, S. U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S. J. y Lohmann, J. U.** (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* **465**, 1089-92.
- Zheng, Y., Ren, N., Wang, H., Stromberg, A. J. y Perry, S. E.** (2009). Global identification of targets of the Arabidopsis MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *Plant Cell* **21**, 2563-77.
- Zhou, X. y Su, Z.** (2007). EasyGO: Gene Ontology-based annotation y functional enrichment analysis tool for agronomical species. *BMC Genomics* **8**, 246.
- Zobell, O., Faigl, W., Saedler, H. y Munster, T.** (2010). MIKC* MADS-box proteins: conserved regulators of the gametophytic generation of land plants. *Mol Biol Evol* **27**, 1201-11.