

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

ANÁLISIS FUNCIONAL DE GENES REGULADORES DEL  
DESARROLLO FLORAL DE GISANTE (*Pisum sativum* L.) EN  
SISTEMAS HETERÓLOGOS

ANA BERBEL TORNERO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de Juliol de 2002 davant un tribunal format per:

- D. Vicente Conejero Tomás
- D. José Miguel Martínez-Zapater
- D. José Luis Micol Molina
- D. Juan Carbonell Gisbert
- D. Vicente Tordera Donderis

Va ser dirigida per:

D. Francisco Madveño Albt

D. Luis Antonio Cañas Clemente

D. José Pío Beltrán Porter

©Copyright: Servei de Publicacions  
Ana Berbel Tornero

---

Depòsit legal:

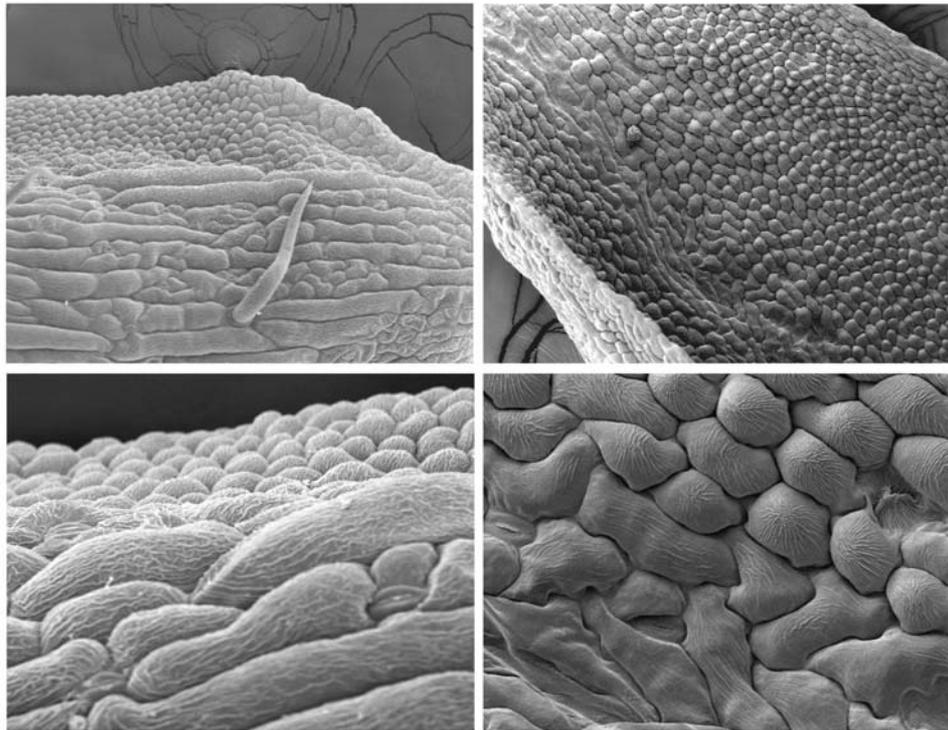
I.S.B.N.:84-370-6122-9

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



**Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo floral de guisante (*Pisum sativum* L.) en sistemas heterólogos**

TESIS DOCTORAL



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



**Análisis funcional de genes reguladores del  
desarrollo floral de guisante (*Pisum sativum* L.)  
en sistemas heterólogos**

Memoria presentada por  
ANA BERBEL TORNERO  
para optar al grado de  
DOCTORA en CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directores

Dr. FRANCISCO MADUEÑO ALBI  
Dr. LUIS ANTONIO CAÑAS CLEMENTE  
Dr. JOSÉ PÍO BELTRÁN PORTER

Valencia, 2002

D. José Pío Beltrán Porter, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación, D. Francisco Madueño Albi, Doctor en Ciencias Biológicas, Científico Titular y D. Luis Antonio Cañas Clemente, Doctor en Ciencias Biológicas, Científico Titular, todos ellos 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,

CERTIFICAN que,

Doña Ana Berbel Tornero, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo floral de guisante (*Pisum sativum* L.) en sistemas heterólogos”, presenta para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 10 de Mayo de 2002.

Fdo: Dr. Francisco Madueño Albi

Fdo: Dr. Luis Antonio Cañas Clemente

Fdo: Dr. José Pío Beltrán Porter

**Si lloras por haber perdido el sol,  
las lágrimas no te dejarán ver las  
estrellas**

**Rabindranath tagore**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han compartido conmigo todos estos años y por la ayuda incondicional que me han prestado.

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, Dr. Francisco Madueño Albi, Dr. Luis Antonio Cañas Clemente y Dr. José Pío Beltrán Porter, por confiar en mí desde el principio, por ser además de mis jefes unos excelentes guías y consejeros.

A todo el personal del IBMCP (Administración y Servicios), cuya tarea ha sido de un modo u otro imprescindible para la elaboración de esta Tesis, especialmente a Eugenio por ayudarme en mi lucha contra el pictógrafo, por su buen humor y por estar siempre ahí; a Santiago, por su amabilidad y por librarnos de las peleas con las centrífugas, congeladores y demás aparatos; a Alexis, por mantener con vida mi maltratado ordenador; a todo el equipo del invernadero, especialmente a Rafa, Toni y Mireia, que tanto y tan bien han cuidado de mis plantas y por sus constantes idas y venidas al centro para recoger mis bandejas. A Asumpta por su eficacia en la búsqueda de artículos y por estar siempre dispuesta a ayudar. A Manuel Planes y Juan A. Fayos, del Servicio de microscopía de la UPV, por facilitarme el trabajo de microscopía electrónica.

Y para que hablar de mis compañeras y compañeros de L.10 y L.11, sin los cuales no puedo imaginar ni uno sólo de los días que he pasado en el IBMCP. A mi Cristina, quien cualquier día aparecerá en las enciclopedias como sinónimo de la palabra bondad. Con ella siempre pude contar para ayudarme en los experimentos, cuando necesité sus consejos y sobre todo por todos los momentos que vivimos juntas (buenos y no tan buenos). No sabes cuánto te echo de menos. A MD, la asertividad hecha mujer, quien me brindó desde el primer día no solo su ayuda y consejo sino también su amistad y cariño (mil gracias). A Edelín por ser la alegría y el ritmo del laboratorio, por su amistad y por contagiarme la fortaleza con la que afrontas la vida. A Majo, continuamente preocupada por mí; no sabes la tranquilidad que da saber que siempre estarás allí cuando te necesite. Gracias por tu confianza. A Teresa “la Mc Giver de Valverde”; hacia ella tengo un cóctel de sentimientos: cariño como el que se tiene a una madre (joven claro), respeto como el que se procesa a quien te transmite sus conocimientos, complicidad como la que sólo existe entre dos buenas amigas, en fin, gratitud por ser como eres. A Paco le agradezco, entre otras cosas, por introducirme en la Biología Molecular y contagiarme de su entusiasmo por el trabajo en el laboratorio, el animarme en los momentos en los que la presión parecía insalvable, pero por encima de todo esto por ser un buen amigo. A la sección *in vitro* del laboratorio, Rosa, Amparo y Roberto por su apoyo incondicional y constantes ánimos. A Noelia y Reyes, las benjamins del grupo, siempre tan unidas que parecen una, pero una con un enorme corazón. Gracias por vuestro cariño. A Pepa cuya estancia entre nosotros trajo la alegría y el

salero de la gente del sur. A Alicia, Mónica, Laura, Ana, Liz y Antonio, por vuestra preocupación y por estar ahí cuando os necesité. A Mati que hizo que su alegría se respirara entre plantas, centrifugas y tubos de ensayo. A Juanma, mi compañero de café matinal, que pasó conmigo largas horas de trabajo en el invernadero. A Cristina Ferrándiz, por sus buenos consejos. Gracias compis por todos los buenos momentos que me habéis dado.

A Javier Pozueta y a Teresiña, con los que compartí muy buenos ratos junto a las cabinas de flujo, durante mis primeros años en el IBMCP. A Riadh por sus consejos sobre cultivo de plantas.

A Cristina y a M<sup>a</sup> Ángeles las llevaré siempre en mi corazón por el cariño que han demostrado tenerme, cariño que saben que es completamente recíproco (conoceros es quereros). A Juan, con quien he compartido durante estos años las tertulias deportivas de los lunes y por ser un compañero inmejorable.

A los compañeros maravillosos de los laboratorios L.12, L.13, L.14 y L.20, de antes y de ahora, que han hecho más agradable el día a día y por los buenos momentos durante las comidas, especialmente a Ana y a M<sup>a</sup> Jesús, por sus palabras siempre cariñosas, a José Luis por sus frases de ánimo, a Miguel Ángel Pérez, por estar siempre dispuesto a ayudar y por sus buenos consejos sobre el doble híbrido. A Marta por su simpatía y afecto, a Miguel Ángel Blázquez por ofrecerme parte de sus conocimientos sobre la floración en *Arabidopsis* y por sus ánimos. Y a la gente de los demás laboratorios por su calidad humana y el apoyo recibido.

A Mercedes, le agradezco su amistad (no te olvido), a Karina por ayudarme a superar la etapa más difícil de esta tesis y a Susana por su preocupación y ayuda en todo momento.

A Cristina y a Gabino, mis hermanos en Alemania, por haberme acogido tan maravillosamente, nunca olvidaré todo lo que hicisteis por mí. También un recuerdo para Alejandro, Rosa, Mireia y Antonio, que completaban la colonia española en el Instituto Max Planck y me introdujeron en el cicloturismo.

Agradezco al Dr. Hans Sommer la oportunidad de trabajar en su laboratorio y de haber compartido poyata (todo un honor) y a Mario Roccaro su dedicación y paciencia para enseñarme todo lo que sé acerca del doble híbrido. Al resto de gente de ese laboratorio, Isa, Mingai, Okram y en especial a Andreas por su hospitalidad y amistad.

A M. Yanofsky por la línea 35S::*AP1 ap1-1*, a R. Elliot y E. Coen por la sonda de *NFL*, a B. Davies y H. Sommer por las sondas de *NTGLO* y *NTDEF*. A A. Leyva por proporcionarme el vector pBinJIT60.

A Santi, Andrés, Jocelyn, Mauricio, Favio Aurelio, Favian, Amedeo, Curro, Miroslav, Pablo, Carlos, David, Rubén, Cristian, Vicente, Fco. Joaquín, Miguel Ángel y al resto del grupo, por haber hecho que se cumpliera una de mis ilusiones (AMUNTI!).

A mis amigos Carlos, Vicente y Eva, por ayudarme a desconectar los fines de semana.

A mis padres les agradezco el enorme esfuerzo que han hecho para que yo pueda ahora entregar este trabajo, por haber aguantado mis nervios y desánimos y por enseñarme la verdadera escala de valores. Gracias por haber estado siempre conmigo y no cambiéis nunca. A mi hermano y a Inma, por estar a mi lado en los momentos difíciles, por su interés, su ánimo y por darme dos motivos más para continuar: María y Olga. Al resto de mi familia y en especial a mi abuela.

A la familia de Raúl, Ino, Pili, Silvia, David y Belén, por haberme demostrado vuestro cariño durante todo este tiempo y haberme ayudado a llevar las cosas con más tranquilidad.

A Raúl, por confiar siempre en mí, por tu paciencia y sacrificio, por animarme y hacerme reír cuando estaba triste y hundida, por no dejar que tirara la toalla; sin tí nunca hubiera acabado esta tesis que es tan tuya como mía. Gracias por tu comprensión y apoyo y sobre todo por tu amor infinito. Que suerte he tenido al encontrarte y que fácil es quererte.

El presente trabajo ha sido financiado por una beca Predoctoral de Formación de personal Investigador, concedida por la Consellería de Cultura, Educació i Ciència (Generalitat Valenciana).

**A Raúl**  
**A mis padres**

|             |    |
|-------------|----|
| ÍNDICE..... | IX |
|-------------|----|

|                    |     |
|--------------------|-----|
| ABREVIATURAS ..... | XVI |
|--------------------|-----|

|  |    |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 1. El desarrollo del tallo en las angiospermas: meristemos vegetativos y reproductivos .....   | 3  |
| 2. La floración en los sistemas modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Antirrhinum majus</i> .....  | 4  |
| 2.1. Arquitectura de la inflorescencia de <i>Arabidopsis</i> .....   | 4  |
| 2.2. Inducción floral en <i>Arabidopsis</i> .....  | 5  |
| 2.2.1. Genes que promueven la transición floral.....   | 6  |
| 2.2.1.1. La ruta de promoción autónoma .....   | 6  |
| 2.2.1.2. La ruta de promoción por fotoperiodo .....  | 7  |
| 2.2.1.3. La ruta de promoción por vernalización .....  | 8  |
| 2.2.1.4. La ruta de promoción por giberelinas.....   | 9  |
| 2.2.2. Genes que reprimen la transición floral.....  | 9  |
| 2.2.3. Integración de las señales que promueven la floración en <i>Arabidopsis</i> .....   | 10 |
| 2.3. Fase reproductiva en <i>Arabidopsis</i> y <i>Antirrhinum</i> .....  | 12 |
| 2.3.1. Control genético del proceso de iniciación floral (FLIP).....   | 12 |
| 2.3.1.1. Especificación temprana de la identidad del meristemo floral .....  | 13 |
| 2.3.1.2. Especificación tardía de la identidad del meristemo floral y<br>mantenimiento del programa floral .....                             | 19 |
| 2.3.2. Control genético de la identidad de los órganos florales.....   | 20 |
| 2.3.2.1. Modelo ABC.....   | 20 |
| 2.3.2.2. La controversia de la función A: el proceso de iniciación floral<br>y la función A en <i>Arabidopsis</i> y <i>Antirrhinum</i> ..... | 23 |
| 2.3.2.3. Modelo ABCD .....   | 24 |
| 2.3.2.4. Genes MADS .....  | 29 |
| 2.3.2.5. Regulación del patrón de expresión de los genes de identidad de<br>órganos florales .....   | 31 |
| 2.3.2.5.1. Regulación de los genes de clase A y C .....  | 32 |
| 2.3.2.5.2. Regulación de los genes de clase B.....   | 33 |
| 3. La floración en guisante.....   | 38 |
| 3.1. Inducción floral en guisante.....   | 39 |
| 3.1.1. Sucesos que tienen lugar en la hoja.....  | 40 |
| 3.1.1.1. Percepción de la luz.....   | 40 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.1.2. Producción de mensajeros: mutaciones que afectan a la<br>síntesis del inhibidor.....  | 41        |
| 3.1.1.3. Producción de mensajeros: mutaciones que afectan a la<br>síntesis del estímulo floral .....   | 41        |
| 3.1.2. Sucesos que tienen lugar en el ápice: recepción de la señal floral .....  | 42        |
| 3.1.3. Modelo para la inducción floral en guisante .....   | 42        |
| 3.2. Control genético de la iniciación floral.....   | 45        |
| 3.2.1. Especificación de la identidad del meristemo inflorescente primario ( $I_1$ )<br>y del meristemo inflorescente secundario ( $I_2$ ) ..... | 45        |
| 3.2.2. Especificación de la identidad del meristemo floral .....   | 48        |
| 3.3. Desarrollo de los órganos florales.....   | 52        |
| 4. Antecedentes .....  | 54        |
| 5. Objetivos .....   | 57        |
| <b>II. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>59</b> |
| 1. Material biológico .....  | 61        |
| 1.1. Material vegetal .....  | 61        |
| 1.1.1. Condiciones de cultivo de plantas.....  | 61        |
| 1.1.1.1. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> en macetas .....   | 61        |
| 1.1.1.2. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> en cajas de Petri .....  | 62        |
| 1.1.1.3. Cultivo de <i>Nicotiana tabacum</i> en macetas .....  | 63        |
| 1.1.1.4. Cultivo de <i>Nicotiana tabacum</i> en cajas de Petri.....  | 63        |
| 1.1.2. Fertilización cruzada .....   | 64        |
| 1.2. Microorganismos .....   | 64        |
| 1.2.1. Cepas bacterianas .....   | 64        |
| 1.2.2. Cepas de levadura .....   | 65        |
| 1.2.3. Condiciones de cultivo de microorganismos .....   | 67        |
| 1.2.4. Medios de cultivo.....  | 67        |
| 2. Preparación de muestras vegetales para microscopía electrónica de barrido (SEM) .....   | 69        |
| 2.1. Fijación .....  | 69        |
| 2.2. Punto crítico y análisis de las muestras.....   | 69        |
| 3. Vectores plasmídicos .....  | 69        |
| 4. Transformación de bacterias .....   | 71        |
| 4.1. Preparación de células competentes y métodos de transformación.....   | 71        |
| 4.1.1. Transformación mediante choque térmico .....  | 71        |
| 4.1.2. Transformación por electroporación .....  | 72        |

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Selección de recombinantes bacterianos.....  | 72 |
| 5. Transformación de levaduras .....  | 73 |
| 5.1. Métodos de transformación de levaduras .....   | 73 |
| 5.1.1. Transformación de levaduras a pequeña escala .....   | 73 |
| 5.1.2. Transformación de levaduras a gran escala .....  | 74 |
| 5.2. Selección de recombinantes de levadura .....   | 75 |
| 6. Transformación de plantas .....  | 75 |
| 6.1. Diseño de las construcciones para la expresión constitutiva de <i>PEAM1</i> , <i>PEAM4</i><br>y <i>PEAM6</i> en <i>Nicotiana tabacum</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 75 |
| 6.2. Transformación de <i>Nicotiana tabacum</i> .....   | 76 |
| 6.3. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 77 |
| 6.4. Análisis fenotípico y genotípico de las líneas transgénicas .....  | 79 |
| 7. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.....  | 82 |
| 7.1. Aislamiento de DNA plasmídico.....   | 82 |
| 7.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> .....   | 82 |
| 7.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 82 |
| 7.1.3. Aislamiento de DNA plasmídico de levadura .....  | 83 |
| 7.2. Extracción y purificación de RNA total.....  | 84 |
| 7.3. Extracción y purificación de mRNA.....   | 84 |
| 8. Manipulación de ácidos nucleicos .....   | 85 |
| 8.1. Reacciones enzimáticas .....   | 85 |
| 8.1.1. Digestión con enzimas de restricción.....  | 85 |
| 8.1.2. Tratamientos con enzimas modificadores.....  | 85 |
| 8.1.2.1. Defosforilación de extremos cohesivos (5' protuberantes).....  | 85 |
| 8.1.2.2. Fosforilación de extremos cohesivos .....  | 85 |
| 8.1.2.3. Reacciones de ligación .....   | 86 |
| 8.2. Aislamiento de cDNAs por retrotranscripción y amplificación por PCR.....   | 86 |
| 8.2.1. Síntesis de cDNA por retrotranscripción de mRNA .....  | 86 |
| 8.2.2. Amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA .....  | 86 |
| 8.3. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....   | 87 |
| 8.4. Análisis Northern.....   | 88 |
| 8.4.1. Electroforesis en gel de formaldehído-agarosa.....   | 88 |
| 8.4.2. Transferencia de RNA a membrana .....  | 88 |
| 8.4.3. Fragmentos utilizados para la preparación de sondas .....  | 88 |
| 8.4.4. Marcaje de sondas.....   | 88 |
| 8.4.5. Hibridación y lavados .....  | 89 |

|   |            |
|---|------------|
| 8.4.6. Detección de la señal .....  | 90         |
| 9. Secuenciación .....  | 90         |
| 9.1. Análisis de secuencias .....   | 90         |
| 10. Sistema del doble híbrido .....   | 91         |
| 10.1. Verificación del fenotipo de las cepas de levadura .....  | 91         |
| 10.1.1. Requerimientos nutricionales .....  | 91         |
| 10.1.2. Verificación del fenotipo <i>ade2</i> .....   | 91         |
| 10.2. Diseño de las construcciones híbridas para el sistema del doble híbrido.....  | 92         |
| 10.2.1. Construcción de los genes de fusión para testar la interacción entre<br>dos proteínas MADS de guisante previamente conocidas..... | 92         |
| 10.2.2. Construcción de una genoteca de cDNA de guisante en un vector de expresión<br>en levaduras.....                                   | 92         |
| 10.2.3. Construcción del cebo.....  | 96         |
| 10.3. Ensayo de la interacción entre proteínas mediante el ensayo del doble híbrido....   | 96         |
| 10.3.1. Ensayo de la actividad de las proteínas codificadas por los genes<br>delatores.....   | 97         |
| 10.3.1.1. Ensayo de la expresión del gen <i>HIS3</i> .....  | 97         |
| 10.3.1.2. Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa sobre colonias<br>extendidas en filtro .....                                      | 97         |
| 10.3.1.3. Ensayo en líquido de la actividad $\beta$ -galactosidasa usando como<br>sustrato el ONPG.....                                   | 98         |
| 10.3.1.4. Ensayo de activación del gen <i>ADE2</i> .....  | 99         |
| 10.3.2. Ensayo de la interacción entre PEAM4 y PEAM6.....   | 99         |
| 10.3.3. Rastreo de la genoteca de expresión en levaduras de cDNA de guisante<br>mediante el sistema del doble híbrido .....               | 100        |
| <b>III. RESULTADOS .....</b>  | <b>103</b> |
| 1. Análisis funcional de <i>PEAM1</i> mediante su expresión constitutiva en sistemas<br>transgénicos heterólogos .....                    | 105        |
| 1.1. Análisis funcional de <i>PEAM1</i> en plantas transgénicas de <i>Nicotiana tabacum</i> ....  | 105        |
| 1.1.1. Caracterización morfológica de las líneas transgénicas de tabaco<br>35S: <i>PEAM1</i> .....  | 107        |
| 1.1.1.1. Conversión homeótica del primer verticilo de las flores de tabaco<br>35S: <i>PEAM1</i> .....                                     | 108        |
| 1.1.1.2. Conversión homeótica del cuarto verticilo de las flores de tabaco<br>35S: <i>PEAM1</i> .....                                     | 112        |

|   |     |
|---|-----|
| 1.1.1.3. Análisis de la expresión de los genes endógenos de tabaco de función B en las plantas transgénicas 35S: <i>PEAM1</i> .....   | 117 |
| 1.2. Análisis funcional de <i>PEAM1</i> en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 119 |
| 1.2.1. Caracterización morfológica de las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> 35S:: <i>PEAM1</i> .....  | 121 |
| 1.2.1.1. Fenotipo floral resultante de la expresión constitutiva de <i>PEAM1</i> en <i>Arabidopsis</i> .....  | 122 |
| 1.3. Estudio funcional del gen <i>PEAM1</i> de guisante mediante la complementación genética de mutantes de <i>Arabidopsis</i> .....  | 128 |
| 1.3.1. Complementación genética de la mutación <i>pistillata1</i> de <i>Arabidopsis</i> con el gen <i>PEAM1</i> .....   | 128 |
| 1.3.2. Ensayo de complementación de la mutación <i>apetala3</i> de <i>Arabidopsis</i> con el gen <i>PEAM1</i> .....   | 134 |
| 2. Análisis funcional de <i>PEAM4</i> mediante su expresión constitutiva en sistemas transgénicos heterólogos.....  | 139 |
| 2.1. Análisis funcional de <i>PEAM4</i> en plantas transgénicas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....   | 140 |
| 2.1.1. Transformación de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> con una construcción sentido 35S:: <i>PEAM4</i> .....  | 140 |
| 2.1.1.1. Caracterización del fenotipo de adelanto de floración de las líneas transgénicas de tabaco 35S:: <i>PEAM4</i> .....  | 143 |
| 2.1.1.2. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> en la arquitectura de la inflorescencia de tabaco .....  | 145 |
| 2.1.1.3. Fenotipo de las líneas de tabaco con 35S:: <i>PEAM4</i> insertado en más de un <i>loci</i> .....   | 149 |
| 2.1.1.4. Inhibición de la floración en tabaco por la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> .....   | 150 |
| 2.1.1.4.1. Análisis del fenotipo de la progenie de las plantas de tabaco 35S:: <i>PEAM4.48</i> de floración inhibida .....  | 157 |
| 2.1.1.4.2. Análisis de la expresión del transgén <i>PEAM4</i> y de los genes endógenos de tabaco <i>NAP1-1</i> , <i>NAP1-2</i> y <i>NFL</i> en las plantas 35S:: <i>PEAM4.48</i> con floración inhibida ..... | 160 |
| 1.1.2. Transformación de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> con una construcción antisentido 35S:: <i>PEAM4AS</i> .....  | 163 |
| 2.2. Análisis funcional de <i>PEAM4</i> en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 168 |
| 2.2.1. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> en el tiempo de floración de <i>Arabidopsis</i> .....  | 170 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.2.2. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> sobre la arquitectura de <i>Arabidopsis</i> .....   | 174 |
| 2.3. Estudio funcional del gen <i>PEAM4</i> de guisante mediante la complementación genética del mutante <i>ap1-1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 176 |
| 2.3.1. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> en el tiempo de floración del mutante <i>ap1-1</i> de <i>Arabidopsis</i> .....                  | 180 |
| 2.3.2. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> sobre la arquitectura de la inflorescencia del mutante <i>ap1-1</i> de <i>Arabidopsis</i> ..... | 180 |
| 2.3.3. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> sobre el fenotipo floral del mutante <i>ap1-1</i> de <i>Arabidopsis</i> .....                   | 186 |
| 3. Análisis funcional de <i>PEAM6</i> mediante su expresión constitutiva en sistemas transgénicos heterólogos.....   | 189 |
| 3.1. Análisis funcional de <i>PEAM6</i> en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....   | 190 |
| 3.1.1. Caracterización de las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> , ecotipo Columbia, 35S:: <i>PEAM6</i> .....                                       | 190 |
| 3.1.1.1. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM6</i> en el tiempo de floración de plantas de <i>Arabidopsis</i> del ecotipo Col. ....              | 193 |
| 3.1.1.2. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM6</i> sobre la arquitectura de plantas de <i>Arabidopsis</i> del ecotipo Col.....                   | 197 |
| 3.1.1.3. Caracterización molecular de la atenuación del fenotipo 35S:: <i>PEAM6</i> en las líneas homocigotas T-10 y T-44.....                             | 204 |
| 3.1.2. Caracterización de las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> , ecotipo Landsberg <i>erecta</i> , 35S:: <i>PEAM6</i> .....                       | 206 |
| 3.1.2.1. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM6</i> en el tiempo de floración de plantas de <i>Arabidopsis</i> del ecotipo Ler. ....              | 208 |
| 3.1.2.2. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM6</i> sobre la arquitectura de plantas de <i>Arabidopsis</i> del ecotipo Ler.....                   | 208 |
| 3.2. Análisis funcional de <i>PEAM6</i> en plantas transgénicas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....  | 212 |
| 3.3. Interacción de <i>PEAM6</i> con otros polipéptidos.....   | 216 |
| 3.3.1. Ensayo de la interacción entre las proteínas <i>PEAM6</i> y <i>PEAM4</i> mediante el sistema del doble híbrido.....                                 | 216 |
| 3.3.2. Rastreo de una genoteca de cDNA de ápices florales de guisante usando como cebo los productos de los genes MADS <i>PEAM4</i> y <i>PEAM6</i> .....   | 220 |
| 3.3.3. Interacciones genéticas entre los transgenes 35S:: <i>PEAM6</i> y 35S:: <i>PEAM4</i> ....   | 223 |
| 3.3.3.1. Efecto de la expresión constitutiva y simultánea de <i>PEAM4</i> y <i>PEAM6</i> en el tiempo de floración de <i>Arabidopsis</i> .....             | 223 |

|   |            |
|---|------------|
| 3.3.3.2. Efecto de la expresión constitutiva y simultánea de <i>PEAM4</i> y <i>PEAM6</i> en la arquitectura de <i>Arabidopsis</i> .....   | 225        |
| <b>IV. DISCUSIÓN .....</b>  | <b>233</b> |
| 1. Estudio funcional de <i>PEAM1</i> .....  | 235        |
| 1.1. La expresión constitutiva de <i>PEAM1</i> en sistemas transgénicos heterólogos apoya la hipótesis de que éste funcione como un gen de identidad de órgano de tipo B .....                                      | 235        |
| 1.1.1. Expresión constitutiva de <i>PEAM1</i> en tabaco .....   | 236        |
| 1.1.2. Expresión constitutiva de <i>PEAM1</i> en <i>Arabidopsis</i> .....   | 239        |
| 1.2. Los ensayos de complementación con <i>PEAM1</i> de mutantes de identidad de órgano floral de clase B de <i>Arabidopsis</i> apoyan la hipótesis de que <i>PEAM1</i> es el homólogo funcional de <i>PI</i> ..... | 241        |
| 2. Estudio funcional de <i>PEAM4</i> .....  | 244        |
| 2.1. Efecto de la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> en el tiempo de floración y la arquitectura de la inflorescencia de <i>Arabidopsis</i> y tabaco .....  | 245        |
| 2.2. Un nuevo fenotipo de floración inhibida causado por la expresión constitutiva de <i>PEAM4</i> en tabaco .....  | 247        |
| 2.3. El papel de la prenilación en la actividad de <i>AP1</i> .....   | 250        |
| 2.4. <i>PEAM4</i> y la función A en guisante .....  | 251        |
| 3. Estudio funcional de <i>PEAM6</i> .....  | 252        |
| 4. Interacción entre los polipéptidos <i>PEAM6</i> y <i>PEAM4</i> .....   | 255        |
| 5. Utilidad de la expresión constitutiva como abordaje al estudio funcional de genes MADS .....   | 260        |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>263</b> |
| <b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>267</b> |

## ABREVIATURAS

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| 3-AT                             | 3-amino-1,2,4-triazol  |
| $\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]dCTP | trifosfato de desoxicitosina marcado en posición $\alpha$ con fósforo 32 |
| aá                               | aminoácidos  |
| AcLi                             | acetato de litio   |
| AD                               | dominio de activación del factor transcripcional GAL4                    |
| AMV-RT                           | transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de las aves         |
| 6-BAP                            | 6-bencil-aminopurina   |
| CaMV 35S                         | promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor                        |
| cDNA                             | DNA complementario   |
| Col                              | ecotipo Columbia   |
| C-terminal                       | carboxi terminal   |
| cv.                              | cultivar   |
| DC                               | fotoperiodo de día corto   |
| dccDNA                           | DNA complementario de doble cadena                                       |
| DL                               | fotoperiodo de día largo   |
| DMF                              | N,N-dimetilformamida   |
| DMSO                             | dimetil sulfóxido  |
| DNA                              | ácido desoxirribonucleico  |
| DNA-BD                           | dominio de unión a DNA del factor transcripcional GAL4                   |
| dN <sub>4</sub> TPs              | desoxirribonucléotidos   |
| D.O.                             | densidad óptica  |
| DTT                              | ditiotreitól   |
| EDTA                             | etilen-diamino-tetraacetato sódico                                       |
| h                                | horas  |
| IAA                              | ácido indolacético   |
| IPTG                             | isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido                                     |
| kb                               | kilobases  |
| kV                               | kilovoltios  |
| LB                               | medio Luria-Bertani  |
| Ler                              | ecotipo Landsberg, portador de la mutación <i>erecta</i>                 |
| M                                | molar  |
| MES                              | ácido 4-morfolino-etano-sulfónico  |
| min                              | minutos  |
| MOPS                             | ácido 3-morfolino-propano-sulfónico                                      |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| mRNA                     | RNA mensajero   |
| MS                       | medio de Murashige y Skoog (incluyendo vitaminas)       |
| MMLV-RT                  | transcriptasa reversa del Moloney murine leukemia virus |
| °C                       | grados centígrados                                      |
| ONPG                     | o-nitrofenil β-D-galactopiranosido                      |
| p                        | peso  |
| pb                       | pares de bases  |
| PCR                      | reacción en cadena de la polimerasa                     |
| PEG                      | polietilen glicol                                       |
| PSE                      | fosfato-SDS-EDTA  |
| RNA                      | ácido ribonucleico                                      |
| RNA poli(A) <sup>+</sup> | RNA mensajero poliadenilado                             |
| rRNA                     | RNA ribosómico  |
| rpm                      | revoluciones por minuto                                 |
| RT-PCR                   | retrotranscripción seguida de PCR                       |
| s                        | segundos  |
| sccDNA                   | DNA complementario de simple cadena                     |
| SEM                      | microscopía electrónica de barrido                      |
| SD                       | medio mínimo sintético                                  |
| SDS                      | n-dodecil sulfato sódico                                |
| TBE                      | 90 mM (1x) Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA          |
| TE                       | 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA                                 |
| Tris                     | 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol                  |
| v                        | volumen   |
| WT                       | silvestre   |
| X-Gal                    | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido         |

# ***INTRODUCCIÓN***



## **1. EL DESARROLLO DEL TALLO EN LAS ANGIOSPERMAS: MERISTEMOS VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS**

En las plantas, el continuo proceso de desarrollo y diferenciación de órganos es posible gracias a unas estructuras especiales, conocidas como meristemos, que están formados por células indiferenciadas, que se dividen de manera organizada (Evans y Barton, 1997) y que se localizan tanto en el extremo de los tallos en crecimiento (meristemo apical del tallo) como en el de las raíces (meristemo apical de raíz). Excepto los cotiledones, todos los órganos de la parte aérea de la planta derivan del meristemo apical del tallo (SAM). En el SAM se distinguen una zona central, donde la división de las células es lenta, que tiene la función de mantener el meristemo, y una zona periférica, donde la división es rápida, en la que parte de las células presentes son reclutadas para la formación de primordios de órganos laterales y de meristemos axilares, de distinta naturaleza en función de la fase del ciclo de vida de la planta.

Durante el desarrollo vegetativo, el meristemo apical del tallo diferencia, en posiciones laterales denominadas nudos, órganos vegetativos, como es el caso de los primordios de hojas, asociados a meristemos axilares que darán lugar a ramas laterales. Como consecuencia de la inducción floral el meristemo apical del tallo se transforma en meristemo de inflorescencia que durante el proceso de iniciación floral (FLIP) dará lugar, en los nudos, a la formación de meristemos florales. Los meristemos florales iniciarán a su vez la formación de los primordios de órganos florales en sus flancos, de forma análoga a la diferenciación de órganos laterales a lo largo del meristemo apical; sin embargo, el meristemo floral muestra diferencias drásticas con los meristemos vegetativo e inflorescente en lo relativo a la posición de los órganos laterales con respecto al eje central (filotaxis) y en la distancia entre los órganos laterales. Se ha considerado que las flores y los brotes vegetativos son estructuras fundamentalmente equivalentes. Esta idea ya fue propuesta por Goethe, en su ensayo "La metamorfosis de las plantas" (1790) y autores como Coen y Carpenter (1993) la han desarrollado teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: (i) los diferentes órganos de la flor son equivalentes a hojas, (ii) tanto los órganos de las flores como las hojas están separadas por entrenudos, aunque en el caso de la flor son tan cortos que apenas se distinguen, (iii) los órganos de la flor y las hojas tienen normalmente una filotaxis diferente, (iv) el crecimiento indeterminado que caracteriza a los brotes vegetativos e inflorescentes está suprimido en el caso de las flores, tanto lateral, ya que los órganos florales no llevan meristemos en sus axilas, como apicalmente, ya que la región central del meristemo floral, una vez iniciada la formación del órgano reproductivo femenino, no continúa produciendo células meristemáticas; la formación de la flor termina el desarrollo del

meristemo floral. Desde este punto de vista, el desarrollo de las flores depende de esas cuatro variables: la identidad de los órganos, la longitud de los entrenudos, la filotaxis y el crecimiento determinado.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios genéticos y moleculares en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* han proporcionado en los últimos años un gran avance en la comprensión de los mecanismos que controlan la transición, la iniciación y el desarrollo floral.

## **2. LA FLORACIÓN EN LOS SISTEMAS MODELO *Arabidopsis thaliana* Y *Antirrhinum majus***

### **2.1. ARQUITECTURA DE LA INFLORESCENCIA DE *Arabidopsis***

Durante el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis thaliana*, el meristemo apical del tallo da lugar a una roseta, como consecuencia de la producción reiterada de hojas en ausencia de elongación de entrenudos del tallo, hasta el momento en el que se produce la inducción floral. Teniendo en cuenta el tamaño, la forma y la disposición de las hojas, así como la distribución de los tricomas en las superficies abaxial y adaxial de las mismas, se pueden diferenciar tres etapas durante el desarrollo vegetativo. En la fase juvenil, la primera etapa, las hojas son pequeñas y redondas, sin tricomas en el envés y se inician como parejas opuestas (roseta juvenil). En la fase adulta, la segunda etapa, las hojas son más grandes y ovaladas con tricomas en ambas superficies y aparecen siguiendo una filotaxis espiral (roseta adulta). En la última etapa del desarrollo vegetativo, las hojas son lanceoladas (caulinares) con pocos tricomas en el haz y su aparición muestra una filotaxis espiral (Martínez-Zapater *et al.*, 1995; Medford *et al.*, 1992; Schultz y Haughn, 1993). Tras la inducción floral, poco después de la diferenciación de los primeros brotes florales en el ápice, se produce un incremento dramático en la elongación de los entrenudos (“bolting”) cuyo resultado es la separación de las últimas hojas vegetativas formadas, u hojas caulinares, de las hojas de roseta que permanecen en la base del tallo. El tallo de inflorescencia que se forma presenta un patrón de crecimiento indeterminado, generándose una inflorescencia de tipo racimo simple, en la que, de acuerdo con las estructuras que aparecen en sus nudos, se distinguen dos fases: una fase de inflorescencia temprana ( $I_1$ ), caracterizada por la presencia de nudos con hojas caulinares cuyos meristemos axilares desarrollan tallos laterales de inflorescencia (coflorescencias), con patrón de crecimiento similar al de la inflorescencia principal, y una fase de inflorescencia tardía ( $I_2$ ), en la cual en los nudos se forman flores cruciformes que no están sostenidas por hojas. El cambio

morfológico más evidente entre la roseta adulta y la inflorescencia temprana es la elongación de los entrenudos; la inflorescencia temprana podría considerarse como parte de la fase vegetativa (Hempel y Feldman, 1994; Smyth *et al.*, 1990). Una vez formada la inflorescencia principal, los meristemos axilares de las hojas de roseta, pueden dar lugar a ramas laterales en las que se repite de nuevo la misma estructura. En *Antirrhinum* la inflorescencia también es de tipo racimo simple pero en ella hay elongación entre todos los entrenudos del tallo, por lo que no se produce ninguna roseta, y las flores, zigomórficas, se hallan sustentadas por brácteas.

## 2.2. INDUCCIÓN FLORAL EN *Arabidopsis*

Las plantas, en un estadio concreto de su ciclo de vida, pasan de la fase de desarrollo vegetativo a la fase reproductiva. El cambio entre estas dos fases se denomina transición floral. Para asegurar el éxito reproductivo, en las angiospermas el proceso de la transición floral está regulado por un complejo circuito que integra múltiples señales ambientales (fotoperiodo, calidad y cantidad de luz, temperatura) y de desarrollo (edad de la planta, niveles de sacarosa o de distintas fitohormonas) que aseguran que las plantas florezcan en el momento en que se han acumulado las reservas internas y que las condiciones ambientales son favorables.

*Arabidopsis* es lo que se denomina una planta facultativa de día largo (DL), lo que significa que florece antes bajo condiciones de DL que de DC. En esta especie, la transición floral está marcada por tres procesos que ocurren en paralelo: (i) la generación de nudos donde la iniciación de hojas está inhibida y cuyos meristemos axilares producen flores, (ii) la inducción de los meristemos laterales en las axilas de las hojas vegetativas, dando lugar a inflorescencias secundarias, y (iii) elongación de los entrenudos que separan las últimas hojas vegetativas producidas, hojas caulinares, de las de roseta, que permanecen en la base.

Los genes que afectan el tiempo de floración en *Arabidopsis* se han identificado, fundamentalmente, mediante el aislamiento y la caracterización de mutaciones inducidas que dan lugar a fenotipos de floración temprana o tardía y el análisis de la variación genética para el tiempo de floración inherente a las diferentes poblaciones naturales (ecotipos) (Alonso-Blanco *et al.*, 1998; revisado en Araky, 2001; Blázquez, 2000; Koornneef *et al.*, 1998b; Levy y Dean, 1998; Reeves y Coupland, 2000; Sheldon *et al.*, 2000a; Simpson *et al.*, 1999) y de este modo se han identificado aproximadamente 80 *loci* que regulan el tiempo de floración en *Arabidopsis* (revisado en Simpson *et al.*, 1999).

Los estudios de cómo los mutantes de tiempo de floración responden a tratamientos ambientales, tales como la vernalización (exposición prolongada a bajas temperaturas) y cambios en el fotoperiodo, combinados con análisis de las interacciones genéticas, han mostrado la existencia de múltiples rutas represoras e inductoras que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis* (Alonso-Blanco *et al.*, 1998; Blázquez, 2000; Blázquez *et al.*, 2001; revisado en Devlin y Kay, 2000; Haughn *et al.*, 1995; Koornneef *et al.*, 1998a, b; Levy y Dean, 1998; Martínez-Zapater *et al.*, 1994; Peeters y Koornneef, 1996; Piñeiro y Coupland, 1998; Simpson *et al.*, 1999) (Figura 1).

### **2.2.1. GENES QUE PROMUEVEN LA TRANSICIÓN FLORAL**

Los genes que participan en la regulación del tiempo de floración en respuesta a señales ambientales y endógenas se organizan en dos rutas principales que median las respuestas a condiciones ambientales (rutas de día largo y vernalización) y dos rutas que funcionan independientemente de las condiciones ambientales: la ruta autónoma y la de giberelinas. En principio, las mutaciones que provocan floración tardía definen genes que promueven la floración, mientras que las que provocan floración temprana definen genes que inhiben la transición floral.

#### **2.2.1.1. La ruta de promoción autónoma**

Existe un grupo de genes que promueven la floración de manera independiente a las señales medioambientales. Estos genes son *FCA*, *FY*, *FPA*, *FVE*, *LD* y *FLD* (revisado en Haughn *et al.*, 1995; Koornneef *et al.*, 1991; Levy y Dean, 1998). Las plantas con mutaciones en estos genes florecen más tarde que los controles tanto cuando son cultivadas bajo fotoperiodos inductivos como no inductivos y responden fuertemente a vernalización. Debido a que los productos correspondientes a los genes silvestres parecen promover la floración independientemente del fotoperiodo, se considera que estos genes actúan en una ruta de promoción autónoma. Además el hecho de que estos mutantes respondan a vernalización sugiere que la ruta de promoción por vernalización actúa redundantemente con la ruta de promoción autónoma. Algunos de los genes de la ruta de promoción autónoma codifican para proteínas cuya función podría ser la de regular la expresión de otros genes; así, *LD* codifica para una putativa proteína de tipo homeobox y *FCA* codifica para una proteína con dominios de unión a RNA y de interacción proteína-proteína (Aukerman y Amasino, 1996; Lee *et al.*, 1994a; Macknight *et al.*, 1997).

### 2.2.1.2. La ruta de promoción por fotoperiodo

Existe una colección de mutantes de floración tardía que muestran retraso de la floración bajo condiciones de fotoperiodos inductivos, pero en los que los fotoperiodos cortos no producen un retraso tan fuerte como en los mutantes de la ruta anterior, y que no responden a vernalización. Este grupo incluye a los mutantes *co*, *gi*, *fha*, *fd*, *fe*, *ft* y *fwa*, que han sido situados en la ruta de promoción por fotoperiodo, responsable de la inducción floral en respuesta a condiciones de día largo (Coupland, 1995; Koornneef *et al.*, 1991, 1998a; Martínez-Zapater *et al.*, 1994; revisado en Piñeiro y Coupland, 1998). Los mutantes *co*, *gi* y *fha* (*cry2*) exhiben floración tardía sólo en condiciones de DL mientras que los restantes todavía mantienen cierto nivel de respuesta al fotoperiodo (Coupland, 1995; Putterill *et al.*, 1995).

La ruta responsable de la inducción de la floración por fotoperiodo comienza por la percepción de la luz en al menos cinco regiones del espectro visible, a través de distintos tipos de fotorreceptores. En *Arabidopsis*, se han analizado con detalle dos tipos de fotorreceptores. El primer tipo lo constituyen los criptocromos, que son flavoproteínas que funcionan como receptores de luz azul; se conocen dos genes que codifican para criptocromos, *CRYPTOCROME 1* (*CRY1*, Ahmad y Cashmore, 1993) y *CRYPTOCROME 2* (*CRY2*, Guo *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998). El segundo tipo de fotorreceptores, los fitocromos, son codificados por cinco genes en *Arabidopsis* (*PHYA-E*) (Sharrock y Quail, 1989; Whitelam y Devlin, 1997). Cada uno de los fitocromos existe en dos formas distintas; la forma Pr es convertida a Pfr por exposición de las plantas a luz roja (R), y la reacción inversa ocurre en luz roja lejana (FR). En *Arabidopsis*, la inducción floral se inhibe con luz roja y se promueve con luz roja lejana (Martínez-Zapater *et al.*, 1994). El fenotipo de los mutantes *phyB* sugiere que *PHYB* juega un papel inhibitorio de la floración bajo condiciones de alta R/FR pero no está implicado en la percepción de la longitud del día (Koornneef y Peeters, 1997). Por el contrario, *PHYA* está implicado tanto en la percepción de la longitud del día como en la promoción de la floración por fotoperiodos inductivos (Koornneef y Peeters, 1997).

Un prerrequisito para el control fotoperiódico del tiempo de floración es la existencia de un mecanismo endógeno por el cual las plantas midan la duración del fotoperiodo. El reloj circadiano, que controla los ritmos diarios en la expresión génica y diversos patrones cíclicos de comportamiento, tal como el movimiento de las hojas, se ha propuesto que actúa como medidor en la respuesta fotoperiódica (revisado en Samach y Coupland, 2000). Los fotorreceptores estarían controlando el acoplamiento del reloj circadiano y los ciclos diarios de luz y oscuridad, captando información asociada a la calidad y cantidad de luz ambiental y

generando señales que interaccionan con los componentes de dicho reloj, tales como *EARLY FLOWERING3 (ELF3)*, Hicks *et al.*, 1996a), *TIMING OF CAB1 (TOC1)*, Somers *et al.*, 1998), *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, Schaffer *et al.*, 1998) *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1)*, Wang y Tobin, 1998), *ZEITLUPE (ZTL)*, Somers *et al.*, 2000) y *FKF1* (Nelson *et al.*, 2000).

Se han propuesto dos modelos fisiológicos para explicar cómo se mide la longitud del día en el control de respuestas de desarrollo, tales como la floración (Thomas y Vince-Prue, 1997; revisado en Samach y Coupland, 2000). El modelo de “la coincidencia externa” propone que el tiempo de coincidencia entre la exposición a luz (señal externa) y una fase circadiana interna promueve la floración en plantas de día largo como *Arabidopsis*. El modelo de “la coincidencia interna”, propone que la coincidencia de dos ritmos circadianos es lo que promueve la floración bajo condiciones inductivas. Resultados recientes que muestran que la expresión de *CO*, un gen que acelera la floración en respuesta a día largo (Putterill *et al.*, 1995), está regulada por el reloj circadiano y la longitud del día y que la expresión de *FT*, un gen diana de *CO*, sigue el mismo patrón temporal que la de *CO* (Suárez-López *et al.*, 2001) apoyan el primer modelo.

### **2.2.1.3. Ruta de promoción por vernalización**

El tratamiento prolongado a bajas temperaturas, o vernalización, que mimetiza la estación de invierno, induce o acelera la floración. La vernalización, contrarresta el efecto represor sobre la floración de los genes *FLOWERING LOCUS C (FLC o FLF)*, Koornneef *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994b; Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon *et al.*, 1999) y *FRIGIDA (FRI)*, Johanson *et al.*, 2000; Napp-Zinn, 1957) y suprime el retraso causado por las mutaciones en los genes que forman parte de la ruta de promoción autónoma, pero no el provocado por los de la ruta de fotoperiodo, lo que sugiere que la ruta de la vernalización funciona de manera similar a la ruta autónoma y paralela a ésta. Otros genes implicados en esta ruta son *VRN1* y *VRN2*, que se identificaron como mutaciones que reducían la respuesta a vernalización del mutante *fca* (Chandler *et al.*, 1996); el segundo de estos genes se ha clonado recientemente (Gendall *et al.*, 2001). El triple mutante *co-2 fca-1 ga1-3* en el que están afectadas las rutas del fotoperiodo, la autónoma y la de giberelinas, no florece bajo condiciones de DL ni DC, lo que indica que estas tres rutas son esenciales para promover la floración bajo estas condiciones, sin embargo, este triple mutante florece al ser sometido a vernalización, lo que muestra que la vernalización puede promover la floración incluso cuando estas tres rutas no funcionan (Reeves y Coupland, 2001). En relación con esto, recientemente se ha

demostrado que plantas portadoras de la mutación *ga1-3* y de los alelos dominantes de *FLC* y *FRI* no florecen a menos que se vernalicen (Michaels y Amasino, 1999b).

#### 2.2.1.4. Ruta de promoción por giberelinas

En *Arabidopsis*, la señal mediada por giberelinas (GAs) parece jugar un papel esencial en promover la floración bajo fotoperíodos no inductivos, de modo que los mutantes que no sintetizan GAs, o son insensibles a esta hormona, nunca florecen en DC (Wilson *et al.*, 1992). Los resultados del análisis de las interacciones entre mutaciones que provocan deficiencia en la biosíntesis de GA (*ga1-3*), con mutaciones en genes de la ruta de promoción por fotoperíodo o de la autónoma, son consistentes con que las GAs actúan a través de una ruta diferente de esas dos (Putterill *et al.*, 1995). Bajo condiciones de DL existe redundancia entre la ruta de promoción por GAs y la dependiente de fotoperíodo (Wilson *et al.*, 1992).

#### 2.2.2. GENES QUE REPRIMEN LA TRANSICIÓN FLORAL

El aislamiento de mutantes de floración temprana ha conducido a la identificación de genes que juegan un papel represor en el control de la transición floral. Algunas de estas mutaciones tienen efectos pleiotrópicos por lo que parece que la represión de la floración es sólo un componente del espectro de actividad normal de los correspondientes genes (Hicks *et al.*, 1996b; Schaffer *et al.*, 1998; Wang y Tobin, 1998). La represión mediada por algunos de ellos se basa en mecanismos de silenciamiento relacionados con la remodelación de la cromatina (Gaudin *et al.*, 2001; Goodrich *et al.*, 1997; Goto *et al.*, 2001; Piñeiro *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1992). La mayoría de los mutantes en estos genes han sido clasificados por su respuesta a fotoperíodo, algunos de ellos la mantienen (*clf*, *elf1*, *elf2*, *elg*, *esd4*, *pef1*, *pef2*, *pef3*, *phyB*, *speedy*, *tfl1*, *tfl2* y *wlc*) mientras que otros no (*elf3*, *emf1*, *emf2* y *pif*) (Ahmad y Cashmore, 1996; Bancroft *et al.*, 1993; Coupland, 1995; Goodrich *et al.*, 1997; Halliday *et al.*, 1996; Hicks *et al.*, 1996b; Koornneef *et al.*, 1980, 1998b; Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Sung *et al.*, 1992; Zagotta *et al.*, 1992).

Los genes *EMBRIONIC FLOWER* (*EMF*), son fuertes represores de la floración en *Arabidopsis* ya que los mutantes *emf1* y *emf2* florecen inmediatamente después de la germinación, sin una fase vegetativa previa (Aubert *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 2001). Esta represión está mediada por sus interacciones con genes de identidad de meristemo floral (Chen *et al.*, 1997). El gen *FLC* (=FLF), otro represor de la transición floral, normalmente coopera con *FRI* para reprimir la floración, de manera

que alelos dominantes de *FLC* interactúan sinérgicamente con alelos dominantes de *FRI* para producir plantas con un fenotipo extremo de floración tardía (Johanson *et al.*, 2000; Koornneef *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994b; Michaels y Amasino, 1999a; Napp-Zinn, 1957; Sheldon *et al.*, 1999). Recientemente se ha identificado y caracterizado el gen *FLOWERING LOCUS M (FLM)*, que también actúa como represor de la floración (Scortecci *et al.*, 2001).

Las mutaciones en los genes *TERMINAL FLOWER (TFL1 y TFL2)*, Bradley *et al.*, 1997; Goto *et al.*, 2001; Hicks *et al.*, 1996b; Shannon y Meeks-Wagner, 1991) provocan floración temprana y hacen que el tallo de la planta, normalmente de crecimiento indeterminado, se determine formando una flor. Por ello *TFL1* y *TFL2* deben funcionar retrasando la transición desde el desarrollo vegetativo a reproductivo, manteniendo el crecimiento indeterminado de los meristemas inflorescentes.

Los genes *CURLY LEAF (CLF)*, Goodrich *et al.*, 1997) y *WAVY LEAVES AND COTYLEDONS (WLC)*, Bancroft *et al.*, 1993) reprimen la expresión de genes de identidad de meristemo floral fuera de sus dominios en la flor. El mutante *clf* expresa ectópicamente *AG* en hojas, inflorescencias y flores (Goodrich *et al.*, 1997) y *wlc* expresa *AG* y *AP3* ectópicamente en hojas (Finnegan *et al.*, 1996). La expresión ectópica de *AG* provoca la floración temprana de estos mutantes (Goodrich *et al.*, 1997)

### **2.2.3. INTEGRACIÓN DE LAS SEÑALES QUE PROMUEVEN LA FLORACIÓN EN *Arabidopsis***

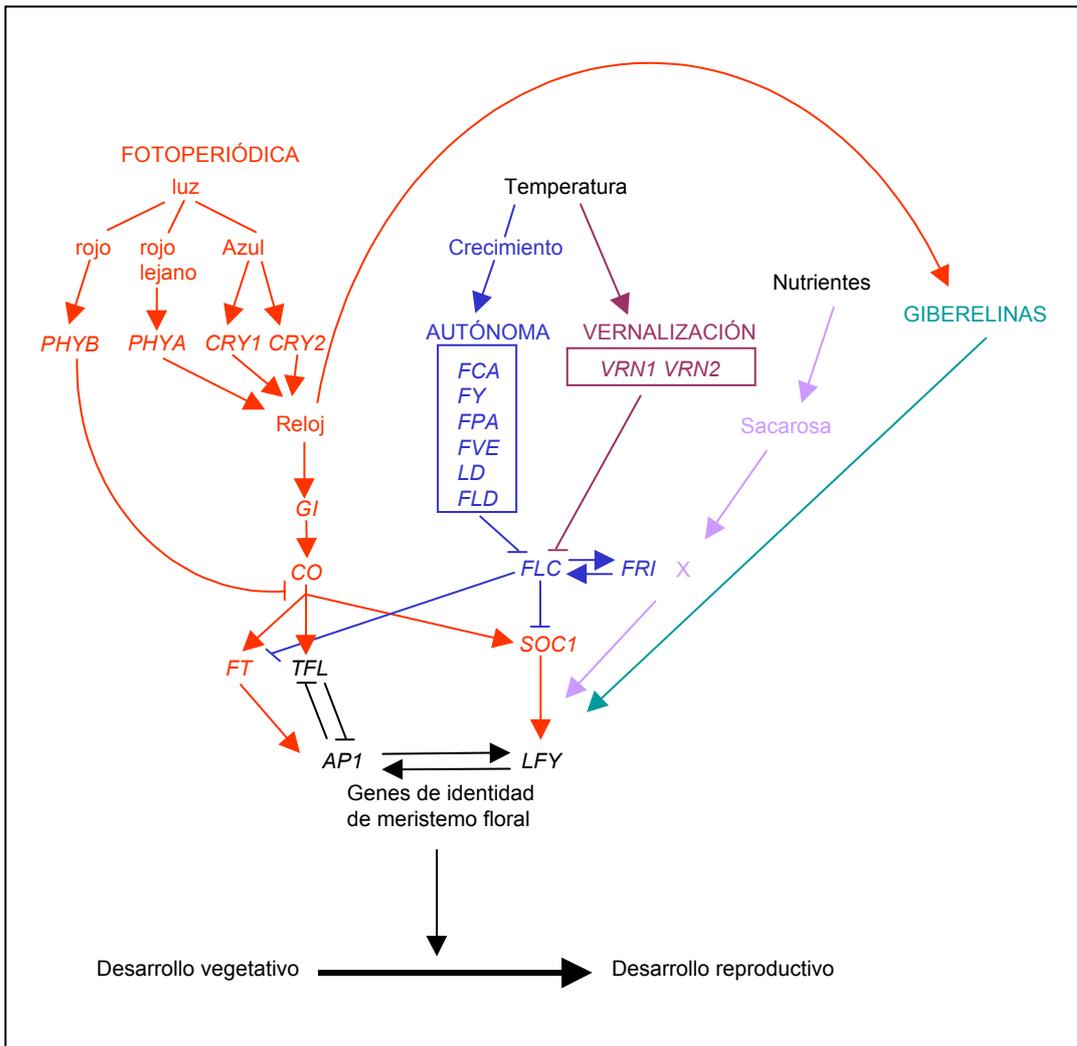
Durante los últimos años se han realizado progresos significativos que ayudan a comprender las bases moleculares de cómo se integra la información procedente de las distintas rutas que promueven la transición floral (revisado en Araki, 2001). Estas rutas parecen actuar finalmente, de manera directa o indirecta, sobre los genes responsables de la iniciación de los meristemas florales, regulando su expresión y su función, (Blázquez *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1998; revisado en Piñeiro y Coupland, 1998; Simon *et al.*, 1996); los genes de iniciación floral y los de tiempo de floración han sido difíciles de establecer debido a que las rutas inductoras son funcionalmente redundantes.

Los modelos iniciales del proceso de la inducción floral se basaban en el fenotipo de los mutantes en los genes *EMF* (Aubert *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 2001), de fenotipo extremo de floración temprana, y proponían la existencia de un represor central en el que convergían las señales procedentes de las múltiples rutas reguladoras. La actividad *EMF* constituiría el punto central del modelo COPS ( "controller of phase switching"), que propone que la transición floral ocurriría mediante una reducción de la actividad de ese represor, actividad COPS, hasta un nivel umbral a partir del cual la

actividad de los genes de iniciación floral podría activar con éxito el programa floral (Haughn *et al.*, 1995; Martínez-Zapater *et al.*, 1994; Schultz y Haughn, 1993).

Dos puntos clave en la integración de las distintas rutas que promueven la transición floral (revisado en Devlin y Kay, 2000) son la regulación transcripcional del gen de identidad de meristemo floral *LEAFY* (*LFY*) y la de los genes de tiempo de floración *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*, previamente llamado *AGL20*) (Figura 1). Mediante el uso de una versión inducible por hormona esteroidea de *CONSTANS* (*CO*) se identificaron cuatro genes diana de este gen, entre los que se encontraron *FT* y *SOC1*, que son componentes de la ruta de promoción de la floración dependiente de fotoperiodo; los otros dos están implicados en la biosíntesis de prolina y de etileno (Samach *et al.*, 2000). *SOC1* y *FT* actúan como activadores de la transición floral y se hallan bajo el control negativo del represor floral *FLC*, el cual está regulado positivamente por el gen *FRI* y reprimido por las rutas de promoción autónoma y de vernalización (Johanson *et al.*, 2000; Koornneef *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994b; Michaels y Amasino, 1999a; Napp-Zinn, 1957; Sheldon *et al.*, 1999, 2000b). Por lo tanto, estas dos rutas ejercen el control positivo de *SOC1* y *FT* al regular negativamente al represor *FLC*. Además, la ruta de promoción por fotoperiodo activa *SOC1* y *FT* a través de *CO*. *FT* y *SOC1* son por lo tanto importantes integradores de estas tres vías y sus niveles de expresión están determinados por un balance entre las actividades de *CO* y de *FLC* (Lee *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000). *SOC1* parece formar parte de la cascada transcripcional que resulta en la activación del gen de identidad de meristemo floral *LFY*, mientras que *FT* activa otros genes de identidad de meristemo floral como *AP1*; así, los dobles mutantes *lfy ft* son incapaces de formar estructuras florales, y en ellos no se detecta la expresión alguna de *AP1* (Ruiz-García *et al.*, 1997; Samach *et al.*, 2000).

También se ha demostrado que el promotor del gen *LFY* juega un papel importante en la integración de las señales ambientales y endógenas que controlan el tiempo de floración, de manera que la expresión de *LFY* es inducida por *CO* a través de la ruta del fotoperiodo y por la ruta de promoción por GAs (Blázquez y Weigel, 2000; Samach *et al.*, 2000). Puesto que, en respuesta a la activación de *CO*, la transcripción de *LFY* y de *TFL* se inicia rápidamente, mientras que la transcripción de *AP1* ocurre mucho más tarde, se ha propuesto que *CO* actúa dentro de una ruta que es suficiente para activar la transcripción de *LFY* y *TFL*, mientras que la activación rápida de *AP1* requiere una ruta adicional (Simon *et al.*, 1996).



**Figura 1. Modelo de la inducción floral en *Arabidopsis*.** Se representan las distintas rutas que promueven la transición floral (cada una en un color) y los principales puntos de integración de las señales procedentes de las distintas rutas. →: efecto inductor; ⊥: efecto represor. (Tomado de Blázquez, 2000).

### 2.3. FASE REPRODUCTIVA EN *Arabidopsis* Y *Antirrhinum*

#### 2.3.1. CONTROL GENÉTICO DEL PROCESO DE INICIACIÓN FLORAL (FLIP)

Como resultado de la transición floral, el SAM se transforma de meristemo vegetativo en reproductivo, o inflorescente, de modo que, a partir de ese momento, el meristemo apical cesa de producir estructuras vegetativas en sus flancos y en su lugar comienzan a formarse las flores. La formación de los meristemas florales, o iniciación floral (FLIP, nombrado así por Schultz y Haughn, 1993), requiere la acción antagonista de dos tipos de genes: los genes de identidad de meristemo floral, que especifican el destino floral de los nuevos meristemas laterales y otro tipo de genes, entre los que se incluye *TFL1* de *Arabidopsis* y

*CENTRORADIALIS* (*CEN*) de *Antirrhinum*, controlan la expresión de los genes de identidad de meristemo floral impidiendo su expresión en el meristemo apical. Ambos grupos de genes son activados por los genes de tiempo de floración como consecuencia de la inducción floral.

### 2.3.1.1. Especificación temprana de la identidad del meristemo floral

El descubrimiento de los genes de identidad del meristemo floral deriva de la identificación de mutantes de pérdida de función en los que las flores son reemplazadas por estructuras intermedias entre tallos vegetativos y florales. En *Antirrhinum*, dos genes que juegan un papel clave en la especificación de los meristemos florales son *FLORICAULA* (*FLO*) y *SQUAMOSA* (*SQUA*). Mutaciones en *FLO*, resultan en la conversión casi completa de las flores en inflorescencias (Coen *et al.*, 1990). Esta conversión es más completa en las posiciones basales del tallo de inflorescencia (Carpenter *et al.*, 1995). Las plantas mutantes para el gen *SQUA* muestran un fenotipo gradual donde las estructuras de las posiciones basales muestran una transformación casi completa en inflorescencias, y las posiciones más apicales contienen estructuras florales anormales con características de inflorescencia. Por el contrario, las flores que se producen en las inflorescencias secundarias son prácticamente normales (Huijser *et al.*, 1992). Los dobles mutantes *flo squa* muestran una fuerte intensificación en la conversión de las flores en inflorescencias, sugiriendo que ambos interactúan para el establecimiento de la identidad del meristemo floral (Carpenter *et al.*, 1995).

En *Arabidopsis* se han aislado varios genes implicados en la especificación de los meristemos florales: *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *CAULIFLOWER* (*CAL*), *FRUITFULL* (*FUL*, previamente llamado *AGL8*), *APETALA2* (*AP2*) y *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) (Haughn *et al.*, 1995; revisado en Irish y Kramer, 1998; Ma, 1998; Pidkowich *et al.*, 1999). Entre ellos, los que parecen jugar un papel principal en la especificación de los meristemos florales son *LFY* (Schultz y Haughn, 1991a) y *AP1* (Irish y Sussex, 1990), los probables ortólogos de *FLO* y *SQUA*, respectivamente, mientras que los otros juegan un papel secundario. Las mutaciones en *LFY* y *AP1* afectan a la identidad del meristemo de manera que las flores son reemplazadas por estructuras similares a inflorescencias (Bowman *et al.*, 1993; Huala y Sussex, 1992, Irish y Sussex, 1990; Schultz y Haughn, 1991a; Weigel *et al.*, 1992). Al igual que ocurre en el caso de las mutaciones *flo* y *squa* de *Antirrhinum*, el carácter inflorescente de las estructuras laterales producidas en las inflorescencias de los mutantes *lfy* y *ap1* se atenúa progresivamente en las posiciones apicales del tallo. En las plantas homocigotas para los alelos fuertes *lfy*, en el lugar donde

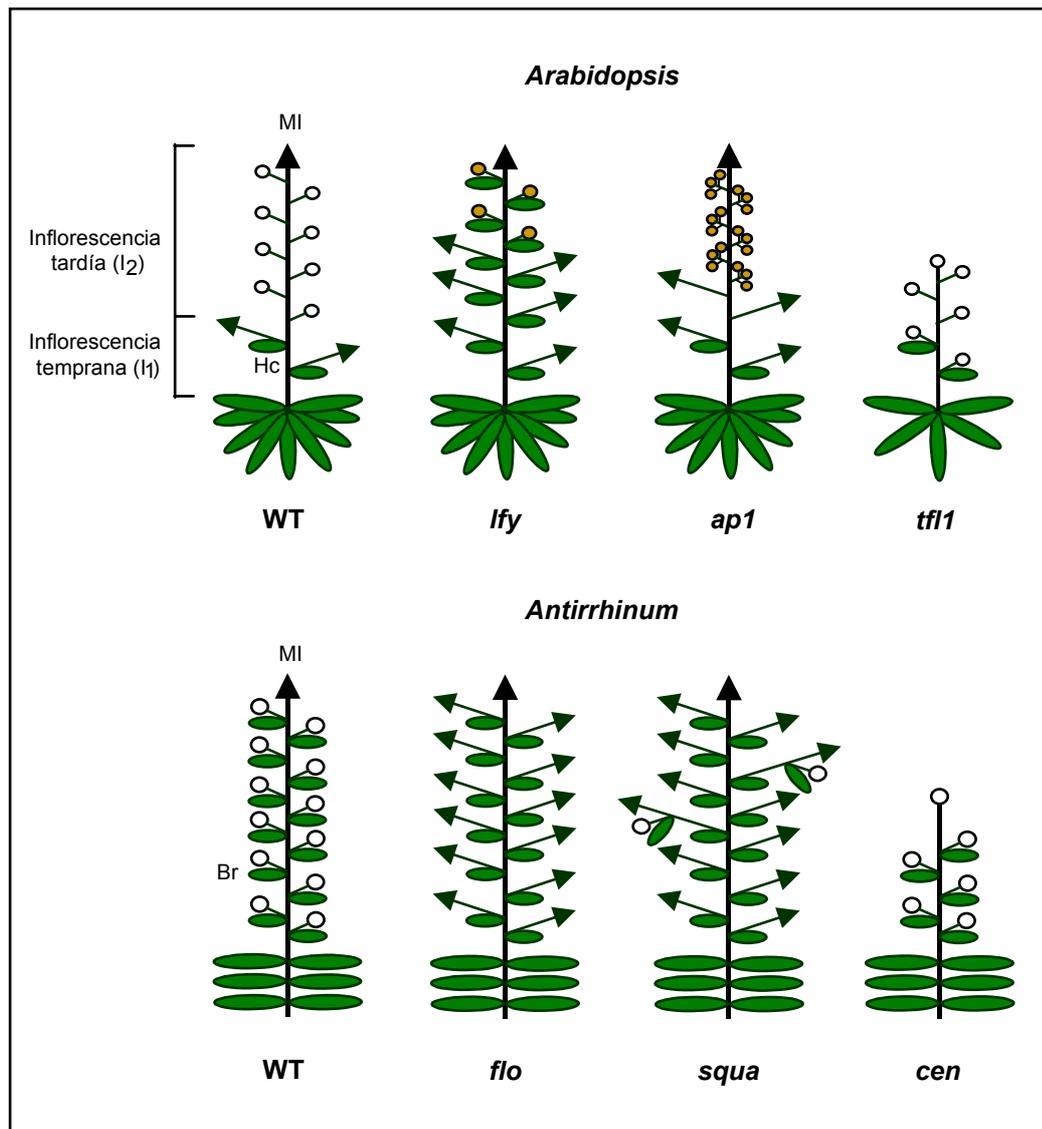
aparecerían las primeras flores en la inflorescencia silvestre, se desarrollan inflorescencias secundarias sustentadas por hojas. En las posiciones más apicales de la inflorescencia de estos mutantes se forman estructuras florales anormales, también sustentadas por brácteas, constituidas por órganos sepaloides y carpeloides que emergen en filotaxis espiral, una característica típica de los tallos inflorescentes (Huala y Sussex, 1992; Schultz y Haughn, 1991a, 1993; Weigel *et al.*, 1992). En los mutantes fuertes *ap1*, en el lugar donde deberían aparecer las flores basales de la inflorescencia, aparecen inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas. En las posiciones más apicales, los mutantes *ap1* desarrollan estructuras florales anormales muy diferentes a las producidas por el mutante *lfy*. Estas flores exhiben una filotaxis verticilada, como las flores normales, pero, debido a que en ellas la inhibición de la formación de meristemos axilares es incompleta, desarrollan flores secundarias ectópicas en las axilas de los órganos del primer verticilo, órganos estos que muestran transformación de sépalo a bráctea. Además, las flores del mutante *ap1* raramente producen pétalos (Bowman *et al.*, 1993; Irish y Sussex, 1990; Mandel *et al.*, 1992b; Schultz y Haughn, 1993). Los dobles mutantes *lfy ap1*, independientemente de la fuerza de los alelos mutantes combinados, muestran una fuerte intensificación de las transformaciones de flores a inflorescencias; no obstante, estos dobles mutantes llegan a producir finalmente algunas estructuras florales (Huala y Sussex, 1992; Schultz y Haughn, 1993; Weigel *et al.*, 1992).

Los fenotipos de los mutantes simples y el de los dobles mutantes sugieren que *LFY* y *AP1* tienen funciones parcialmente redundantes y que interactúan para especificar la identidad del meristemo floral. *AP1* y *LFY* se regulan positivamente de forma recíproca ya que en los mutantes *lfy* el inicio de la expresión de *AP1* se ve retrasada y en las plantas que expresan constitutivamente *AP1*, *LFY* se expresa prematuramente en meristemos inflorescentes que se transforman en florales (Liljegren *et al.*, 1999).

La expresión constitutiva de *LFY*, o de *AP1*, en *Arabidopsis* produce una dramática aceleración de la transición floral con la formación de flores en todos los meristemos disponibles, apical y laterales, sugiriendo que ambos genes son suficientes para especificar los meristemos florales en el contexto de un meristemo silvestre (Mandel y Yanofsky, 1995b; Weigel y Nilsson, 1995). Las plantas 35S::*LFY* y 35S::*AP1* florecen antes que las plantas silvestres, tanto bajo condiciones de DL como de DC. Mientras que las plantas 35S::*AP1 lfy* muestran conversión de los meristemos laterales a meristemos florales, las plantas 35S::*LFY ap1* siguen mostrando los defectos típicos del mutante *ap1*, lo que sugiere que *AP1* actúa por detrás de *LFY* (Mandel y Yanofsky, 1995b; Weigel y Nilsson, 1995).

El gen *CAL* es funcionalmente redundante con *AP1*, de manera que los mutantes *cal* no muestran ninguna alteración fenotípica. Sin embargo, la mutación *cal* intensifica dramáticamente el fenotipo del mutante *ap1*, de modo que en el doble mutante *ap1 cal* las

células que normalmente constituirían un meristemo floral se comportan como un meristemo inflorescente que reiteradamente genera meristemos inflorescentes adicionales, en filotaxis espiral, lo que origina una estructura característica muy similar a la de la de una coliflor (Bowman *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1995).



**Figura 2. Representación esquemática de la arquitectura de una planta WT y de varios mutantes del proceso de la iniciación floral de *Arabidopsis* y de *Antirrhinum*.**

→ : meristemo inflorescente de crecimiento indeterminado; ○ : flores silvestres; ● y ○ : flores anormales encontradas en estos mutantes. MI: meristemo inflorescente principal; Hc: hoja caulinar; Br: bráctea.

El gen *FUL* se requiere para el desarrollo del carpelo y del fruto (Gu *et al.*, 1998; Mandel y Yanofsky, 1995a) pero además actúa como un gen de tiempo de floración y de identidad de meristemo floral. Las mutaciones en *FUL* retrasan el tiempo de floración y se ha propuesto que el gen actúa en una ruta que promueve la transición floral bajo condiciones

inductivas de fotoperiodo, sin embargo, el débil efecto que su mutación tiene sobre el tiempo de floración sugiere que está implicado en un circuito de señalización altamente redundante (Ferrándiz *et al.*, 2000a; Mandel y Yanofsky, 1995a). El triple mutante *ful cal ap1* produce un fenotipo extremo de no floración con la producción de tallos en lugar de flores, un fenotipo que correlaciona con la falta de la regulación positiva de *LFY* y la expresión ectópica de *TFL1*; estos datos sugieren que *FUL*, *AP1* y *CAL* actúan redundantemente en el control de la arquitectura de la inflorescencia controlando los dominios de expresión de *LFY* y *TFL1* así como los niveles relativos de sus actividades (Ferrándiz *et al.*, 2000a).

*UFO* (Levin y Meyerowitz, 1995; Wilkinson y Haughn, 1995) y *AP2* (Kunst *et al.*, 1989) son genes también requeridos para el establecimiento de la identidad del meristemo floral en *Arabidopsis* pero sus mutaciones sólo ocasionan defectos leves en la especificación del meristemo, a diferencia de *lfy* o *ap1*. La indicación de que *AP2* se halla implicado en el control de la identidad del meristemo floral proviene de la observación de que las mutaciones *ap2* intensifican los defectos florales de los mutantes *ap1* y *lfy* (Bowman *et al.*, 1993; Irish y Sussex, 1990; Schultz y Haughn, 1993; Shannon y Meeks-Wagner, 1993). Los mutantes *ufo* presentan un fenotipo con características tanto de mutantes de identidad de meristemo como de identidad de órgano floral (Levin y Meyerowitz, 1995; Wilkinson y Haughn, 1995). En los dobles mutantes *ap1 ufo* se intensifican las transformaciones a inflorescencia observadas en los mutantes simples. Las mutaciones en *LFY* son en gran parte epistáticas sobre las mutaciones *ufo* (Levin y Meyerowitz, 1995), indicando que *UFO* actúa por detrás de *LFY*, y se ha sugerido que ambos tienen un papel conjunto en la activación de los genes de clase B (Lee *et al.*, 1997). Las interacciones genéticas de *FIMBRIATA (FIM)*, el ortólogo de *UFO* en *Antirrhinum*, con *FLO* y *SQUA* son similares a las de *UFO* con *LFY* y *AP1*. Las mutaciones en *FIM* intensifican las transformaciones de flor a inflorescencia del mutante *squa* (Ingram *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1994); sin embargo, parece que *UFO* actuaría ligeramente antes que *FIM* en la especificación del meristemo floral ya que las primeras flores del mutante *ufo* siempre muestran transformación a inflorescencia, mientras que en el mutante *fim* éstas producen al menos un verticilo de órganos florales (Ingram *et al.*, 1995).

En la iniciación floral el gen *TFL1* actúa de forma antagonista a los genes de identidad de meristemo floral, retrasando los cambios de fase a lo largo del ciclo de vida de la planta y evitando que el meristemo apical del tallo (SAM), normalmente con un patrón de desarrollo indeterminado, se determine transformándose en una flor (Alvarez *et al.*, 1992; Shanon y Meeks-Wagner, 1991, 1993). El mutante *tf1* tiene dos características que lo distinguen del tipo silvestre: (i) florece tempranamente y (ii) los meristemos inflorescentes adquieren la identidad de florales, lo que conduce a la formación de flores solitarias en las axilas de las

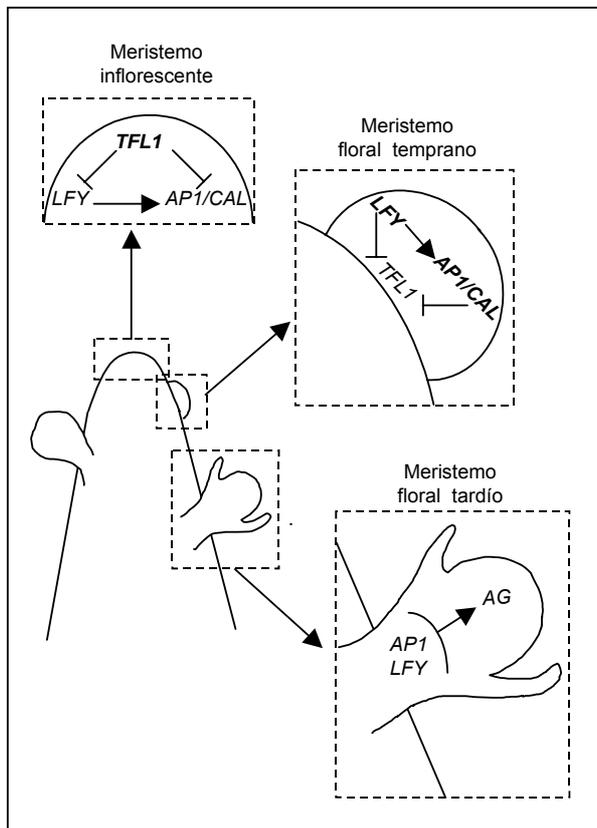
hojas caulinares y a la determinación del tallo con la producción de una flor terminal (Alvarez *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1997; Schultz y Haughn, 1993; Shanon y Meeks-Wagner, 1991). Los genes de identidad de meristemo floral *LFY* y *AP1* y el gen *TFL1* presentan dominios de expresión separados en el meristemo apical durante el desarrollo de la inflorescencia, con *TFL1* en el centro del meristemo inflorescente y con *LFY* y *AP1* en su periferia expresándose en los meristemos florales desde estadios muy iniciales de su formación (Bradley *et al.*, 1996, 1997; Kempin *et al.*, 1995; Mandel *et al.*, 1992b; Shanon y Meeks-Wagner, 1993; Weigel y Nilsson, 1995; Weigel *et al.*, 1992). Durante la fase vegetativa se ha observado una separación similar en los patrones de expresión de *TFL1* y *LFY* (Blázquez *et al.*, 1997, 1998; Bradley *et al.*, 1997; Hempel *et al.*, 1997).

Los genes de identidad de meristemo floral *LFY*, *AP1* y *CAL*, impiden la transcripción de *TFL1* en los meristemos florales situados en la periferia del ápice, de manera que en los mutantes *lfy* o *ap1 cal TFL1* se expresa ectópicamente y en plantas que expresan constitutivamente los genes de identidad de meristemo floral la expresión de *TFL1* se ve inhibida (Liljegren *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999).

Por el contrario, *TFL1* inhibe la acción de los genes de identidad de meristemo floral en el centro del meristemo apical a dos niveles; por un lado, *TFL1* retrasa su aumento de expresión y, por otro, impide al meristemo responder a estos dos genes (Ratcliffe *et al.*, 1998, 1999). Estudios con plantas *35S::TFL1* y mutantes *tfl* sugieren que *TFL1* actúa en el meristemo apical retrasando los cambios de fase a lo largo del ciclo de vida de la planta (Bowman *et al.*, 1993; Ratcliffe *et al.*, 1998; Schultz y Haughn, 1993). También retrasa el inicio de las fases en las que *LFY* y *AP1* se expresan en la periferia del ápice e impide su expresión en el centro del meristemo. Así, cuando los niveles de *TFL1* son elevados, como en plantas *35S::TFL1*, el aumento en la expresión de *LFY* y *AP1* se retrasa con respecto a una planta control y, por el contrario, cuando la función de *TFL1* está reducida, como en el mutante *tfl1*, el aumento de la expresión de *AP1* y *LFY* se produce de manera prematura y ectópicamente en el ápice (Bowman *et al.*, 1993; Ratcliffe *et al.*, 1998; Schultz y Haughn, 1993). *TFL1* también impide la respuesta del meristemo a *LFY* y *AP1* aunque éstos se estén expresando a niveles altos ya que en las plantas *35S::TFL1 35S::LFY* y *35S::TFL1 35S::AP1* los meristemos axilares no florecen prematuramente, como ocurre en las plantas *35S::LFY* o *35S::AP1*, respectivamente (Mandel y Yanofsky, 1995b; Ratcliffe *et al.*, 1999; Weigel y Nilsson, 1995).

El patrón de expresión de estos dos grupos de genes en el ápice refleja el tiempo en que aparece una expresión fuerte de los mismos, de manera que la actividad que se establezca primero en una región impide la expresión de los otros; además, este patrón se mantiene posteriormente por mecanismos de inhibición mutua (Ratcliffe *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*,

1999). Así pues, el aumento de la expresión de *TFL1* en el centro del ápice se produce con anterioridad a que se inicie la expresión fuerte de *LFY* y *AP1/CAL* en la periferia. El establecimiento previo de *TFL1* en el centro del meristemo impide la expresión de *LFY* y *AP1/CAL* en esa zona, de manera que, cuando aparecen, su expresión queda restringida a las células de la periferia del ápice, donde no se ha establecido la actividad de *TFL1*. Bajo la influencia de *LFY*, las células del flanco del meristemo formarán un meristemo floral en lugar de un primordio de hoja como en la fase más temprana. Las actividades de *AP1* y *CAL*, junto con *LFY*, impiden la transcripción de *TFL1* en estos meristemos florales, permitiendo el desarrollo de flores. Además de en el ápice primario, en los meristemos formados en las axilas de las hojas caulinares también se establece la expresión de *TFL1* antes que la de *LFY* y *AP1/CAL*, estableciéndose así su desarrollo como tallos secundarios que siguen el mismo patrón de desarrollo que el ápice primario (Ratcliffe *et al.*, 1999) (Figura 3).



**Figura 3.-Modelo para el control genético de la identidad del meristemo floral.** →: efecto inductor; ⊥: efecto represor. En el centro del ápice *TFL1* es activado antes que *LFY* y *AP1* y mantiene el desarrollo indeterminado del meristemo inflorescente. En la periferia los genes de identidad de meristemo *AP1* y *LFY* promueven el desarrollo de células en los meristemos florales y reprimen a *TFL1*. (Adaptado de Ma, 1998; Ratcliffe *et al.*, 1999).

*TFL1* no es un factor de transcripción y, por tanto, no debe actuar como un represor directo de la transcripción de *AP1* y de *LFY* (Bradley *et al.*, 1996; Ohshima *et al.*, 1997). El hecho de que su homólogo de células animales, RKIP, una proteína de unión a fosfatidiletanolamina (PEBs, Grandy *et al.*, 1990; Schoentgen y Jolles, 1995) de ratón, funcione como un regulador negativo de la kinasa Raf1 (Yeung *et al.*, 1999, 2000), sugiere

que TFL1 probablemente juegue un papel clave en una ruta de transducción de señal responsable de la represión de *LFY* y *AP1*. TFL1 podría actuar de manera no autónoma como parte de un sistema de transmisión de señales desde el centro hacia la periferia del meristemo apical (Ratcliffe *et al.*, 1999).

El gen *CENTRORADIALIS* (*CEN*) es un homólogo de *TFL1* en *Antirrhinum* (Bradley *et al.*, 1996). *CEN* tiene un patrón de expresión similar al de *TFL1* en el ápice inflorescente, lo que sugiere un papel común con éste en impedir la determinación del meristemo inflorescente; sin embargo, a diferencia de *TFL1*, la mutación en el gen *CEN* no afecta al tiempo de floración y, en concordancia con ello, el gen *CEN* tampoco se expresa durante la fase vegetativa (Bradley *et al.*, 1997). Se ha propuesto que *CEN* pudiera haber tenido un papel ancestral similar al propuesto para *TFL1* pero que su implicación en la transición de fase más temprana haya llegado a ser redundante (Stebbins, 1974).

### **2.3.1.2. Especificación tardía de la identidad del meristemo floral y mantenimiento del programa floral**

En algunas especies como *Impatiens balsamina*, un cambio en las condiciones ambientales puede producir reversión desde el programa de desarrollo floral al vegetativo, indicando el requerimiento en esta especie de la existencia de condiciones inductivas durante todo el desarrollo floral (Battey y Lyndon, 1990). Sin embargo, en muchas especies, incluyendo *Arabidopsis*, una vez el programa floral se ha iniciado, éste continúa, independientemente de las condiciones ambientales, lo que sugiere la existencia de mecanismos que controlan el mantenimiento del estado floral. Se ha visto que el gen *AGAMOUS* (*AG*) está implicado en mantener el programa floral (revisado en Ma, 1998; Pidkowich *et al.*, 1999).

*AG* se transcribe más tarde que los genes de identidad de meristemo floral y su expresión se limita al centro del primordio floral. Las flores del mutante *ag* cultivado bajo condiciones de DL, además de las conversiones homeóticas de los órganos reproductivos a sépalos y pétalos, tienen defectos en la determinación, produciendo un gran número de verticilos de órganos; a diferencia de los meristemos florales normales, los de *ag* producen algunas veces uno o dos meristemos florales secundarios (Bowman *et al.*, 1989). Los meristemos florales indeterminados de *ag* revierten a meristemos vegetativos en el mutante simple cuando se cultiva en condiciones de DC o en combinación con la mutación *ap1*, lo que indica que los meristemos florales de *ag* no están de manera irreversible destinados a desarrollarse como flores (Bowman *et al.*, 1993; Mizukami y Ma, 1997; Okamuro *et al.*, 1996). Además, la expresión constitutiva de *AG* da lugar a adelanto de la floración y a la conversión del ápice indeterminado en una flor terminal (Mizukami y Ma, 1992, 1997), lo que

sugiere que *AG* representa una clase distinta de gen de identidad de meristemo floral que se requiere para especificar la determinación de los meristemos florales y para mantener el programa floral.

## **2.3.2. CONTROL GENÉTICO DE LA IDENTIDAD DE LOS ÓRGANOS FLORALES**

### **2.3.2.1. Modelo ABC**

Durante el desarrollo de la flor, el meristemo floral genera los primordios de órganos, típicamente siguiendo una disposición en verticilos concéntricos. La identidad de los órganos producidos es diferente en cada verticilo, de manera que, desde fuera hacia dentro, el primer verticilo se halla ocupado por los sépalos, el segundo por los pétalos, el tercero por los estambres y el cuarto por los carpelos.

Existe un grupo de genes, denominados genes de identidad de órgano floral o genes homeóticos, que son responsables de especificar la identidad de los órganos que se desarrollan en los diferentes verticilos de la flor. El término homeótico fue introducido por Bateson en 1894 y ha sido retomado para la descripción de ciertos fenómenos encontrados en el análisis genético de los procesos de desarrollo. Los genes homeóticos son selectores o reguladores que especifican la identidad de las distintas partes de un organismo, de forma que las mutaciones en estos genes dan lugar a cambios en las identidades de los distintos órganos, provocando que un órgano más o menos normal se desarrolle en el lugar donde típicamente se encontraría otro tipo de órgano.

Durante siglos se han coleccionado y descrito flores anormales, conocidas ahora como mutantes homeóticos, que mostraban defectos en la identidad de los órganos florales (Masters, 1869). El estudio de los mutantes homeóticos florales de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, sugirió que las alteraciones en los órganos florales no se producían de manera aleatoria sino que el control de la identidad de los órganos estaba gobernado por ciertas reglas. Esto condujo al establecimiento de un modelo genético, que se conoce como modelo ABC, que explica cómo se determina el destino de un primordio de órgano floral (Bowman *et al.*, 1991; Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz *et al.*, 1991; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Weigel y Meyerowitz, 1994).

Las mutaciones homeóticas que alteran la identidad de los órganos florales afectan a la identidad de dos verticilos adyacentes. En función de las características fenotípicas de los mutantes homeóticos, éstos han sido agrupados en tres clases (Figura 4). Los mutantes de clase A presentan alteraciones en el primer y segundo verticilo, de manera que los sépalos se convierten en órganos carpeloides y los pétalos en órganos estaminoides. Los mutantes

de clase B presentan afectados el segundo y tercer verticilo, de manera que los pétalos se convierten en órganos sepaloideos y los estambres en órganos carpeloideos. Por último, los mutantes de clase C muestran afectados el tercer y cuarto verticilo, de modo que los estambres se desarrollan como pétalos y los carpelos como sépalos.

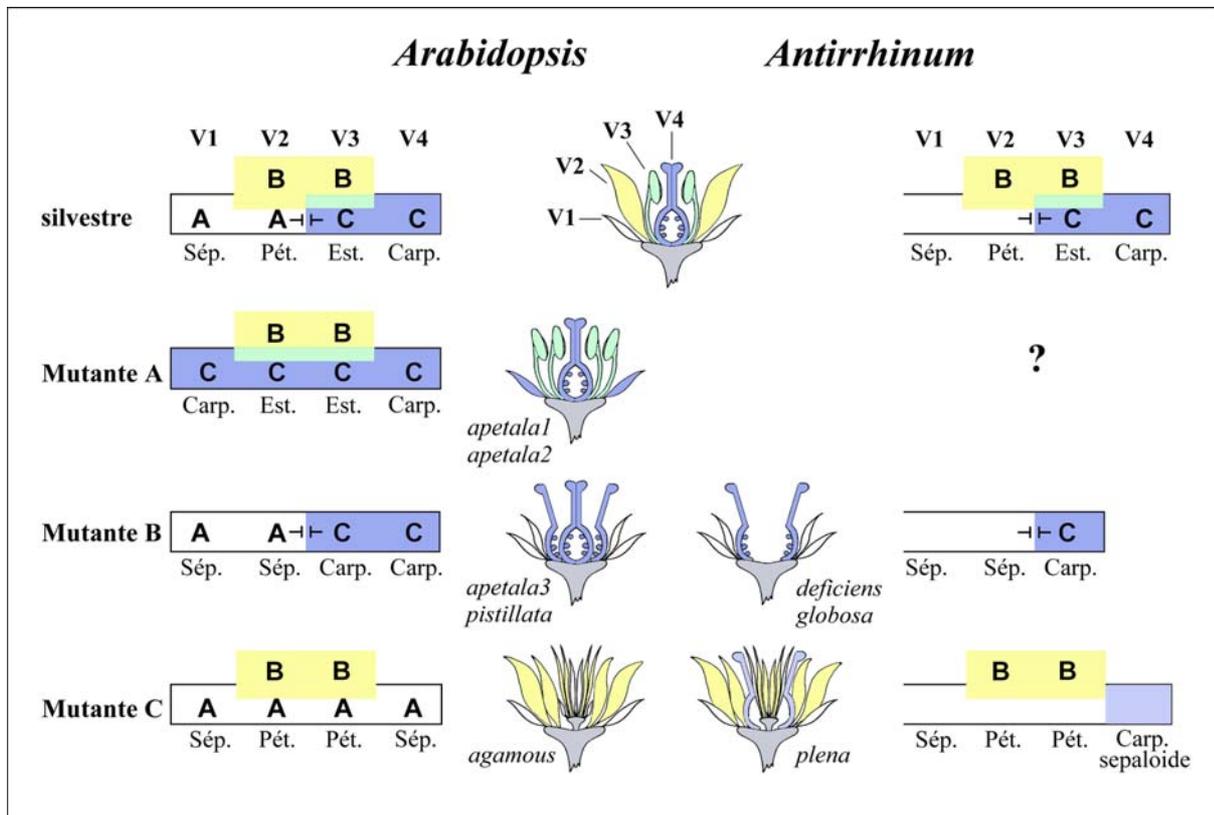
Para explicar estas observaciones, el modelo ABC propone tres principios básicos. Primero, que los genes de identidad de órganos florales, que son selectores homeóticos, definen tres funciones que actúan en dominios parcialmente solapantes y que controlan la identidad de los órganos florales, bien por sí solas o en combinación. La función A sola especifica la identidad de los sépalos. Las funciones A y B juntas especifican la identidad de los pétalos. B y C juntas especifican la identidad de los estambres y la función C sola especifica la identidad del carpelo. Segundo, el modelo ABC también propone que las funciones A y C se reprimen mutuamente, de manera que cuando una de ellas no está presente, la otra se expande al resto de verticilos. Así, los genes de función A excluyen a la función C de los verticilos más externos (1 y 2) y los genes de clase C excluyen a la función A de los verticilos más internos (3 y 4). Por último, este modelo propone también que el efecto de las funciones de identidad de órgano es independiente de su posición relativa dentro de la flor.

Con las premisas del modelo ABC se explican la mayoría de las alteraciones en la identidad de los órganos florales de los mutantes homeóticos simples, dobles y triples (Bowman *et al.*, 1991, 1993), sin embargo, debido a que los genes de identidad de órgano realizan funciones adicionales a la de especificación de los órganos florales, algunos defectos fenotípicos en estos mutantes no pueden ser explicados por el modelo ABC.

Los mutantes de función B y C difieren ligeramente en su fenotipo entre *Arabidopsis* y *Antirrhinum*. Así, en los mutantes de clase B de *Antirrhinum* sólo se producen tres verticilos, lo que indica un papel de los genes de función B en el control de la terminación del desarrollo de las flores (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992). Sin embargo, en *Arabidopsis* ese papel sólo se pone de manifiesto en combinación con la mutación en el gen *SUPERMAN* (*SUP*), que controla el límite interno de la expresión de los genes de clase B (Bowman *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 1991b), lo que indica que, mientras que en *Antirrhinum* el control de la determinación forma parte de la función de los genes de tipo B, en *Arabidopsis* este control está parcialmente separado de la función B.

En cuanto a la función C, se ha sugerido un papel adicional de los genes de clase C en la determinación del meristemo floral en ambas especies, ya que, en los dos casos, los fenotipos de los mutantes consisten en doble flor; sin embargo, en *Arabidopsis* ésta aparece dentro del tercer verticilo y en *Antirrhinum* dentro del cuarto. Además, mientras que en *Arabidopsis* sólo se ha identificado un gen de clase C, en *Antirrhinum* se ha descrito la

existencia de dos genes de clase C, *PLENA* (*PLE*) y *FARINELLI* (*FAR*). La mutación *far* no tiene defectos fenotípicos marcados, a diferencia de *ple*, sin embargo, intensifica el fenotipo causado por esta última, lo que sugiere que *FAR* es un componente adicional de la función C y que actúa en el mismo proceso de desarrollo que *PLE* (Davies *et al.*, 1999a).



**Figura 4. Esquema del modelo ABC.** Tres funciones homeóticas parcialmente solapantes, A (en blanco), B (en amarillo) y C (en azul) controlan la identidad de los distintos tipos de órganos en los verticilos florales (V). El solapamiento de las funciones B y C se muestran en azul-verdoso. Los rectángulos coloreados representan la relación espacial entre las distintas funciones en flores de fenotipo silvestre y mutantes (sólo se representa la mitad de la flor). En los esquemas florales están representados los cambios en la identidad de órganos, así como los efectos en la determinación central que tienen lugar en los tres tipos de mutantes. Los nombres de los mutantes de clase A, B y C de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* están indicados junto a los esquemas florales. El signo de interrogación indica que no se ha identificado hasta la fecha un fenotipo mutante de clase A en *Antirrhinum*; en esta especie los rectángulos están abiertos por la parte izquierda indicando que la formación de sépalos es una continuación del FLIP. V1, V2, V3 y V4: verticilos 1, 2, 3 y 4 respectivamente, numerados desde el exterior al interior de la flor. Sép.: Sépalo. Pét.: Pétalo. Est.: Estambre. Carp.: Carpelo. *AP1* (Irish y Sussex, 1990); *AP2* (Jofuku *et al.*, 1994; Kunst *et al.*, 1989); *APETALA3* (*AP3*, Jack *et al.*, 1992); *PISTILLATA* (*PI*, Goto y Meyerowitz, 1994); *DEFICIENS* (*DEF*, Sommer *et al.*, 1990); *GLOBOSA* (*GLO*, Tröbner *et al.*, 1992); *AG* (Yanofsky *et al.*, 1990); *PLE* (Bradley *et al.*, 1993). (Esquema tomado de Davies *et al.*, 1999b).

A pesar de las diferencias descritas entre los mutantes de tipo B y C en *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, en estas especies las funciones B y C son claramente comparables, lo que en conjunto sugiere una similitud en el control de la formación de la flor. Sin embargo, la comparación entre las funciones A de *Antirrhinum* y *Arabidopsis* es más difícil; de hecho, en

*Antirrhinum* se cuestiona la existencia de la función A ya que hasta la fecha no se ha conseguido aislar ningún mutante de clase A.

### **2.3.2.2. La controversia de la función A: el proceso de iniciación floral y la función A en *Arabidopsis* y *Antirrhinum***

La propuesta en el modelo ABC de una función A que especifica la identidad de los órganos de los verticilos 1 y 2 de la flor, y que excluye a la función C de dichos verticilos, se basa en la existencia de los mutantes *ap1* y *ap2* de *Arabidopsis*. Las mutaciones *ap1* y *ap2*, además de afectar al FLIP, provocan defectos en la especificación de los órganos del periantio, de modo que los sépalos son sustituidos por órganos carpeloides, a veces de tipo foliar, y los pétalos desaparecen o muestran características estaminoides. Existen en *Arabidopsis* otros genes, como *CURLY LEAF (CLF)* o *LEUNIG (LUG)* que también contribuyen al control espacial (catastral) de la función C. Sin embargo, puesto que las mutaciones en *CLF* y *LUG* causan alteraciones en la expresión de C, pero no defectos en la especificación de los órganos florales, estos genes no se consideran de clase A.

Ni en *Antirrhinum* ni en ninguna otra planta distinta a *Arabidopsis* se conocen mutantes de clase A con defectos en la especificación de los órganos florales. Así, las mutaciones nulas del gen *SQUA* de *Antirrhinum* (el homólogo de *AP1*) sólo afectan a la iniciación floral y no provocan defectos en la identidad de los órganos florales. Las plantas mutantes *squa* producen inflorescencias en lugar de flores o, si ocasionalmente florecen, las flores muestran fenotipo silvestre. No obstante, la regulación transcripcional de *SQUA* durante el desarrollo floral y su relación negativa con la función C es similar a la de *AP1* en *Arabidopsis*. Por otra parte, los mutantes de los genes homólogos a *AP2* de *Antirrhinum*, petunia y maíz, no muestran fenotipo, lo que sugiere que el papel de este gen en el FLIP y su influencia en la identidad de órganos florales varía entre especies distintas (Davies *et al.*, 1999b; Maes *et al.*, 2001).

En principio, la actividad A en *Antirrhinum* fue definida en el modelo ABC de manera similar que en *Arabidopsis* (Coen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994). Sin embargo, la mutación *ovulata/macho*, que inspiró el modelo, es en realidad el resultado de la inserción de un transposón en un intrón del gen de función C, *PLE*, lo que conduce a la expresión ectópica del gen C en el periantio y, en consecuencia, a la transformación de sépalos a carpelos y de pétalos a estambres (Bradley *et al.*, 1993). Esta mutación de ganancia de función indica la existencia en *Antirrhinum* de un control negativo de la función C en el periantio de la flor, pero no informa acerca de la existencia de factores que

especifiquen la identidad de órganos del periantio. ¿Cuáles son entonces las funciones que controlan la especificación de los órganos del periantio en *Antirrhinum*?

Recientemente se han descrito dos mutantes de pérdida de función en *Antirrhinum*, *stylosa* (*sty*) y *fistulata* (*fis*) cuyas características morfológicas indican la presencia de actividad C en los verticilos externos (Motte *et al.*, 1998a). En los mutantes simples las transformaciones son débiles, pero el doble mutante *sty fis* muestra transformaciones severas del periantio en órganos reproductivos, de modo similar a algunos mutantes de clase A de *Arabidopsis*. Esto, junto a la detección de la expresión ectópica de *PLE*, sugiere que *STY* y *FIS* ejercen un control negativo sobre la función C en los verticilos externos de la flor. *STY* y *FIS* llevan a cabo esta función mediante el mantenimiento de la expresión de *FLO* y *SQUA* en el primer y segundo verticilo. Estudios genéticos han revelado la interacción entre el gen *STY* y los genes *FLIP*, ya que las alteraciones homeóticas se intensifican en los dobles *sty* y el mutante débil *flo* y en el *sty squa*. A pesar de la reducción en la actividad *FLO/SQUA*, ni el mutante *sty fis* ni *sty fis ple* muestran defectos en la especificación de los órganos florales del periantio, en contraste a la presencia de órganos similares a hojas en los mutantes de clase A o en los dobles AC de *Arabidopsis* (Bowman *et al.*, 1991). De esta forma *STY* y *FIS*, así como por inferencia *FLO* y *SQUA*, exhiben sólo actividades catastrales, como las del gen *LUG*, y en sentido estricto no pertenecen a la función A (Motte *et al.*, 1998a, b).

En resumen, los estudios llevados a cabo con mutantes de *Antirrhinum* (Motte *et al.*, 1998a, b) sugieren que en esta especie la función A no participa en la especificación de los órganos florales, sino que su función es puramente catastral, regulando la exclusión de la función C de los verticilos más externos. Hasta ahora no se ha identificado mutación alguna que permita separar la especificación de la identidad del primer verticilo de la especificación del meristemo floral. Quizás la situación en *Antirrhinum* se ajuste más a la visión que se proponía en una primera versión del modelo para el control genético de la identidad de los órganos florales en esta especie. En dicho modelo se incluían sólo las actividades B y C y se proponía que la producción de sépalos en el primer verticilo sería inherente a la iniciación del meristemo floral, lo cual sería un prerrequisito para la subsiguiente activación de las funciones B y C (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990).

### **2.3.2.3. Modelo ABCD**

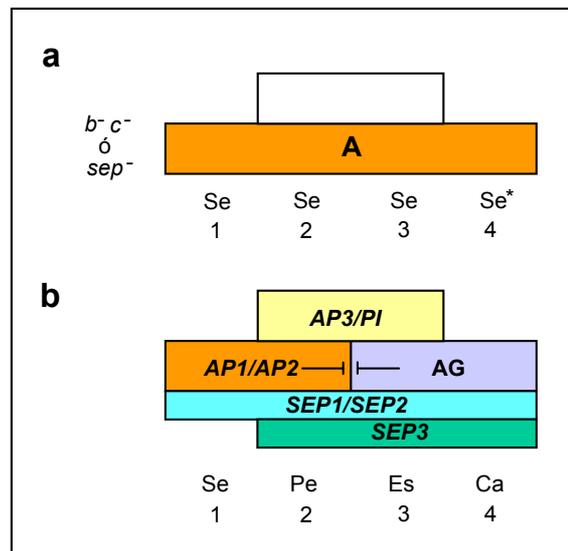
El modelo ABC propone que la acción combinatoria de tres grupos de genes, los genes de función A, B y C, especifican la identidad de los cuatro tipos de órganos de la flor. La teoría de que los órganos florales son simplemente hojas modificadas (Goethe, 1790) se ve

apoyada por la observación de que los triples mutantes a los que les faltan las actividades ABC producen flores en las que todos los órganos son de naturaleza foliar (Bowman *et al.*, 1991; Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz *et al.*, 1989). Sin embargo, los intentos por convertir los órganos vegetativos en órganos florales, expresando ectópicamente los genes A, B y C, han resultado fallidos, y sólo cuando los dos genes de tipo B, PI/AP3 se expresaron constitutivamente, se observó una ligera conversión de las hojas caulinares hacia pétalos, mientras que las hojas de roseta no se veían afectadas (Krizek y Meyerowitz, 1996a; Mizukami y Ma, 1992). Esto sugiere que los genes ABC son necesarios pero no suficientes para especificar la identidad de los órganos florales y que son necesarios otros factores adicionales para que estos genes sean activos fuera de la flor.

Recientemente se ha demostrado que, en *Arabidopsis*, las actividades de los genes de identidad de órgano B y C requieren de las actividades de tres genes próximamente relacionados entre sí denominados inicialmente *AGL2*, *AGL4* y *AGL9*, (Ma *et al.*, 1991; Mandel y Yanofsky, 1998) y renombrados más tarde como *SEPALLATA1/2/3* (*SEP1/2/3*) respectivamente. Esa nueva denominación se deriva del hecho de que las flores del triple mutante *sep1 sep2 sep3* se hallan constituidas por una reiteración indeterminada de verticilos de sépalos, un fenotipo similar al doble mutante *bc* (*ap3 ag, pi ag*) (Pelaz *et al.*, 2000). Sin embargo, mutaciones en cada uno de estos tres genes por separado apenas muestran fenotipo, lo que sugiere su redundancia funcional. Durante estadios tempranos e intermedios del desarrollo floral, *SEP1* y *SEP2* se expresan en los cuatro verticilos y *SEP3* sólo en los tres verticilos internos (Flanagan y Ma, 1994; Savidge *et al.*, 1995). Inicialmente se había propuesto que estos genes actuaban de intermediarios entre los genes de identidad de meristemo floral y los de identidad de órgano, puesto que comenzaban a expresarse en un estadio intermedio entre el inicio de la expresión de estos dos grupos de genes. Sin embargo, los genes *SEP1*, *SEP2* y *SEP3* no se requieren para la activación inicial de los genes B y C, dado que los patrones iniciales de expresión de los genes B y C no se ven modificados en el triple mutante *sep1 sep2 sep3* (Pelaz *et al.*, 2000). Por otra parte, la observación de que los genes *SEP1*, *SEP2* y *SEP3* se expresan todavía en los mutantes de identidad de órgano *b* y *c*, indica que éstos no actúan detrás de los genes B y C (Pelaz *et al.*, 2000) (Figura 5).

La existencia de interacción entre las proteínas SEP y los productos de los genes ABC se ha analizado mediante el uso del sistema del doble híbrido en levadura, estudios de coimmunoprecipitación *in vitro* y estudios *in planta*. Mediante el sistema del doble híbrido se ha demostrado que el heterodímero PI/AP3, que media la función B (Goto y Meyerowitz, 1994; Tröbner *et al.*, 1992), interacciona con AP1 y con SEP3 (Honma y Goto, 2001). No se ha observado interacción directa de AG con el heterodímero PI/AP3 (Honma y Goto, 2001), pero se ha descrito que AG y SEP3 interaccionan en levadura (Fan *et al.*, 1997), de manera

que se sugiere que SEP3 mediaría la interacción entre AG y el heterodímero PI/AP3 (Honma y Goto, 2001). Además, AG también interacciona con SEP1 y SEP2 (Fan *et al.*, 1997). También se ha observado la interacción entre AP1 y SEP3 (Honma y Goto, 2001). Estas interacciones han sido confirmadas en experimentos de inmunoprecipitación.



**Figura 5. Los genes ABC y SEP especifican la identidad de los órganos florales.** **a**, en un típico doble mutante *bc* (*ap3 ag* o *pi ag*) la única actividad que permanece es la A, que se expande y actúa en los cuatro verticilos. Estos dobles mutantes muestran un fenotipo (sepalo, sepalo, sepalo)<sup>n</sup> similar al del triple mutante *sep1 sep2 sep3*, lo que indica que las funciones B y C son inactivas en este triple mutante. Cuando la actividad C está ausente se desarrolla un número indeterminado de verticilos florales (\*). **b**, los tres genes *SEP* son redundantes y necesarios para el desarrollo de pétalos, estambres y carpelos. (Tomada de Pelaz *et al.*, 2000).

En los experimentos *in planta*, se ha demostrado que la expresión constitutiva de *PI-AP3-SEP3* y de *PI-AP3-AP1* es suficiente para transformar las hojas caulinares y las de roseta en órganos petaloides y que la expresión constitutiva de *PI-AP3-SEP3-AG* es suficiente para convertir las hojas caulinares en órganos estaminoides (Honma y Goto, 2001). Cuando *SEP3* y *AP1* se expresan constitutivamente en combinación con  $35S::AP3$   $35S::PI$  las hojas de roseta se transforman completamente en pétalos. Esta conversión es ligeramente más completa cuando además se sobreexpresa *SEP2* al mismo tiempo (Pelaz, *et al.*, 2001a; ver tabla 1). Estos resultados sugieren que es la ausencia de un factor positivo (*SEP3* o *AP1*) lo que impide la conversión completa de las hojas en pétalos en las plantas  $35S::AP3$   $35S::PI$ . Se ha sugerido que los genes *SEP* sean requeridos para la identidad de pétalo solamente cuando *AP1* está en niveles normales pero no cuando está sobreexpresado, como en las plantas  $35S::AP1$  (Jack, 2001), o bien que los genes *SEP* sean activados en las hojas de las plantas  $35S::AP1$   $35S::PI$   $35S::AP3$ , pero esto no se ha demostrado. Por otra parte, las

plantas 35S::*SEP1*, 35S::*SEP2* y 35S::*SEP3* no muestran cambios homeóticos en los órganos florales ni en hojas caulinares ni de roseta (Honma y Goto, 2001).

**Tabla 1. Expresión ectópica de los genes ABC y genes SEP.**

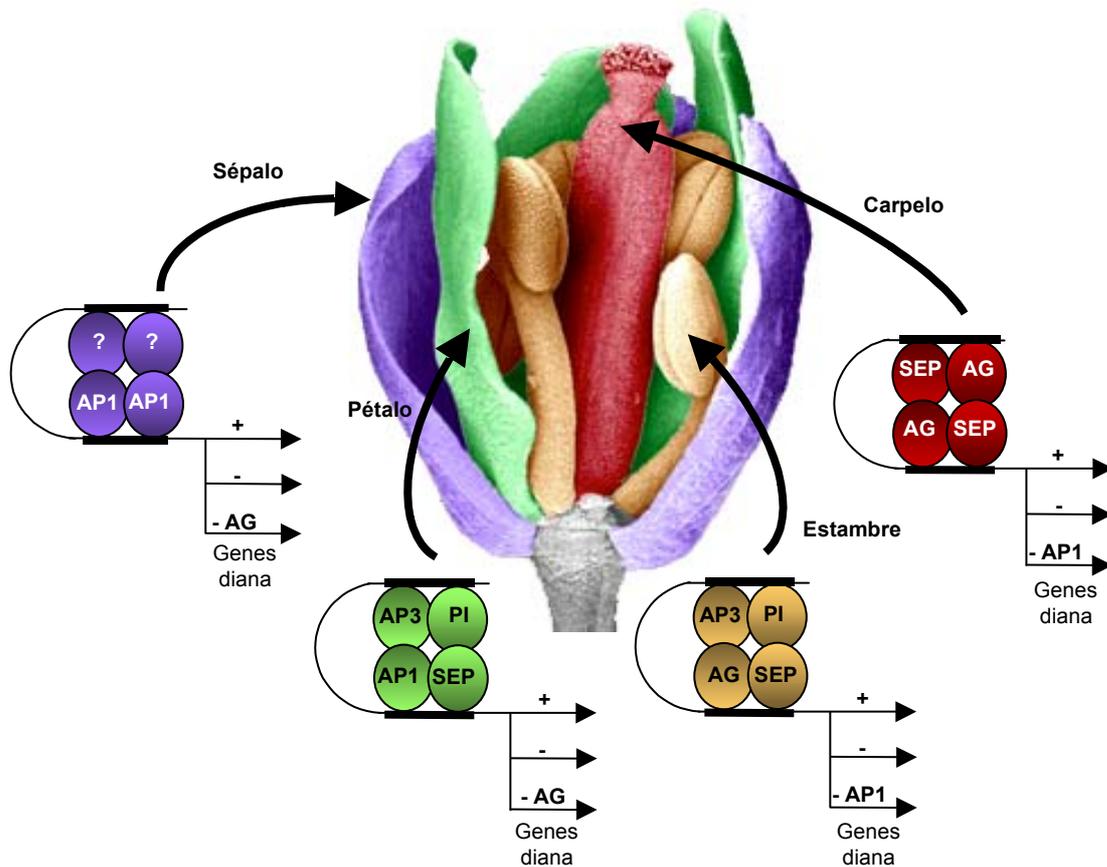
| Sobreexpresión           | Hojas caulinares      | Hojas de roseta       |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| AP3, PI                  | Ligeramente petaloide | Normal                |
| AP3, PI, SEP1            | Pétalos               | Ligeramente petaloide |
| AP3, PI, SEP2            | Pétalos               | Ligeramente petaloide |
| AP3, PI, SEP3            | Pétalos               | Ligeramente petaloide |
| AP3, PI, AP1             | Pétalos               | Ligeramente petaloide |
| AP3, PI, SEP3, AP1       | Pétalos               | Petaloide             |
| AP3, PI, SEP2, SEP3, AP1 | Pétalos               | Pétalos               |
| AP3, PI, SEP3, AG        | Estaminoide           | Normal                |
| AP3, PI, AG              | Ligeramente petaloide | Normal                |

(Tomado de Jack, 2001)

Todo este conjunto de observaciones ha conducido a la propuesta de que la formación de complejos proteicos ternarios y cuaternarios de las proteínas ABC puede constituir la base molecular del modelo ABC (revisado en Egea-Cortines y Davies, 2000; Honma y Goto, 2001) y que, además, la expresión específica en la flor de los genes *SEP* es lo que restringe la acción de los genes ABC a las flores. Se han propuesto varios modelos basados en el supuesto de que los genes *SEP* intervengan en la identidad de los órganos florales y en la formación de complejos entre las proteínas MADS (revisado en Jack, 2001). Uno de estos modelos, el más consistente con los datos de que se dispone, es el modelo del cuarteto (Figura 6). Este modelo propone que la identidad de los cuatro tipos de órganos florales se especifica por la formación de cuatro complejos proteicos diferentes entre las proteínas codificadas por los distintos genes homeóticos (Theißen, 2001; Theißen y Saedler, 2001). Los sépalos serían especificados por el complejo AP1-AP1-?-?, donde ? representa a factores desconocidos, que probablemente no incluyen a un homodímero de proteína SEP, puesto que éstas no se requieren para la formación de sépalos; los pétalos por el complejo AP1-AP3-PI-SEP; los estambres por AP3-PI-AG-SEP y los carpelos por AG-AG-SEP-SEP.

Cada tetrámero estaría formado por dos dímeros que interaccionan entre sí a través de la región C-terminal. Cada complejo se uniría a dos cajas CarG, una cada dímero, realizando su función de activación o represión. Se ha sugerido también que, mediante la formación de

estos complejos, AP1 y las proteínas SEP aportarían dominios de activación transcripcional al heterodímero PI/AP3 o a AG, dado que estas proteínas no muestran capacidad de activación transcripcional (Honma y Goto, 2001).



**Figura 6. El modelo del cuarteto para la especificación de los órganos florales en *Arabidopsis*.** El modelo propone que cuatro combinaciones diferentes de los polipéptidos de función A,B o C, junto con los productos de los genes *SEP* serían las responsables de determinar la identidad de órgano de los cuatro verticilos de la flor. Estos complejos de factores de transcripción ejercerían su función mediante su unión a motivos específicos presentes en la secuencia de los promotores de los genes diana, a los cuales activarían (+) o reprimirían (-). Dos dímeros de cada tetramero reconocerían dos secuencias diferentes (de tipo CarG, mostradas como líneas gruesas negras) en la misma cadena de DNA. El antagonismo entre las funciones A y C en el modelo clásico podría ser causado por la represión de AG por los complejos que contienen AP1. De la misma forma, los complejos que contiene AG reprimirían el gen AP1. (Adaptado de Theißen, 2001).

En *Antirrhinum* se han identificado tres genes (*DEFH200*, *DEFH72* y *DEF84*) con homología de secuencia, y patrón de expresión similar, a los genes *SEP* de *Arabidopsis*. Se ha demostrado la interacción entre *DEFH200* y *DEFH72* con el heterodímero *DEF/GLO*, que media la actividad B en *Antirrhinum*, y con la proteína codificada por el gen de función C *PLE* (Davies *et al.*, 1996a; Egea-Cortines y Davies, 2000). También se ha demostrado la interacción entre *SQUA* y el heterodímero *DEF/GLO* (Egea-Cortines *et al.*, 1999).

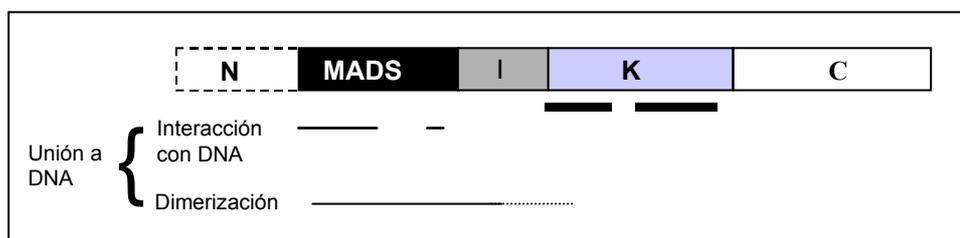
Una versión revisada del modelo ABC podría incorporar la función SEP como un nuevo tipo de genes de identidad de órganos florales que abarcara las funciones B y C, o bien como una nueva función D activa en los tres verticilos internos.

#### 2.3.2.4. Genes MADS

Las proteínas codificadas por los genes de identidad de órganos florales de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, con la excepción de *AP2*, son factores de transcripción que pertenecen a la familia MADS, una gran familia multigénica de las plantas vasculares. En las angiospermas, la mayoría de los genes MADS están implicados en el control de diferentes aspectos relacionados con el desarrollo, y, en particular, un buen número de ellos están relacionados con la iniciación y el desarrollo floral. No obstante, la función de este tipo de genes no está restringida al desarrollo de estructuras reproductivas de la planta, sino que también se ha observado la expresión de genes MADS en tejidos vegetativos, (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Burgeff *et al.*, 2002; revisado en Riechmann y Meyerowitz, 1997a; Shore y Sharrocks, 1995). De acuerdo con su secuencia proteica ha sido posible agrupar los factores MADS de diversas especies en distintas subfamilias (Purugganan *et al.*, 1995; Theißen *et al.*, 1996). Los miembros de cada subfamilia suelen tener además de la homología de secuencia, patrones de expresión y funciones similares.

Las proteínas MADS, como otros muchos factores de transcripción de eucariotas, muestran una organización estructural modular (Shore y Sharrocks, 1995) (Figura 7). En los factores MADS de plantas se distinguen cinco dominios estructurales: la región N (N), la caja MADS (M), la región I (I), el dominio K (K), y la región C-terminal (C) (revisado en Riechmann y Meyerowitz, 1997a; Theißen *et al.*, 2000). La región N sólo se ha identificado en AG y sus órtologos, así como en proteínas muy próximamente relacionadas, como AGL1 y AGL5. La región N consiste en una extensión de más de 51 aa en la región N-terminal de la proteína, que es altamente variable en secuencia y en longitud (14-53 aa) (Ainsworth *et al.*, 1995; Angenent *et al.*, 1993; Bradley *et al.*, 1993; Hardenack *et al.*, 1994; Kempin *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1991; Mandel *et al.*, 1992b; Mizukami *et al.*, 1996; Pnueli *et al.*, 1994a; Schmidt *et al.*, 1993; Tsuchimoto *et al.*, 1993; Yanofsky, *et al.*, 1990), y cuya función se desconoce, aunque se sabe que no es esencial para la represión de la función A (Mizukami *et al.*, 1996). La caja MADS es una región conservada de 56 aa, presente en todos los miembros de la familia, y debe su nombre a cuatro de los primeros miembros de la familia que fueron identificados: *MCM1* (de levaduras), *AGAMOUS* y *DEFICIENS* (de plantas) y *SRF* (de humanos) (Sommer *et al.*, 1990). La caja MADS es necesaria para la unión *in vitro* de estos factores a DNA y también está implicada en la dimerización (Davies *et al.*, 1996a;

Pellegrini *et al.*, 1995; Riechmann *et al.*, 1996a,b; Riechmann y Meyerowitz, 1997b; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Shore y Sharrocks, 1995). La región I, también llamada “L” o “linker”, está constituida por un segmento que varía considerablemente tanto en secuencia como en longitud (27-42 aá), que se sitúa entre la caja MADS y la región K; funciona como un determinante molecular en la especificidad de dimerización exhibida por algunos factores MADS, como AP1, AG, PI y AP3 (Huang *et al.*, 1996; Krizek y Meyerowitz, 1996b; Riechmann *et al.*, 1996a). La región K no está presente en las proteínas MADS de animales ni de hongos (Theißen *et al.*, 1996; Theißen y Saedler, 1995) y fue identificada por su similitud con el dominio “coiled-coil” de la queratina (Ma *et al.*, 1991). Está caracterizada por la existencia de una serie de aá hidrofóbicos regularmente espaciados, muy conservados, que permiten la formación de una hélice anfipática. Se ha sugerido que está implicada en la formación de homo y heterodímeros con otras proteínas MADS (Davies y Schwarz-Sommer, 1994; Huang *et al.*, 1996; Mizukami *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1996b; Zachgo *et al.*, 1995). La caja K puede mediar las interacciones entre dos proteínas incluso en ausencia de la caja MADS y la caja I (Davies *et al.*, 1996a; Fan *et al.*, 1997). Por último, la región C es la más variable, tanto en secuencia como en longitud, aunque se han identificado pequeños segmentos altamente conservados entre algunos factores de funciones similares (Davies y Schwarz-Sommer, 1994; Goto y Meyerowitz, 1994; Hansen *et al.*, 1993; Zachgo *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la región C-terminal de algunos factores, como AP1, sus homólogos y los genes *SEP*, contienen dominios de activación transcripcional que confieren a estas proteínas dicha capacidad (Cho *et al.*, 1999; Honma y Goto, 2001). La caja C también ha sido implicada en las interacciones proteína–proteína para la formación de complejos ternarios (AP1 o SEP3 con AP3-PI y SQUA con DEF/GLO) o de orden superior, aunque no parece necesaria para la formación de dímeros (Egea-Cortines *et al.*, 1999; Honma y Goto, 2001; Jack, 2001; Theißen, 2001; Theißen y Saedler, 2001).



**Figura 7. Estructura modular de las proteínas MADS de plantas.** Se muestran las distintas regiones de la proteína y su implicación en la interacción con DNA y en la dimerización, los dos aspectos claves para la unión a DNA. Además de la caja MADS, entre las regiones esenciales para la dimerización se incluyen también a parte de la región I (AG y AP1) o a la región I y parte de la región K (AP3 y PI) (Riechmann *et al.*, 1996b). Las líneas gruesas bajo la región K representan dos posibles  $\alpha$  hélices anfipáticas en dicha región (Ma *et al.*, 1991). (Esquema adaptado de Riechmann y Meyerowitz, 1997a).

Las proteínas MADS se unen a DNA como homo o heterodímeros, reconociendo un motivo, presente en regiones promotoras, conocido como caja CarG (CC A-rich GG), cuya secuencia consenso puede ser descrita como CC(A/T)<sub>6</sub>GG (Davies *et al.*, 1996a; Huang *et al.*, 1993, 1996; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Shiraishi *et al.*, 1993; revisado en Shore y Sharrocks, 1995).

La caja MADS parece ser la región principalmente implicada en la unión a estos motivos en el DNA (Davies *et al.*, 1996a; Heard *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1993, 1995, 1996; Mizukami *et al.*, 1996; Perry *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1996a, b; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Shiraishi *et al.*, 1993; Tröbner *et al.*, 1992; Zachgo *et al.*, 1995). Aunque inicialmente se había sugerido que la caja MADS determinaba la especificidad de unión de cada factor, se ha observado, sin embargo, que el intercambio de cajas MADS entre factores no relacionados no tiene efectos *in vivo* sobre dicha especificidad (Riechmann y Meyerowitz, 1997b). Recientemente se ha propuesto que las secuencias que flanquean las cajas CarG o las interacciones ternarias con otros factores, tanto con proteínas MADS como con proteínas no relacionadas, podrían modular la especificidad de unión de los distintos factores (Egea-Cortines y Davies, 2000; Honma y Goto, 2001).

### **2.3.2.5. Regulación del patrón de expresión de los genes de identidad de órganos florales**

El modelo ABC describe cómo las tres clases de genes homeóticos actúan en dominios discretos para especificar la identidad de los distintos tipos de órganos florales (Bowman *et al.*, 1991; Coen y Meyerowitz, 1991). Los análisis moleculares han mostrado que los dominios espaciales en los que actúan las funciones ABC corresponden en gran manera a los dominios donde se expresan los correspondientes genes homeóticos (Weigel y Meyerowitz, 1994). Existen dos procesos claves que permiten explicar el patrón de expresión de un gen: el establecimiento inicial y su mantenimiento; en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de cómo se establece el patrón de expresión de los genes de identidad de órgano floral (revisado en Ng y Yanofsky, 2000) (Figura 8).

Un modelo mínimo para el establecimiento del patrón ABC necesita explicar, al menos, cómo *AP1* es activado inicialmente en el meristemo floral y cómo *AG* y los genes de función B, *AP3* y *PI* son activados más tarde en sus dominios específicos. Los genes de identidad de meristemo floral *LFY*, *AP1* y *UFO*, cuyos patrones de expresión muestran un solapamiento espacial y temporal con los de los genes de identidad de órgano, juegan un papel esencial en el establecimiento de este patrón. *LFY* parece ser responsable de la activación de *AP1*, de *AG* y de los genes de función B, *PI* y *AP3*, mientras que *AP1* y *UFO*

sólo estarían implicados en el establecimiento de la expresión de los últimos (Busch *et al.*, 1999; Honma y Goto, 2000; Lee *et al.*, 1997; Levin y Meyerowitz, 1995; Parcy *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1999; Weigel y Meyerowitz, 1993; Wilkinson y Haughn, 1995).

Los resultados obtenidos mediante el uso de una versión de *LFY* con potencial de activación transcripcional constitutivo (*LFY-VP16*), muestran un papel de *LFY* en la especificación del destino del meristemo floral separable de su papel en la regulación de los genes de identidad de órgano (Parcy *et al.*, 1998). Además, trabajos recientes muestran que *LFY* activa a *AP1*, *AP3* y a *AG* usando diferentes mecanismos (Busch *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1999).

#### **2.3.2.5.1. Regulación de los genes de clase A y C**

El uso de una versión de *LFY* inducible por hormona esteroidea ha permitido demostrar que la expresión temprana de *AP1* es el resultado de la activación transcripcional por *LFY* (Wagner *et al.*, 1999), activación que no requiere correguladores específicos de flores (Parcy *et al.*, 1998); sin embargo, *LFY* parece tener un efecto indirecto en la expresión tardía de este gen (Wagner *et al.*, 1999).

Se ha demostrado también que *LFY* es potencialmente capaz de activar la expresión de *AG*, mediante su unión a secuencias del primer intrón de dicho gen, a través de todo el meristemo floral y que debe de interaccionar con otros correguladores específicos que hacen que esta expresión quede restringida al centro de dicho meristemo (Busch *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 1998; Sieburth y Meyerowitz, 1997). Recientemente, se ha mostrado que la proteína *WUSCHEL* (*WUS*), que se había descrito que juega un papel importante en el mantenimiento de la población celular indiferenciada en el centro de los meristemos del tallo, vegetativos, inflorescentes y florales (Mayer *et al.*, 1998), actúa junto con *LFY* para activar a *AG* en el centro de las flores (Lohmann *et al.*, 2001); esto sugiere una relación molecular directa entre la regulación de la división celular en el meristemo apical y el patrón de expresión de *AG* (Lohmann *et al.*, 2001). Además, una vez que se establece la expresión de *AG*, éste reprime a *WUS* creándose un “feedback” negativo que regula el balance entre la proliferación celular y la diferenciación en los meristemos florales (Lohmann *et al.*, 2001).

La restricción de *AG* al tercer y cuarto verticilo se halla controlada por la regulación negativa (catastral) que ejercen varios genes, parcialmente redundantes, como son *AP2*, *LEUGNIG* (*LUG*), *CURLY LEAF* (*CLF*), *AINTEGUMENTA* (*ANT*) y *ESTERILE APETALA* (*SAP*). Mutaciones en estos genes dan lugar a la expresión ectópica de *AG* en distintas regiones de la planta (Byzova *et al.*, 1999; Conner y Liu, 2000; Drews *et al.*, 1991; Elliot *et al.*, 1996; Goodrich *et al.*, 1997; Krizek *et al.*, 2000; Liu y Meyerowitz, 1995). Mientras que,

como se ha comentado antes, *LFY* activa la expresión de *AG* por su unión a una secuencia del primer intrón de éste, secuencias del segundo intrón de *AG* confieren patrones de expresión separables, específicos de carpelo y de estambre, donde *AP2* actúa como regulador negativo del primero y *LUG* del segundo (Deyholos y Sieburth, 2000).

*UFO* y *FIM* han sido implicados en el control de la regulación de los genes de identidad de órgano de función C aunque difieren en el modo en que llevan a cabo dicho control (Ingram *et al.*, 1995). El análisis de la expresión de *AG* y *PLE* en los mutantes *fim* y *ufo*, respectivamente, sugiere que en *Antirrhinum* la expresión de los genes de función C depende de la expresión de *FIM*, mientras que en *Arabidopsis* ésta es menos dependiente de *UFO* (Levin y Meyerowitz, 1995; Wilkinson y Haughn, 1995). *UFO* puede actuar como regulador negativo de *AG* en el primer y segundo verticilo, sin embargo, algo equivalente no se ha observado en los mutantes *fim* (Ingram *et al.*, 1995). *UFO* parece jugar un papel en el mantenimiento de la indeterminación de los meristemos inflorescentes a través de su regulación negativa del gen *AG* ya que la mutación en *UFO* conduce a la determinación del meristemo apical por expresión ectópica de *AG* (Wilkinson y Haughn, 1995).

Resultados recientes indican que la proteína HUA1 (Chen y Meyerowitz, 1999), que es una proteína de unión a RNA con motivos de dedos de zinc tipo CCCH, podría jugar un papel en la regulación de la expresión del gen *AG*. Es posible que HUA1 actúe sobre la expresión de *AG* a nivel del splicing del RNA, o bien, que *HUA1* colabore con *AG* regulando la expresión de genes diana de éste (Li *et al.*, 2001).

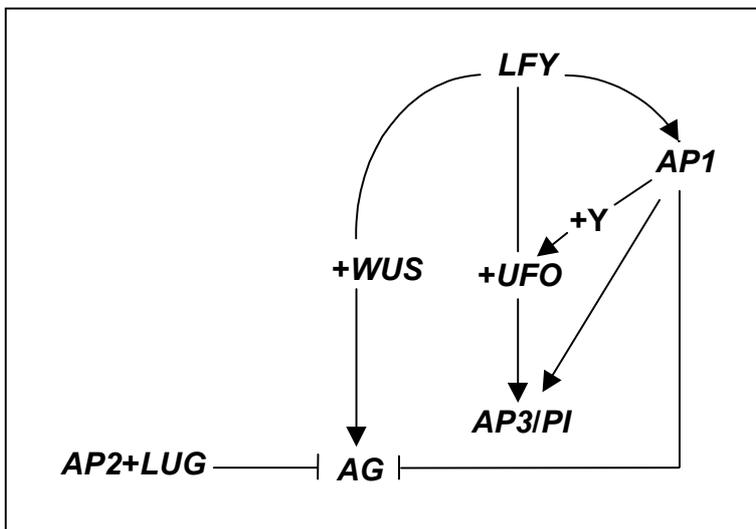
#### 2.3.2.5.2. Regulación de los genes de clase B

El establecimiento de la expresión inicial de *PI* y de *AP3*, se debe a la combinación de las actividades de los genes de identidad de meristemo floral *AP1*, *LFY*, y *UFO*. Así, en los mutantes *lfy*, *ap1 lfy*, o *ufo*, la expresión de *AP3* y *PI* se halla reducida (Lee *et al.*, 1997; Levin y Meyerowitz, 1995; Weigel y Meyerowitz, 1993; Wilkinson y Haughn, 1995); además, la expresión constitutiva conjunta de *LFY* y *UFO* conduce a la expresión ectópica de *AP3* (Parcy *et al.*, 1998). Se ha propuesto que la combinación de *LFY* con factores regionales como *UFO*, de expresión transitoria en los verticilos segundo y tercero en el tiempo en que se inicia la expresión de *AP3* y *PI* (Ingram *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997), conducen a la expresión localizada de *AP3* (Parcy *et al.*, 1998) y de *PI* (Honma y Goto, 2000). *AP1* y *LFY* juegan papeles parcialmente redundantes en la activación de los genes de clase B (Weigel y Meyerowitz, 1993).

En las flores más tempranas hay un requerimiento obligatorio de *AP1* para activar la expresión de los genes de clase B a través de *UFO*. Se ha propuesto que la cooperación de

*AP1* con otro factor (“Y”), o la modulación de la actividad transcripcional de *AP1* en un grupo de células del meristemo floral, podrían ser suficientes para establecer el dominio de la actividad de *UFO*; en las flores más tardías el circuito genético cambia y *AP1* puede activar a *AP3* y *PI* independientemente de *UFO* (Ng y Yanofsky, 2001). Se ha sugerido que *AP1* podría regular la expresión de *AP3* y de *PI* mediante mecanismos distintos, ya que *AP1* se une a elementos en la región promotora de *AP3* (Hill *et al.*, 1998; Tilly *et al.*, 1998), lo que sugiere la posibilidad de la interacción directa, si bien no parece capaz de unirse al promotor de *PI* (Honma y Goto, 2000).

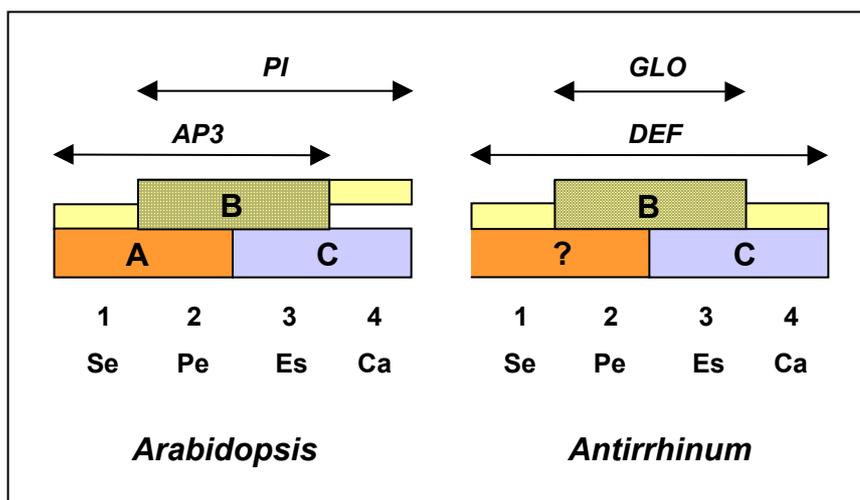
Se ha propuesto que *UFO* y su homólogo en *Antirrhinum* *FIM*, que contienen una caja F, podrían promover localmente la degradación de un represor transcripcional de *AP3/DEF*, mediante una ruta dependiente de ubiquitina, a través de interacciones con proteínas del tipo SKP1, incluyendo el producto del gen *ASK1-1* (*Arabidopsis* *SKP1-LIKE1-1*) de *Arabidopsis*, en complejos SCFs ubiquitina ligasa (por *Skp1*, *Cdc53*, *E-box* proteins; Bai *et al.*, 1996; revisado en Del Pozo y Estelle, 2000; Ingram *et al.*, 1997; Samach *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999), de forma análoga a las proteínas con caja F de otras especies. Recientemente, se ha demostrado que la mutación *ask1-1* intensifica los fenotipos florales de los mutantes débiles *lfy* y *ap3* y que *ASK1* regula la expresión temprana de *AP3* y de *PI*. Estos resultados apoyan la hipótesis de que *UFO* y *ASK1* juntos regulen positivamente la expresión de *AP3* y *PI* (Zhao *et al.*, 2001).



**Figura 8. Modelo para el establecimiento inicial del patrón de expresión de los genes ABC.** →: efecto inductor; ⊥: efecto represor. (Adaptado de Percy *et al.*, 1998 y de Ng y Yanofsky, 2000).

Durante la mayor parte del desarrollo de la flor, los dominios donde se expresan los genes de función B de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* son, en esencia, los mismos. No obstante, los patrones iniciales de expresión entre los homólogos funcionales *AP3/DEF* y *PI/GLO* son distintos (Figura 9). Los cuatro genes B se expresan en el segundo y tercer verticilo, sin

embargo, mientras que *AP3* se expresa además en la base de los sépalos, *DEF* se expresa inicialmente en el cuarto verticilo y, un poco más tarde durante el proceso de desarrollo floral, también ligeramente en sépalos (Jack *et al.*, 1992, 1994; Weigel y Meyerowitz, 1993; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992). *PI* se expresa inicialmente de manera transitoria en el cuarto verticilo (Goto y Meyerowitz, 1994), mientras que la expresión de su homólogo, *GLO*, queda restringida al segundo y tercer verticilo (Tröbner *et al.*, 1992).



**Figura 9. Diferencias en los patrones iniciales de expresión de los genes de tipo B de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*.** En *Arabidopsis*, *AP3* se expresa en la base de los órganos del primer verticilo y en los órganos del segundo y tercer verticilo (Jack *et al.*, 1992; Weigel y Meyerowitz, 1993) y *PI* se expresa inicialmente en el segundo, tercer y cuarto verticilo (Goto y Meyerowitz, 1994). En *Antirrhinum*, *DEF* se expresa inicialmente en el segundo, tercer y cuarto verticilo y, un poco después durante el proceso de desarrollo floral, también ligeramente en sépalos (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992), mientras que la expresión de *GLO* se halla restringida desde el principio al segundo y tercer verticilo (Tröbner *et al.*, 1992).

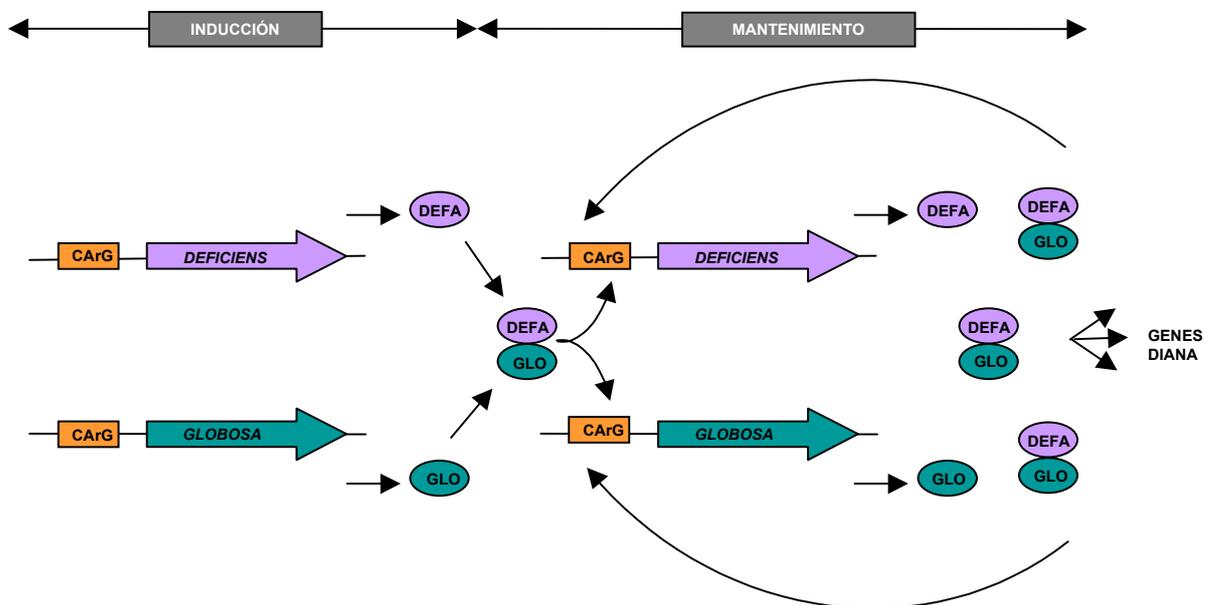
Una vez que se ha establecido el patrón inicial de expresión de los genes B en la flor, cuando la actividad de los genes de identidad de meristemo floral disminuye, la expresión de *AP3/PI*, en *Arabidopsis*, y *DEF/GLO*, en *Antirrhinum*, se mantiene por un circuito de autorregulación que implica la actividad de las dos proteínas de clase B de cada especie (Figura 10). En estadios tempranos del desarrollo floral, cuando se inician los primordios de sépalos, los genes *DEF/GLO* y *AP3/PI* se transcriben en dominios solapantes (Goto y Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1992; Krizek y Meyerowitz, 1996a; Sommer *et al.*, 1990; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992). En las células de los primordios del segundo y tercer verticilo, donde ocurre el solapamiento, los polipéptidos de los dos genes de clase B interactúan para formar un complejo heterodimérico (Davies *et al.*, 1996a; Goto y Meyerowitz, 1994; Riechmann *et al.*, 1996a; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992), que confiere estabilidad a ambos polipéptidos (Jack *et al.*, 1994; Krizek y Meyerowitz, 1996a; Zachgo *et al.*, 1995), y que es capaz de penetrar en el núcleo (en *Arabidopsis*;

McGonigle *et al.*, 1996), donde se une a secuencias diana del dominio MADS (motivos CarG; Riechmann *et al.*, 1996b; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992). Entre las dianas del heterodímero de clase B posiblemente se encuentran los promotores de genes implicados en el desarrollo de pétalos y estambres, así como los de los propios genes de clase B (autorregulación), como lo indica el hecho de que el mantenimiento de la expresión de estos genes depende de la disponibilidad de las dos proteínas de clase B en estado funcional (Goto y Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1994; Krizek y Meyerowitz, 1996a; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992; Zachgo *et al.*, 1995). El requerimiento de ambas proteínas para la estabilidad y la autorregulación podría explicar porqué la expresión en el primer o cuarto verticilo de uno solo de los genes de clase B es sólo transitoria (Goto y Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1992; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992; Weigel y Meyerowitz, 1993).

El modelo de la autorregulación de la transcripción de los genes de clase B cuenta con bastante soporte experimental. Así, se ha demostrado la unión *in vitro* del heterodímero DEF/GLO a las cajas CarG de los promotores de ambos genes (Davies *et al.*, 1996a; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992; Zachgo *et al.*, 1995). También, en el caso de *Arabidopsis*, se ha demostrado la existencia de tres motivos CARG en el promotor de *AP3*, cada uno de los cuales media en los diversos efectos reguladores de activación y autorregulación y se ha comprobado la unión *in vitro* del heterodímero PI/AP3 al promotor *AP3* (Hill *et al.*, 1998; Tilly *et al.*, 1998). Sin embargo este modelo no es de fácil aplicación al caso de *PI* ya que no existen cajas CARG en el promotor de este gen. Para el gen *PI*, se ha demostrado que, mientras que el establecimiento de su expresión inicial, mediada por *LFY* y *UFO*, se lleva a cabo vía elementos de la zona distal de su promotor, la autorregulación de *PI* a través del heterodímero *AP3/PI* se lleva a cabo vía elementos situados en la región proximal del promotor y, posiblemente, de manera indirecta, ya que no se ha detectado unión *in vitro* de este complejo heterodimérico al promotor (Honma y Goto, 2000). Los resultados de Honma y Goto (2000) sugieren que la modificación post-traducciona de PI y/o AP3, o la expresión de otra proteína codificada por un gen situado por debajo de *PI* y *AP3* que actuaría como cofactor del complejo PI/AP3 debe ser requerida para las interacciones entre el heterodímero PI/AP3 y el promotor *PI*.

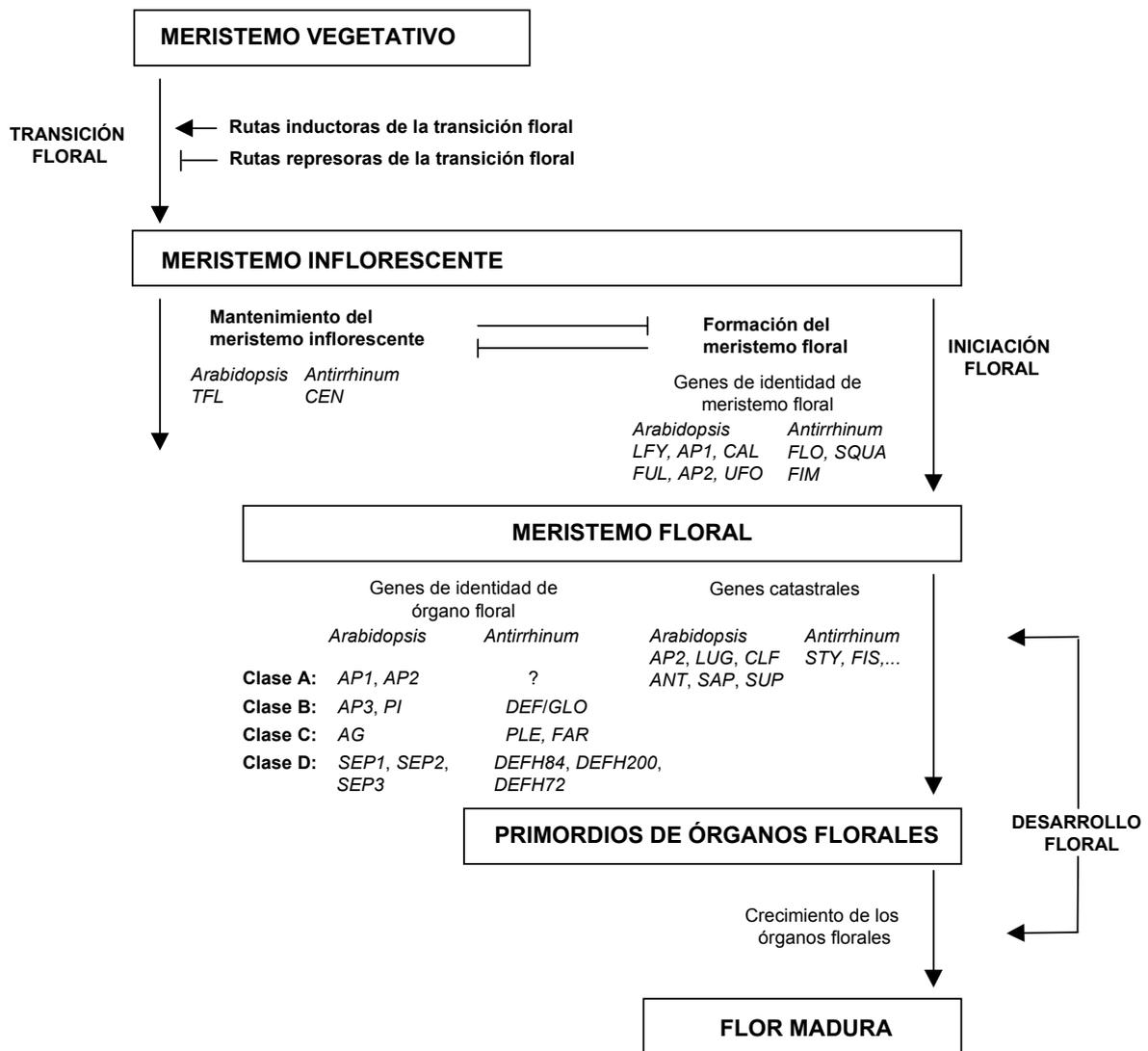
Samach *et al.*, (1997) han propuesto una versión más elaborada para el modelo de autorregulación de la transcripción de los genes de clase B, que trata de explicar observaciones experimentales que indican que, mientras que la proteína DEF es capaz de complementar los defectos en la especificación de órganos florales causados por la mutación en el gen *AP3*, su homólogo de *Arabidopsis*, la proteína de *Antirrhinum* es, sin

embargo, incapaz de activar la transcripción del promotor de *AP3* (Irish y Yamamoto, 1995; Samach *et al.*, 1997).



**Figura 10. Modelo del mecanismo de autorregulación de la expresión de *DEFICIENS* y *GLOBOSA*.** La expresión de los genes *DEF* y *GLO* se establece en dos etapas. La fase de inducción independiente de *DEF* y *GLO* produce una pequeña cantidad de cada proteína (representado por óvalos) que se combinan para formar heterodímeros. Durante la fase de mantenimiento, estos heterodímeros se unen a los motivos CArG de los promotores de sus propios genes para aumentar la transcripción, incrementando la cantidad de proteína y por tanto de heterodímeros. La producción amplificada de los heterodímeros permite que se activen los genes diana correspondientes. (Tomado de Davies y Schwarz-Sommer, 1994).

El mantenimiento de la expresión de *AP3* en pétalos y estambres depende también de la acción del gen *SUPERMAN* (*SUP*, previamente llamado *FLO10*), una proteína con dedo de zinc del tipo C2H2. Este gen está clasificado como un gen catastral, ya que las flores de los mutantes *sup* muestran estambres en el cuarto verticilo, coincidiendo con la expresión ectópica de *AP3* en dicho verticilo (Bowman *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995; Schultz *et al.*, 1991b). Por tanto el gen *SUP* es necesario para delimitar la frontera entre los verticilos tercero y cuarto, reprimiendo la expresión de *AP3* en este último, posiblemente por controlar el balance de proliferación celular de manera diferencial estos dos verticilos (Sakai *et al.*, 1995, 2000). Evidencias experimentales recientes sugieren que el efecto que ejerce *SUP* sobre los genes de tipo B no se debe sólo al efecto de este gen en la proliferación celular sino que existe una interacción directa entre éste y los genes de función B (Yun *et al.*, 2002).



**Figura 11. Esquema general del proceso de la floración.** Se muestran las etapas de dicho proceso y algunos de los genes de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* implicados en cada una de ellas. Las flechas verticales indican el sentido del cambio temporal de destino de los meristemos. → efecto inductor; ⊥ efecto represor.

### 3. LA FLORACIÓN EN GUISANTE

Los estudios de plantas con flores muestran que las funciones genéticas que controlan el desarrollo de las inflorescencias y flores están altamente conservados entre distintas especies. Un ejemplo de esta conservación es el modelo ABC que, en esencia, explica la especificación de la identidad los órganos florales en muchas especies de plantas (Bowman *et al.*, 1991; Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz *et al.*, 1991; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Weigel y Meyerowitz, 1994). Este y otros modelos de carácter general sobre el control

genético de la iniciación y el desarrollo floral se han derivado, fundamentalmente, de estudios realizados con *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, especies modelo que muestran una similar arquitectura de la inflorescencia y de la flor, y en las que estos procesos han sido analizados en detalle. Sin embargo, la gran variedad de morfologías de inflorescencias y de flores que se encuentra entre las plantas superiores indica que deben existir diferencias significativas en la naturaleza y el modo de acción de los genes que controlan el desarrollo de estas estructuras. En general, las flores de las especies de eudicotiledóneas superiores presentan una morfología y patrón de desarrollo similar, y en diferentes especies se han descrito mutantes florales con fenotipos que recuerdan a los estudiados en las especies modelo; además, las familias de genes MADS se hallan bastante conservadas entre distintas especies de eudicotiledóneas y monocotiledóneas (Ma y Pamphilis, 2000). Sin embargo, en los procesos de la iniciación y el desarrollo de flores se han identificado, en plantas como tabaco, petunia, tomate o maíz, diferencias en cuanto al número de genes responsables de una función determinada así como en cuanto al patrón de expresión, regulación o función de los genes homólogos a los de los sistemas modelo.

En comparación con la información disponible para especies como *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, los mecanismos moleculares que gobiernan el desarrollo floral en especies de interés agronómico, como el guisante (*Pisum sativum*), son muy poco conocidos. Aunque el guisante es una planta eudicotiledónea, como *Arabidopsis* y *Antirrhinum* (filogenéticamente más cerca de *Arabidopsis*), la manera en que se desarrollan sus inflorescencias y flores difiere significativamente de cómo estos procesos tienen lugar en las especies modelo. Esto, junto con la disponibilidad de una amplia colección de mutantes de esta planta afectados en el desarrollo de las inflorescencias y de las flores, resultado de estudios genéticos llevados a cabo a lo largo de muchos años (Ferrándiz *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 1996; Singer *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 1997b), hacen del guisante un sistema atractivo para estudios comparativos en la genética molecular de la floración.

### **3.1. INDUCCIÓN FLORAL EN GUISANTE**

Como se comentó al principio de la introducción, el tiempo en que tiene lugar la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo (transición floral) está, generalmente, regulado por factores ambientales, siendo la longitud del fotoperiodo y la temperatura los más importantes (Murfet, 1985; Murfet y Reid, 1974). Numerosos trabajos apoyan la hipótesis de que la conexión entre la percepción de la luz en las hojas y la iniciación floral en el ápice se debe a la acción de sustancias móviles similares a hormonas, cuya naturaleza bioquímica se desconoce (florigeno) (O'Neill, 1992; Reid *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 1997b).

La caracterización fisiológica, mediante el uso de injertos, de mutantes de guisante afectados en el tiempo de floración, han proporcionado evidencias de la existencia de dos tipos distintos de reguladores de la floración, móviles, producidos en los tallos: un estímulo floral y un inhibidor (Haupt, 1958; King y Murfet, 1985; Köhler, 1965; Murfet, 1971a; Murfet y Reid, 1973; Paton y Barber, 1955; Taylor y Murfet, 1996).

La mayor parte de los cultivares de guisante son plantas facultativas de día largo, aunque algunas son neutrales y otras son plantas de día largo obligado, que no pueden florecer bajo fotoperiodos de menos de 12 h sin vernalización (Murfet, 1985). El número de nudos vegetativos producidos antes de florecer en los genotipos analizados oscila entre 4, en las variedades más tempranas, y más de 100, en las especies más tardías crecidas bajo condiciones no inductivas. Aunque la fase reproductiva, una vez ha comenzado, es normalmente estable, bajo determinadas condiciones ambientales, como fotoperiodos no inductivos, las inflorescencias en desarrollo de algunos genotipos pueden abortar e incluso revertir transitoriamente a una fase de desarrollo vegetativo para florecer de nuevo en un nudo más tardío (Weller *et al.*, 1997b).

### **3.1.1. SUCESOS QUE TIENEN LUGAR EN LA HOJA**

#### **3.1.1.1. Percepción de la luz**

En guisante, el efecto inductor de la floración por la luz tiene lugar principalmente a través de dos tipos de respuestas (Reid y Murfet, 1977). Una respuesta requiere periodos largos de exposición a luz y se estimula más eficientemente por luz rica en rojo lejano. La otra sólo requiere exposiciones cortas a luz roja y muestra reversión parcial por rojo lejano. Ambas respuestas son similares a las descritas para otras especies de día largo y pueden corresponder a la acción de fitocromos (Weller y Reid, 1993).

Los mutantes *fun1* de guisante, deficientes en fitocromo A (no responden a luz roja lejana), presentan floración tardía en día largo. Este fenotipo es consistente con una pérdida de la capacidad para disminuir la producción del inhibidor en día largo, lo que ha sido confirmado mediante experimentos de injerto (Weller *et al.*, 1997b).

Los mutantes *lv*, deficientes en fitocromo B, presentan floración temprana (Weller y Reid, 1993), lo que indica que el efecto primario del fitocromo B sobre la floración es inhibitorio. La caracterización inicial de los mutantes *lv* sugirió que el efecto inhibitorio del fitocromo B se restringía a condiciones de día corto, sin embargo, consistentemente, se observa un pequeño efecto también en día largo.

### 3.1.1.2. Producción de mensajeros: mutaciones que afectan a la síntesis del inhibidor

Varios genes están implicados en la síntesis y/o transporte del inhibidor floral. Entre ellos, *STERILE NODES* (*SN*, Barber, 1959; Murfet, 1971a; Paton y Barber, 1955), *DIE NEUTRALIS* (*DNE*, King y Murfet, 1985) y *PHOTOPERIOD RESPONSE* (*PPD*, Arumingtyas y Murfet, 1994) actúan de manera complementaria en la ruta de inducción fotoperiódica, regulando la producción de este inhibidor durante la fase vegetativa en el tallo y en los cotiledones; el gen *ELF3* de *Arabidopsis* podría tener una función homóloga a la de estos genes (Levy y Dean, 1998). Las plantas con mutaciones en cualquiera de estos tres genes muestran un fenotipo de floración temprana con una reducida capacidad de respuesta tanto a la vernalización como al fotoperiodo (King y Murfet, 1985; Taylor y Murfet, 1996). La actividad *SN-DNE-PPD* disminuye en la luz a través de la acción del fitocromo A (Weller *et al.*, 1997a, b).

Dos genes adicionales, *EARLY INITIATING* (*E*, Murfet, 1971b) y *HIGH RESPONSE* (*HR*, Murfet, 1973a), influyen en la actividad del sistema *SN-DNE-PPD*. El alelo dominante *E* controla la producción de este inhibidor durante la fase vegetativa actuando en los primeros estadios de crecimiento para reducir la síntesis del inhibidor en los cotiledones (Murfet, 1971a, b; Murfet, 1973b), mientras que *HR* actúa posteriormente prolongando la actividad del sistema *SN-DNE-PPD* y, por lo tanto, manteniendo la síntesis del inhibidor en el tallo (Murfet, 1973a; Reid, 1979). La presencia del alelo dominante *HR* ocasiona una fuerte respuesta a fotoperiodo en la planta, de manera que bajo condiciones de día corto se produce un gran retraso en la floración; este gen tiene poco efecto en día largo ya que la producción del inhibidor se ve reprimida por el fotoperiodo largo (Murfet, 1971a, 1973a).

### 3.1.1.3. Producción de mensajeros: mutaciones que afectan a la síntesis del estímulo floral

Durante décadas se ha propuesto la existencia de un estímulo floral móvil en guisante, transmisible por injerto, sin embargo, la actividad de éste ha sido difícil de estudiar ya que no está sujeta a una fuerte regulación ambiental y en muchos casos está enmascarada por la acción del inhibidor (Haupt, 1958; Köhler, 1965; Murfet, 1971a). Hace algunos años se identificó un gen implicado en la ruta de síntesis del estímulo floral, el gen *GIGAS* (*GI*, Murfet, 1989). El mutante *gi* de guisante presenta similitudes con los mutantes *fca*, *fpa*, *fve*, *fy* y *ld* de *Arabidopsis* ya que todos ellos son mutantes recesivos de floración tardía con respuestas intensificadas a fotoperiodo y vernalización (Beveridge y Murfet, 1996; Levy y Dean, 1998). Se conocen dos mutantes recesivos de *GI* que muestran un retraso sustancial

en la floración y bajo determinadas condiciones no florecen, mostrando en este caso un fenotipo similar al del mutante *veg1*. En estas condiciones se puede promover la floración de las plantas *gi* injertándolas sobre un patrón silvestre, con raíces, cotiledones y tallo vegetativo, lo cual sugiere que estos mutantes son deficientes en el estímulo floral, el cual se mueve con o está asociado a fotoasimilados (Taylor y Murfet, 1994).

Recientemente, las medidas de niveles endógenos de hormonas y estudios de aplicación de giberelinas en plantas *gi-1*, *gi-2* y *veg1* han llevado a la sugerencia de que una reducción en el nivel de giberelinas, y quizás también en el de ácido indol acético, son responsables, al menos parcialmente, del fenotipo aéreo compacto en estos mutantes (Beveridge *et al.*, 2001). Se propone que en estos mutantes, en los que la floración es impedida por una falta de estímulo floral o por la incapacidad de respuesta a éste, la reducción de la actividad de los genes de respuesta a fotoperiodo, *SN*, *DNE* y *PPD*, bajo condiciones de día largo, causaría a una reducción en la fuerza del sumidero apical que se manifiesta en una reducción en la síntesis de giberelinas y auxinas y en una dominancia apical reducida (Beveridge *et al.*, 2001).

### **3.1.2. SUCESOS QUE TIENEN LUGAR EN EL ÁPICE: RECEPCIÓN DE LA SEÑAL FLORAL**

El locus *LATE FLOWERING (LF)*, en el que las mutaciones provocan floración temprana, juega un papel esencial en determinar la longitud mínima de la fase vegetativa en guisante bajo condiciones inductivas, y se considera implicado en la sensibilidad del ápice al estímulo floral (Murfet, 1985). Se ha sugerido que genes con funciones relacionadas a *LF* en *Arabidopsis* podrían ser *FLC* y *FRI* (Levy y Dean, 1998). Las diferencias generadas por los distintos alelos *lf* no son transmisibles por injerto, lo cual indica que este gen actúa en el ápice y está relacionado con la percepción del estímulo o actúa posteriormente a dicha percepción (Murfet, 1971a, 1985).

### **3.1.3. MODELO PARA LA INDUCCIÓN FLORAL EN GUISANTE**

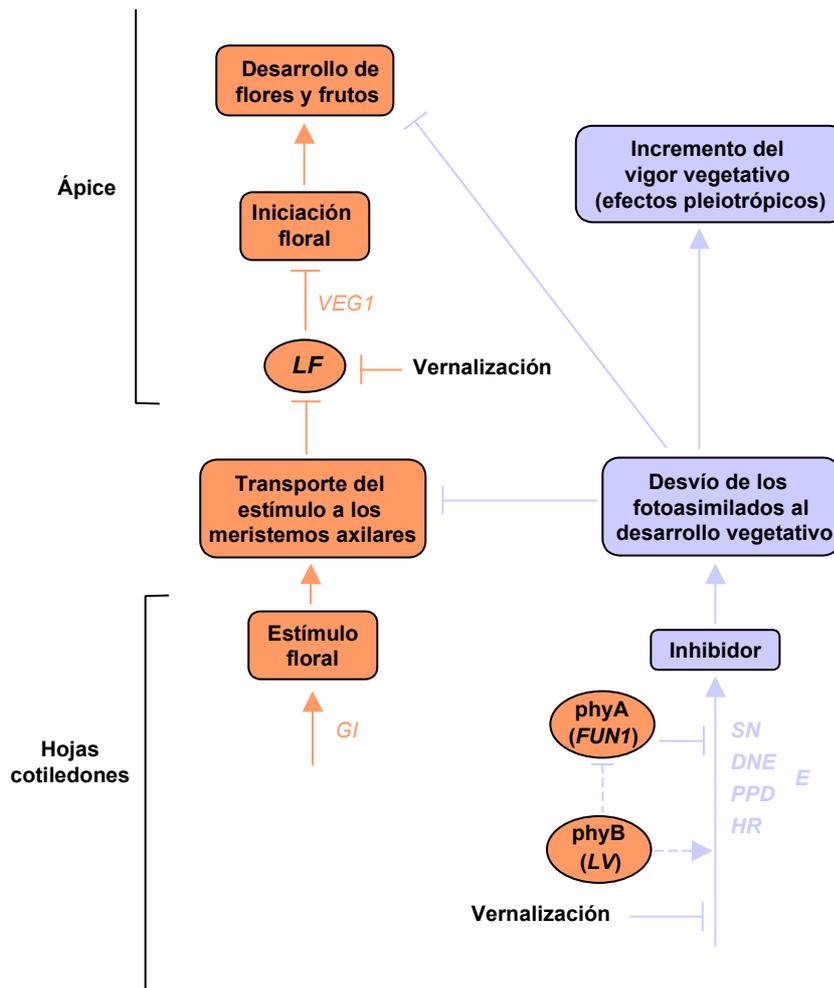
Los resultados de los estudios en guisante son consistentes con el modelo del balance, propuesto hace más de tres décadas (Murfet, 1971a), el cual sugiere que la floración ocurre cuando la relación entre el estímulo floral y el inhibidor supera un determinado umbral. En la figura 12 se muestra un esquema de la interacción propuesta entre estos dos mensajeros móviles. Se considera que el estímulo floral es esencial y específico del proceso de la inducción floral (Beveridge y Murfet, 1996). En contraste con esto, el inhibidor tendría una

función más amplia, mediante la regulación de la distribución de los fotoasimilados, promoviendo el estado vegetativo, interfiriendo con el transporte del estímulo floral a la región apical y retrasando el desarrollo de flores y frutos (Beveridge *et al.*, 1992; Murfet, 1985; Reid y Murfet, 1984; Taylor y Murfet, 1994). La producción del inhibidor es máxima en día corto y puede ser reducida por exposición a días largos o vernalización; cuando las cantidades del inhibidor son bajas, las plantas progresan rápidamente hacia la floración. En contraste con esto, el estímulo parece ser producido constitutivamente, independientemente del fotoperiodo. La inducción floral requiere una reducción en el ápice de la actividad del gen *LF*, el cual es reprimido de manera independiente del fotoperiodo por el estímulo floral, para el cual se ha sugerido que es una diana temprana (Beveridge y Murfet, 1996). La regulación fotoperiódica de la actividad de *LF* viene determinada por la reducción de la producción del inhibidor mediada por *FUN1* (Reid y Murfet, 1977). La vernalización puede actuar reduciendo la producción del inhibidor e incrementando la sensibilidad del ápice al estímulo floral (Weller *et al.*, 1997a).

**Tabla 2. Genes que controlan el tiempo de floración en guisante.**

| <b>Gen</b>  | <b>Modo de acción</b>   | <b>Sitio de acción</b> |
|-------------|---|------------------------|
| <i>FUN1</i> | Percepción de la luz mediante fitocromo A   | Hojas                  |
| <i>LV</i>   | Percepción de la luz mediante fitocromo B   | Hojas                  |
| <i>SN</i>   | Retraso de la floración, promueve la respuesta fotoperiódica y la producción del inhibidor floral   | Hojas y cotiledones    |
| <i>DNE</i>  | Retraso de la floración, promueve la respuesta fotoperiódica y la producción del inhibidor floral   | Hojas y cotiledones    |
| <i>PPD</i>  | Retraso de la floración, promueve la respuesta fotoperiódica y la producción del inhibidor floral   | Hojas y cotiledones    |
| <i>HR</i>   | Promueve la producción del inhibidor e intensifica el efecto de <i>SN</i> , <i>DNE</i> y <i>PPD</i> | Hojas                  |
| <i>E</i>    | Reduce la producción del inhibidor  | Cotiledones            |
| <i>GI</i>   | Promueve la floración, promueve la producción del estímulo floral                                   | Hojas                  |
| <i>LF</i>   | Especifica el nudo mínimo para florecer, regula la sensibilidad del ápice al estímulo floral        | Ápice                  |

(Adaptado de Howell, 1998)



**Figura 12. Esquema del modelo de regulación fotoperiódica de la transición floral en guisante mostrando la interacción entre el estímulo floral y el inhibidor.** →: efecto inductor; ⊥: efecto represor. La ruta del estímulo floral se muestra en naranja y la del inhibidor en violeta. (Adaptado de Reid *et al.*, 1996 y Weller *et al.*, 1997b).

En guisante, los estudios fisiológicos mediante injertos han sido cruciales para diferenciar mutantes con respuestas similares a vernalización y fotoperiodo y para identificar mutantes con efectos opuestos en la misma ruta. En guisante, como en *Arabidopsis* y muchas otras especies, se ha observado un gradiente acropétalo en la manifestación tanto de caracteres vegetativos como reproductivos. En *Arabidopsis* se ha propuesto que este gradiente resulta del nivel de actividad de un factor hipotético, que se ha denominado COPS, el cual sería parte integral del proceso de inducción floral, y funcionaría como una diana de los genes de tiempo de floración (Haughn *et al.*, 1995). Sin embargo, en guisante la interpretación de este gradiente sugiere un sistema más complejo, primariamente atribuible a la reducción de la producción del inhibidor con la edad de las hojas (Murfet, 1985; Reid, 1979). La actividad COPS en guisante habría de ser el resultado de la interacción de al menos dos, o

posiblemente tres, rutas inhibitoras distintas: una ruta constitutiva dependiente de *LF* y del estímulo floral; una ruta regulada y dependiente del inhibidor; y una posible ruta constitutiva independiente de *LF* (Weller *et al.*, 1997b).

### 3.2. CONTROL GENÉTICO DE LA INICIACIÓN FLORAL

Tanto en *Arabidopsis* como en *Antirrhinum* es el meristemo apical del tallo (SAM) el que directamente produce los meristemas florales, generándose así una inflorescencia de tipo racimo simple (Figura 13). Sin embargo, en guisante, las flores no son iniciadas directamente del meristemo apical del tallo. En esta planta, tras la inducción floral, el meristemo vegetativo (V) se convierte en lo que se ha denominado meristemo inflorescente primario ( $I_1$ ), también de crecimiento indeterminado. El  $I_1$  es comparable al V excepto que, en lugar de meristemas vegetativos, en la axila de cada hoja compuesta produce meristemas inflorescentes secundarios ( $I_2$ ). Cada meristemo  $I_2$  inicia uno o más meristemas florales, no sostenidos por brácteas, antes de determinarse en un órgano residual cubierto de pelos epidérmicos (Hole y Hardwick, 1976; Singer *et al.*, 1990), que constituye un marcador morfológico para distinguir meristemas  $I_1$  e  $I_2$ . El resultado de este patrón de desarrollo es la formación una inflorescencia de tipo racimo compuesto (Figura 13).

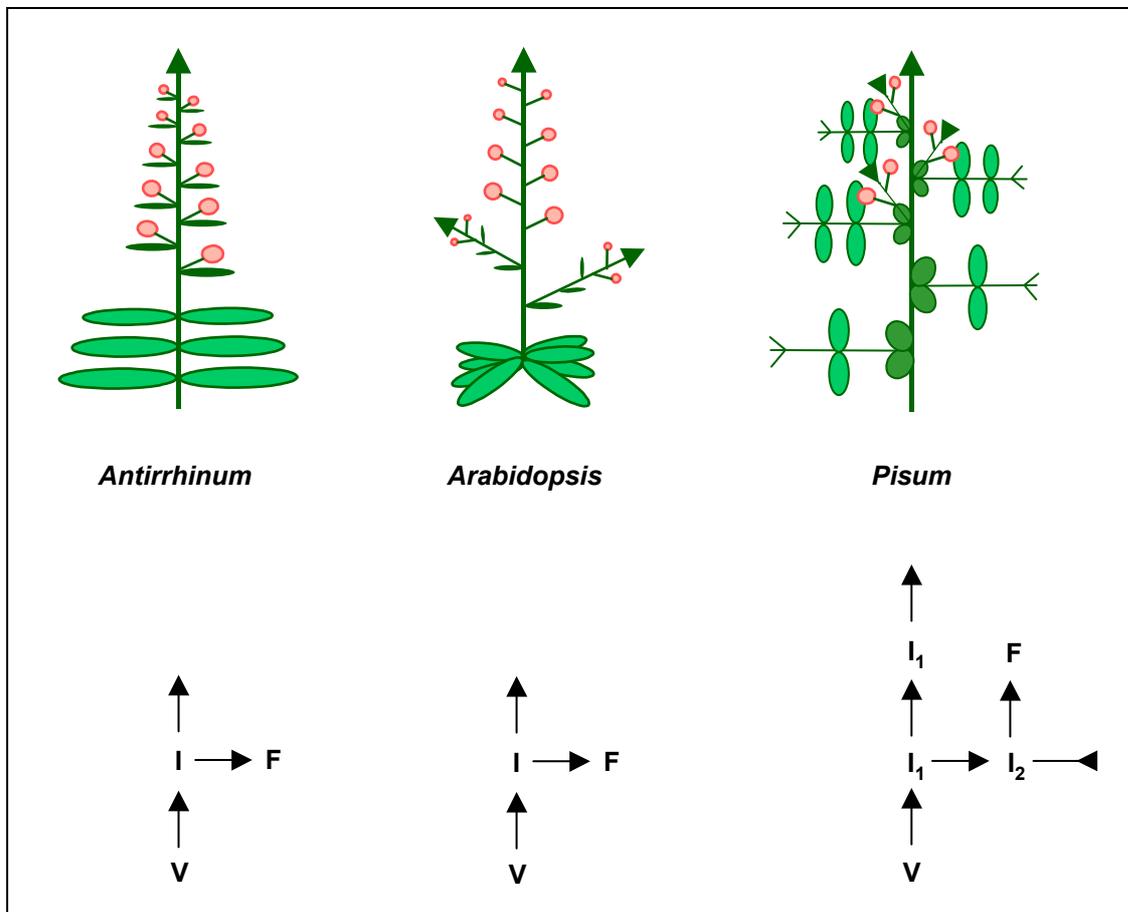
La caracterización de mutantes de guisante con defectos en la arquitectura de la inflorescencia y la especificación de los meristemas florales ha permitido identificar genes implicados en el proceso de iniciación floral en esta especie. El análisis comparativo del circuito genético que controla estos procesos en guisante con los de los sistemas modelo *Arabidopsis* y *Antirrhinum* proporcionará información relevante para entender mejor la evolución del desarrollo de la arquitectura de la inflorescencia.

#### 3.2.1. ESPECIFICACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL MERISTEMO INFLORESCENTE PRIMARIO ( $I_1$ ) Y DEL MERISTEMO INFLORESCENTE SECUNDARIO ( $I_2$ )

Se han identificado varios genes que están implicados, a distintos niveles, en la especificación de los meristemas inflorescentes primario y secundario de guisante.

El análisis del fenotipo de plantas mutantes *determinate* (*det*) es consistente con la interpretación de que el gen *DET* es necesario para mantener la indeterminación en el meristemo  $I_1$  ya que en este mutante el meristemo  $I_1$ , después de haber producido sólo dos o tres meristemas  $I_2$ , exhibe un patrón de crecimiento determinado típico de los  $I_2$ , diferenciándose en un órgano residual. El ápice de las plantas *det* forma una flor, sin embargo, dado que termina

generando un órgano residual, típico de los  $I_2$ , en este mutante no se considera que exista formación de una flor terminal en sentido estricto (Singer *et al.*, 1990).



**Figura 13. Representación esquemática de la arquitectura de la inflorescencia de *Antirrhinum*, *Arabidopsis* y guisante.** En las tres especies la inflorescencia es indeterminada. V: Meristemo vegetativo; I: Meristemo inflorescente; I<sub>1</sub>: Meristemo inflorescente primario; I<sub>2</sub>: Meristemo inflorescente secundario; F: Meristemo floral. Las flechas indican ejes de crecimiento indeterminado. La punta de flecha invertida representa un eje de crecimiento determinado.

Los mutantes *vegetative1* (*veg1*) nunca florecen; todas las posiciones donde se formarían inflorescencias laterales  $I_2$  aparecen ocupadas por ramas laterales vegetativas con un hábito de crecimiento indeterminado. Estas ramas producen a su vez ramas vegetativas de orden superior, en un patrón reiterativo (Gottschalk, 1979; Reid y Murfet, 1984). A diferencia del mutante *det*, en el doble mutante *det veg1* el  $I_1$  el meristemo apical del tallo se diferencia en una verdadera flor terminal, sin la diferenciación de ningún órgano residual. En *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, los genes *TFL1* y *CEN*, respectivamente, mantienen la indeterminación del meristemo apical, y en su ausencia en ambas especies el meristemo inflorescente se diferencia en una flor terminal (Bradley *et al.*, 1997; Shanon y Meeks-Wagner, 1991). Sin embargo, en guisante es necesaria la eliminación simultánea de *DET* y *VEG1* para la

formación de una flor terminal. Por sus características fenotípicas parece que *DET* es el candidato más probable para ser el homólogo de *TFL1* y *CEN* en guisante (Singer *et al.*, 1999). El papel de *DET* parece estar restringido al  $I_1$  y no altera el número de nudos vegetativos antes de la floración. Como ya se describió en el apartado 2.3.1.1, *CEN* tampoco tiene efecto en la fase vegetativa, sin embargo, se ha propuesto que *TFL1* tiene un efecto más global controlando la duración tanto de la fase vegetativa como de la reproductiva (Ratcliffe *et al.*, 1998). Se ha sugerido que *VEG1* no es necesario para la transición del meristemo vegetativo a  $I_1$  pero es esencial para la formación de las inflorescencias  $I_2$ , bien para la iniciación de los meristemos  $I_2$  a partir del  $I_1$ , o bien de los meristemos florales a partir de los  $I_2$  (Singer *et al.*, 1994, 1999). También podría ser esencial para la formación del órgano residual  $I_2$  (Singer *et al.*, 1994, 1999).

El gen *UNIFOLIATA* (*UNI*) tiene un papel adicional en el control del desarrollo del  $I_1$ , pero también afecta al desarrollo vegetativo. Dos de los alelos mutantes de *uni* provocan alteraciones en la morfología foliar, conduciendo a la formación de hojas simples o la conversión de los zarcillos en foliolos, lo que supone una reducción en la complejidad de la hoja de guisante. Además, el  $I_1$  de los mutantes *uni*, después de iniciar varios meristemos axilares  $I_2$ , termina con la diferenciación de un órgano residual, al igual que las plantas *det*. Este carácter fenotípico también se observa en las plantas *uni det*, que son indistinguibles de las plantas *uni*, lo que sugiere que *DET* actuaría por debajo de *UNI*, en la misma ruta de regulación de la especificación del  $I_1$  (Marx, 1987; Singer *et al.*, 1999).

Los meristemos  $I_2$  inician uno o dos meristemos florales antes de diferenciarse en un órgano residual. El gen *NEPTUNE* (*NEP*), del que se han identificado dos alelos mutantes, parece actuar limitando el número de flores iniciadas por el meristemo  $I_2$  antes de la formación del órgano residual, de modo que los mutantes *nep-1* producen cinco flores antes de que el meristemo  $I_2$  se diferencie en el órgano residual (Singer *et al.*, 1999). Las mutaciones *nep-1* y *nep-2* parecen liberar el crecimiento del meristemo  $I_2$  del estricto control genético. La interacción entre *DET* y *NEP* se ha investigado mediante el análisis de dobles mutantes *det nep-1*. El fenotipo es aditivo, de manera que las primeras dos ramas  $I_2$  producen cuatro o cinco flores, respectivamente, y, posteriormente, el  $I_1$  se transforma en un  $I_2$ , iniciando dos flores antes de diferenciarse en un órgano residual (Singer *et al.*, 1999).

Se han identificado dos alelos mutantes en un segundo *locus VEG* (*VEG2*, Murfet, 1992; Murfet y Reid, 1993). El mutante *veg2-1* tiene un fenotipo similar al de *veg1* mientras que el mutante menos severo *veg2-2* se caracteriza por un retraso en la floración y la conversión de las inflorescencias secundarias  $I_2$  en tallos con hojas y flores con potencial de crecimiento indeterminado (Murfet y Reid, 1993). *VEG2* parece conferir la identidad del meristemo  $I_2$ , ya que en las plantas *veg2-2* dicho meristemo no muestra signos de determinarse en un órgano

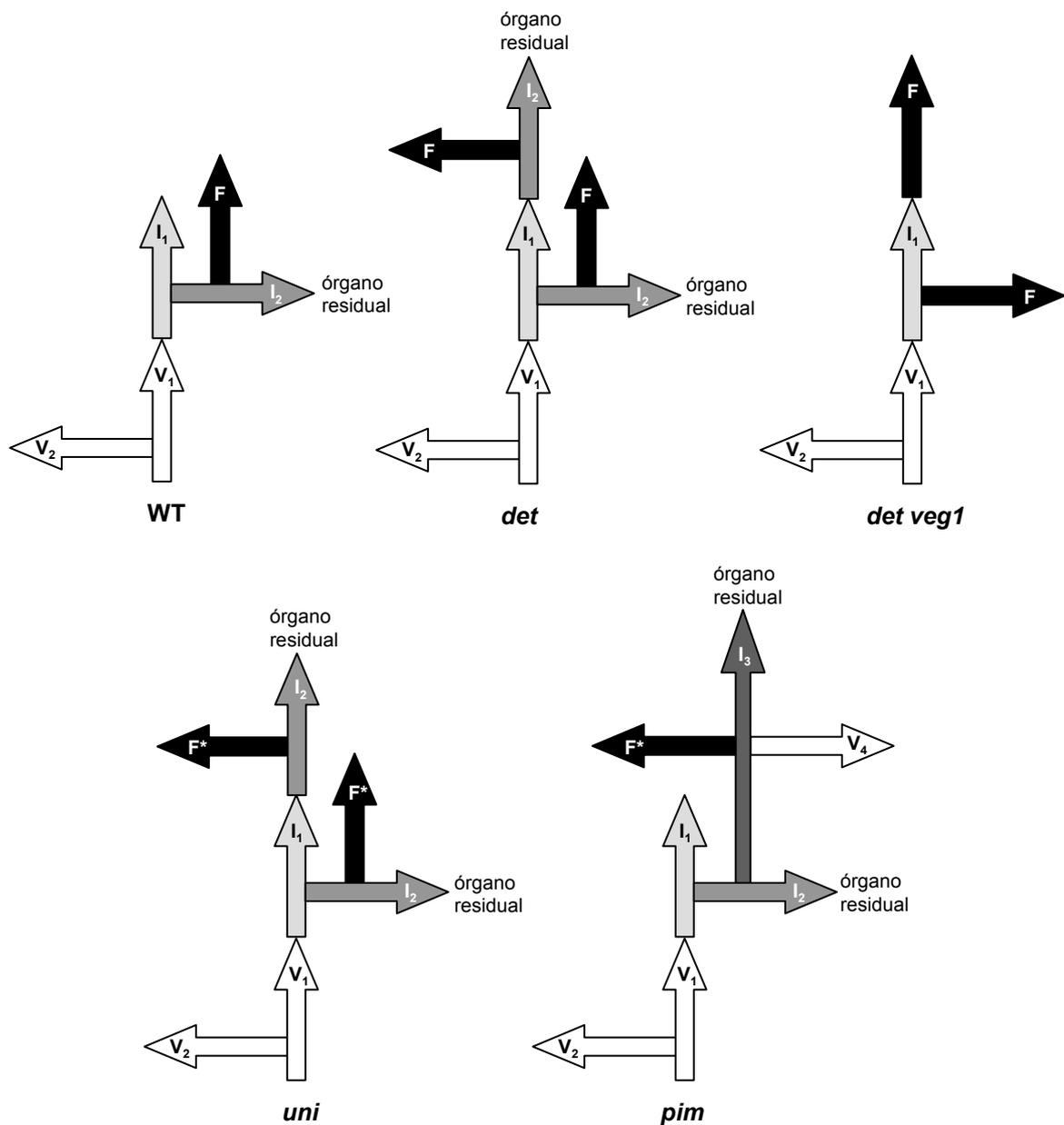
residual, sino que, en lugar de eso, se comporta como el meristemo  $I_1$  de las plantas WT (Murfet *et al.*, 1995). *VEG2* es epistático sobre *DET* y en los dobles mutantes *det veg2-1* y *det veg2-2* el fenotipo es similar al de los mutantes simples *veg2-1* y *veg2-2*, respectivamente (Murfet *et al.*, 1995). Estos resultados son consistentes con la propuesta de que *DET* y *VEG2* especifiquen de manera independiente la identidad del meristemo  $I_1$  e  $I_2$ , respectivamente. En el doble mutante *det veg2-2*, el meristemo  $I_1$  adquiere la identidad de  $I_2$ , y muestra un patrón de crecimiento indeterminado propio de una inflorescencia lateral *veg2-2*.

### **3.2.2. ESPECIFICACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL MERISTEMO FLORAL**

Entre la especificación del meristemo floral y la producción final de una flor normal y funcional, existen varios pasos en los se puede se pueden producir mutaciones que alteren el proceso normal de desarrollo. Tales mutaciones pueden afectar a la identidad de los meristemos florales, a la identidad de los órganos florales o pueden tener su efecto en pasos posteriores. Aquí se hace una síntesis de las principales mutaciones incluidas en las dos primeras categorías.

En el mutante *proliferating inflorescence meristem (pim)* (Maki *et al.*, 1993; Reid *et al.*, 1996; Singer *et al.*, 1994, 1995, 1999) los meristemos florales son frecuentemente reemplazados por meristemos inflorescentes de tercer orden en los que las flores únicas son sustituidas por una estructura altamente ramificada, que carece de pétalos, y que presenta meristemos adicionales en las axilas de los órganos del primer verticilo, órganos con características tanto de sépalo como de bráctea (Maki *et al.*, 1993; Singer *et al.*, 1995). La apariencia de esta inflorescencia termina siendo, de este modo, la de una estructura compleja, muy ramificada, que incorpora marcadores morfológicos de las fases vegetativa, inflorescente y floral (Singer *et al.*, 1999). Mientras que la mutación *pim* afecta a la identidad del meristemo floral, no tiene, sin embargo, efecto en la identidad de los meristemos  $I_1$  ni  $I_2$ , ni tampoco en el número de nudos que las plantas producen antes de florecer (Singer *et al.*, 1999).

El fenotipo del mutante *pim* se ve intensificado por la mutación recesiva *broccoli (broc)* (Singer *et al.*, 1999), que no produce alteraciones fenotípicas en un fondo genético silvestre. El doble mutante *pim broc* tiene un fenotipo más extremo que el fenotipo *pim*, ya que la ramificación que tiene lugar después de la formación de la inflorescencia de tercer orden es mayor y el desarrollo floral mínimo (Singer *et al.*, 1999). Así pues los genes *BROC* y *PIM* parecen ser parcialmente redundantes en la especificación de la identidad de los meristemos florales.



**Figura 14. Representación esquemática de la arquitectura de inflorescencia de algunos mutantes simples y dobles con alteraciones en el proceso de la iniciación floral.** En el mutante *pim* los meristemas inflorescentes terciarios generan meristemas cuaternarios que pueden tener distintos destinos, dos de los cuales están representados aquí.  $V_1$ : meristema vegetativo primario;  $V_2$ : meristema vegetativo secundario;  $I_1$ : meristema inflorescente primario;  $I_2$ : meristema inflorescente secundario;  $F$ : meristema floral;  $F^*$ : meristema floral que acaba formando una flor aberrante;  $V_4$ : meristema vegetativo cuaternario. (Adaptado de Singer *et al.*, 1999).

Morfológicamente, *pim* se asemeja al mutante *ap1-1* de *Arabidopsis thaliana*, el cual exhibe un fenotipo más severo cuando se combina con la mutación *cal* (Bowman *et al.*, 1993); *PIM* y *BROC* son, por lo tanto, potenciales homólogos de *AP1* y *CAL*, respectivamente (Singer *et al.*, 1999). El triple mutante *ap1 cal tfl1-2* tiene el mismo fenotipo

que *ap1 tfl1-2* por lo que parece que *tfl1* inhibe la intensificación del fenotipo de *ap1* por *cal* (Bowman *et al.*, 1993); sin embargo, en guisante el fenotipo del triple mutante *pim broc det* es aditivo, indicando que *det* no interfiere en la intensificación del fenotipo de *pim* por *broc* y sugiriendo que, de alguna manera, genes homólogos en distintas especies interaccionan de distintas formas y dan lugar a diferencias en la arquitectura de la inflorescencia (Singer *et al.*, 1999).

El mutante recesivo *A324* se caracteriza por mostrar meristemas florales que proliferan de forma que generan flores de segundo y tercer orden sobre pedicelos cortos que se originan en el interior del verticilo de sépalos. En estas flores de orden superior, se pierde la filotaxis verticilada y sólo se pueden identificar sépalos y carpelos. Además, en las flores de primer orden, los cinco pétalos del segundo verticilo son reemplazados por órganos con apariencia de sépalo, normalmente siete, y los estambres son rudimentarios (Reid *et al.*, 1996).

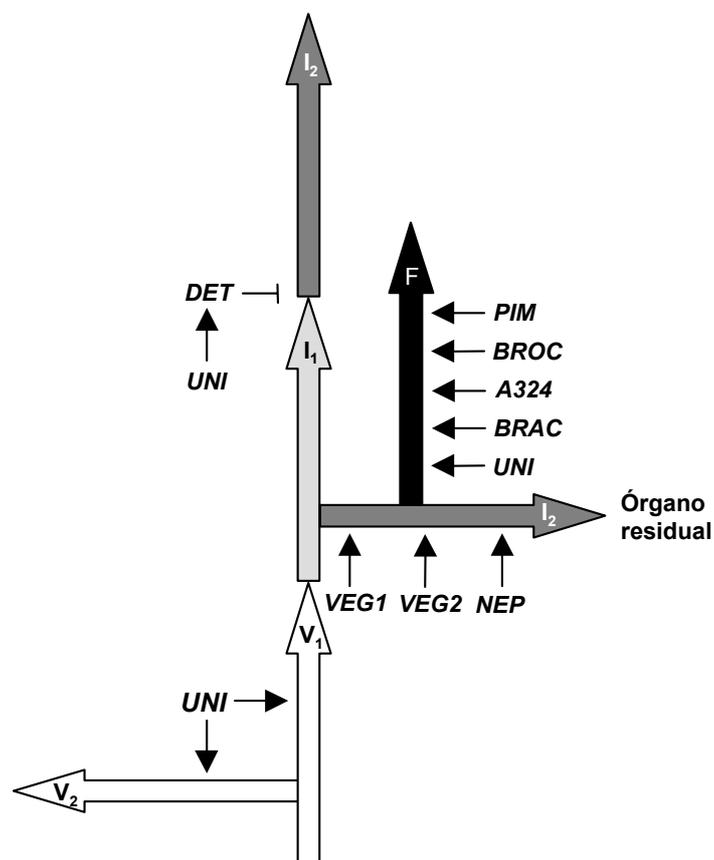
*UNI*, además de su papel en el desarrollo vegetativo y en la especificación de la identidad de  $I_1$ , juega un papel adicional en el desarrollo floral. En los mutantes *uni*, el  $I_2$  es normal y se diferencia en un órgano residual. Sin embargo, las flores, principalmente las jóvenes, son anormales y recuerdan a las producidas por el mutante *A324*. En los mutantes *uni* ni los pétalos ni los estambres están presentes y hay una repetida proliferación de flores que se componen de dos verticilos externos de órganos con apariencia de sépalo rodeando a varios carpelos aberrantes en el centro de la flor (Hofer *et al.*, 1997). En el doble mutante *uni pim* en el lugar donde se deberían formar flores se producen brotes, constituidos por verticilos de órganos similares a hojas, en los que no se detecta la presencia de órganos florales (Singer *et al.*, 1999). *UNI* es el ortólogo de los genes de identidad de meristemo floral *LFY* y *FLO*, de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente (Hofer *et al.*, 1997). Aunque, como ya se comentó anteriormente, el fenotipo floral de los mutantes *uni* es similar al de *lfy* o *flo*, *uni* también presenta alteraciones en los órganos vegetativos; esta característica no se observa en *lfy* ni en *flo*, lo que indica que este gen también juega un papel en la morfogénesis de la hoja de guisante.

Un mutante totalmente estéril, en la actualidad extinguido, era el denominado *leafy flower* (*lfflo*, Sharma, 1975). En este mutante, las flores, sostenidas por gruesos pedúnculos que tenían nudos, no aparecían como estructuras solitarias sino que tenía lugar una proliferación de estructuras foliares altamente anormales en las que todos los órganos de la flor se habían transformado en unos órganos foliares triangulares que se disponían en verticilos de tres.

El gen *FRONDOSUS* (*BRAC*, Ferrándiz *et al.*, 1999; Gottschalk, 1964) juega un papel importante en la especificación de los meristemas florales y en el desarrollo de la bráctea.

En los mutantes *brac* las flores presentan un órgano extra, de morfología foliar, en la base, una bráctea, así como alteraciones en el primer y segundo verticilo. Las alteraciones en la arquitectura de la inflorescencia son visibles bajo determinadas condiciones ambientales, y consisten en que el  $I_2$ , en lugar de producir flores, da lugar a una bráctea que sustenta un brote con características vegetativas y una inflorescencia axilar, la cual generalmente no se desarrolla, y un nuevo pedúnculo que genera una segunda bráctea en la que se reitera el patrón. *BRAC* juega un papel adicional en la morfogénesis floral, controlando principalmente el desarrollo de los órganos del primer y segundo verticilo, actuando posiblemente como un regulador catastral de las funciones A y B, como se deduce de la formación de sectores petaloides en los sépalos y en los estambres de las flores del mutante en este gen (Ferrándiz *et al.*, 1999).

En la figura 15 se muestra un modelo genético de la regulación de la arquitectura de la inflorescencia de guisante por los genes de iniciación floral.



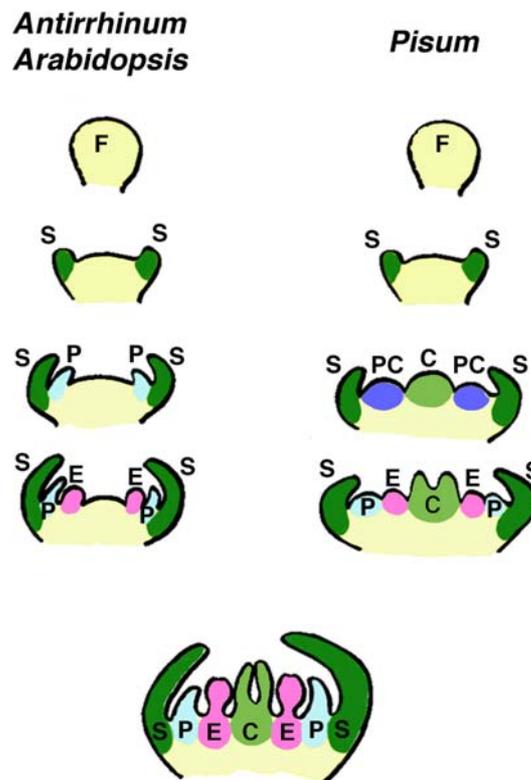
**Figura 15. Modelo del control genético de la arquitectura de la inflorescencia de guisante por los genes de iniciación floral.**  $V_1$ : meristemo vegetativo primario;  $V_2$ : meristemo vegetativo secundario;  $I_1$ : meristemo inflorescente primario;  $I_2$ : meristemo inflorescente secundario; F: meristemo floral;  $\rightarrow$ : Efecto inductor.  $\perp$ : Efecto represor. (Adaptado de Singer *et al.*, 1999).

### 3.3. DESARROLLO DE LOS ÓRGANOS FLORALES

La flor de guisante, organizada en cuatro verticilos, consiste en una estructura pentámera con cinco sépalos, cinco pétalos, diez estambres, nueve de los cuales están fusionados en un tubo estaminal, y un carpelo central. Los sépalos están fusionados en su base formando un tubo corto. La corola, típica de las papilionáceas, contiene tres tipos de pétalos: el estandarte o vexillum, que es el más grande y se encuentra situado en la posición adaxial de la flor, dos pétalos laterales, las alas o alae, y dos pétalos cortos, fusionados, formando la quilla en la posición abaxial.

La ontogenia de la flor de guisante es drásticamente diferente de la de las flores de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* (Figura 16). En las flores de estas especies modelo, la iniciación de los primordios de órganos florales es un proceso centrípeto y secuencial (Smyth *et al.*, 1990; Sommer *et al.*, 1990), de manera que primero se forman los primordios de sépalos, después los primordios que formarán los pétalos, inmediatamente seguido por los primordios de estambres y, finalmente, la parte central del meristemo floral forma el primordio del carpelo. En contraste con *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, el orden de iniciación de los órganos en cada verticilo de la flor de guisante es unidireccional, empezando desde la posición abaxial de la flor, y se da un alto grado de solapamiento en la iniciación de los distintos verticilos. En la flor de guisante los primordios de sépalos son también los primeros en iniciarse; sin embargo, los primordios de estambres y pétalos no son producidos directamente por el meristemo floral, sino que éste genera cuatro estructuras, denominadas primordios comunes, a partir de los cuales se diferencian más tarde los primordios de pétalos y de estambres (Ferrándiz *et al.*, 1999; Tucker, 1989). La formación de primordios comunes, opuesta a la formación de primordios discretos de pétalos y estambres, ha sido descrita en las flores de muchas leguminosas y también en las de algunas otras plantas no leguminosas (Delaet *et al.*, 1995; Evans y Dickinson, 1996; Kamenetsky y Akhmetova, 1994; Kirchoff, 1997; Sattler, 1967; Sundberg, 1982; Tucker, 1984, 1987, 1989). Dos de estos primordios comunes se forman en posiciones laterales, y los otros dos en posición adaxial y abaxial. Los procesos de diferenciación y proliferación dentro de cada uno de estos primordios comunes dan lugar finalmente a la formación de los órganos del segundo y tercer verticilo en la flor de guisante. Se pueden distinguir tres tipos de primordios comunes, en cada uno de los cuales, el número, tamaño y disposición de los órganos florales es diferente, esto indica que en cada uno de ellos debe tener lugar un complejo proceso de diferenciación de órganos, y sugiere que estas estructuras posiblemente juegan un papel central en la ontogenia de las flores de guisante (Figura 17C). Finalmente, mientras que en el desarrollo de las flores de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* el primordio del carpelo es el último

en iniciarse, en guisante este primordio comienza a formarse al mismo tiempo que los primordios comunes, antes de la diferenciación de los primordios de pétalos y estambres (Figura 17B).



**Figura 16. Esquema comparativo del desarrollo floral de *Antirrhinum*, *Arabidopsis* y guisante.** La formación de los primordios comunes, de los que más tarde se diferencian los primordios de pétalos y estambres, así como la iniciación temprana del carpelo, son las diferencias principales entre el desarrollo de los meristemos florales de guisante frente al de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*. F: Meristemo floral; S: Sépalo; PC: Primordio común; P: Pétalo; E: Estambre; C: Carpelo.

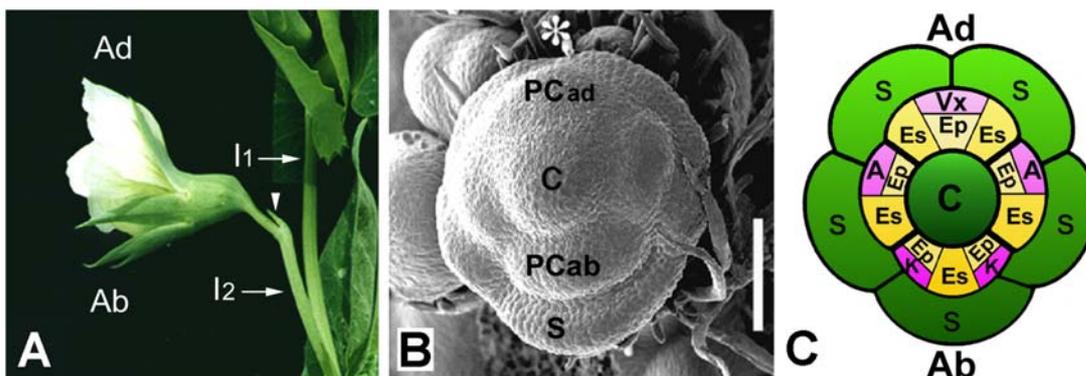
Se han caracterizado diversos mutantes de guisante que afectan al desarrollo de los órganos florales; entre éstos se encuentran los mutantes *stamina pistilloida* (*stp*, Gottschalk, 1963; Monti y Devreux, 1969), *94A* (*stpr*, Gottschalk, 1975) y *petalosus* (*pe*, Nilsson, 1932).

En los mutantes severos *stp-2* y *stp-4* se observa una transformación completa de los pétalos en sépalos y de los estambres en carpelos (Ferrándiz *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2001). La producción ocasional de flores secundarias o de orden superior en las axilas de los órganos del segundo verticilo de estos mutantes sugiere, además, un papel de este gen en la especificación del meristemo floral (Ferrándiz *et al.*, 1999). Los análisis de la ontogenia de las flores del mutante *stp-2* sugieren que *STP* podría estar implicado en el control de la identidad y la determinación de los primordios comunes y/o del meristemo floral

(Ferrándiz *et al.*, 1999). Recientemente se ha identificado a *STP* como el órtologo de guisante de los genes *FIM* y *UFO*, de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente (Taylor *et al.*, 2001); estos genes son reguladores positivos de la función B (Parcy *et al.*, 1998).

El fenotipo causado por la mutación *stp* es similar al provocado por mutaciones débiles en *STP*, sin embargo, las mutaciones *stp* no son alélicas a *stp*. En el doble mutante *stp stp-1* las flores muestran un fenotipo sinérgico, lo que sugiere una acción conjunta de ambos genes en la regulación y/o especificación de la función B. Por otra parte, no parece que *STPR* tenga una función en la determinación del meristemo floral (Navarro, 2001).

Las flores del mutante *petalopus* (*pe*) presentan un incremento en el número de pétalos y expansiones petaloides en los estambres, así como una pérdida de la determinación central del meristemo floral, un fenotipo que se asemeja al de los mutantes de clase C de *Arabidopsis* y *Antirrhinum* (Ferrándiz *et al.*, 1999; Nilsson, 1932). *PE* juega un papel fundamental para la correcta diferenciación y determinación de los primordios comunes, aunque no es esencial para su iniciación (Ferrándiz *et al.*, 1999).



**Figura 17. La flor de guisante de fenotipo silvestre. (A)** Flor de guisante (cv. Alaska) en el día de antesis, en la que están indicadas las posiciones adaxial (Ad) y abaxial (Ab); en este cultivar el meristemo inflorescente secundario ( $I_2$ ) sólo produce una flor y acaba diferenciándose en un órgano residual (punta de flecha).  $I_1$  meristemo inflorescente primario. **(B)** Yema floral de guisante en el estadio 4 de desarrollo, en el que se observan los cuatro primordios comunes formados entre los primordios de sépalos (S) y el de carpelo (C), así como el adelanto en el desarrollo de los órganos abaxiales frente a los adaxiales. Pcad: Primordio común abaxial. El asterisco indica la posición abaxial. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . **(C)** Esquema del meristemo floral de guisante mostrando los dominios que darán lugar a los distintos órganos florales. La gradación de color de más oscuro a más claro representa en cada verticilo el orden de iniciación de los primordios de órganos florales. Vx: Vexillum (Estandarte); A: Alae (Alas); K: Killa (Quilla); Es: Estambre antesépalo; Ep: Estambre antepétalo. (Tomado de Ferrándiz *et al.*, 1999).

#### 4. ANTECEDENTES

Con el fin de estudiar los procesos de la iniciación y del desarrollo floral en guisante, en nuestro laboratorio se han seguido dos aproximaciones: 1) la caracterización de mutaciones

homeóticas que afectan al desarrollo de la flor y 2) el aislamiento y la caracterización de una colección de genes de la familia MADS, potencialmente implicados en dicho proceso.

En relación al primer punto, inicialmente se realizó un análisis detallado de la ontogenia de la flor de guisante en los estadios más tempranos de su desarrollo, mediante SEM, lo que permitió establecer distintos marcadores morfológicos que han sido de gran utilidad para llevar a cabo la caracterización en detalle del fenotipo de dichos mutantes. Entre los mutantes simples caracterizados en nuestro laboratorio (Beltrán *et al.*, 1996; Ferrándiz, 1996; Ferrándiz *et al.*, 1999; Navarro 2001) se encuentran: *stp-1* y *stp-2*, (Gottschalk, 1963; Monti y Devreux, 1969), *pe* (Nilsson, 1932), *cc* (Gottschalk, 1967), *stpr* (Gottschalk, 1975) y *brac* (Gottschalk, 1964). En este sentido, también se ha llevado a cabo el estudio de las interacciones genéticas entre éstas y otras mutaciones que también afectan a los procesos de iniciación y desarrollo floral, mediante la caracterización fenotípica de dobles mutantes (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001).

Por otra parte, se ha llevado a cabo el aislamiento y la caracterización de ocho genes de la familia MADS de guisante (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001). Entre los genes aislados, dos se expresan tanto en órganos vegetativos como en florales (*PEAM2* y *PEAM3* - por *Pea MADS 2* y *Pea MADS 3*), mientras que los otros seis son de expresión específica en flores (*PEAM1*, *PEAM4*, *PEAM5*, *PEAM6*, *PEAM7* y *PEAM8*)

*PEAM2* y *PEAM3* presentan homología de secuencia con genes del grupo AP1/AGL9. Como se ha dicho anteriormente, ambos se expresan en órganos vegetativos y florales, aunque sus patrones de expresión son diferentes. *PEAM2* se expresa en todos los órganos de la planta analizados, incluida la raíz, y durante todo el desarrollo de la flor, mientras que *PEAM3* sólo se expresa en los órganos vegetativos aéreos y en flores.

*PEAM1* presenta un alto nivel de homología de secuencia con genes de identidad de órgano floral de clase B del grupo GLO (Theißen *et al.*, 2000) como *PISTILLATA (PI)* y *GLOBOSA (GLO)*, de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente. El estudio de expresión de *PEAM1* (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001) mostró que su mensajero se localiza fundamentalmente en la flor, comenzando a detectarse en el estadio 3 de su desarrollo, en el grupo de células que dará lugar a los primordios comunes, de los que se diferencian los primordios de pétalos y estambres. En flores maduras, su expresión queda restringida a pétalos y estambres. También se ha detectado la expresión de *PEAM1* en yemas vegetativas jóvenes, aunque en estos órganos la expresión es más débil que en flores. Los datos de homología de secuencia y patrón de expresión sugieren, por tanto, una posible relación funcional entre *PEAM1* y los genes de identidad de órgano floral de clase B.

*PEAM4* presenta homología a los genes pertenecientes a la subfamilia SQUA (Theißen *et al.*, 2000). En esta subfamilia, *PEAM4* se agrupa junto con *SQUA*, de *Antirrhinum* y *AP1* y

*CAL*, de *Arabidopsis*. Un análisis detallado de la expresión espacial de *PEAM4* durante el desarrollo de la flor de guisante, mediante hibridación de mRNA *in situ* (Berbel *et al.*, 2001; Navarro, 2001), mostró que este gen comienza a expresarse en el meristemo floral desde estadios muy tempranos del desarrollo, tan pronto como comienza a formarse el meristemo floral a partir del meristemo inflorescente secundario; poco después su señal desaparece de la región central del meristemo floral y su expresión se detecta en los primordios de los sépalos y en la región del primordio común que dará lugar a los primordios de pétalos; finalmente la expresión de *PEAM4* permanece restringida a sépalos, pétalos, receptáculo floral y pedicelo. Un patrón similar de expresión ha sido descrito para *AP1* y para *SQUA* (Huijser *et al.*, 1992; Mandel *et al.*, 1992b).

*PEAM5* presenta homología de secuencia con genes del grupo AP1/AGL9 y se expresa de manera específica en los primeros estadios del desarrollo de la flor.

*PEAM6* presenta homología de secuencia con los genes *SEPALLATA1 (SEP1)* y *SEPALLATA2 (SEP2)* de *Arabidopsis* (previamente denominados *AGL2* y *AGL4*, Ma *et al.*, 1991). Existen datos que sugieren una correlación del gen *PEAM6* con el mutante *vegetative1 (veg1)* (Gottschalk, 1979; Reid y Murfet, 1984), que nunca florece bajo ninguna de las condiciones testadas y en el que todas las inflorescencias laterales son reemplazadas por ramas laterales vegetativas. El gen *PEAM6* se localiza al final del cromosoma 5, en la misma posición que la mutación *veg1* y, además, está deleccionado del genoma de este mutante. El estudio de expresión de *PEAM6* (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001) mostró que ésta es específica de meristemos florales. *PEAM6* se expresa de manera uniforme en el meristemo floral desde estadios muy tempranos de su desarrollo (estadio 2), cuando éste comienza a formarse a partir del meristemo inflorescente secundario; posteriormente, la expresión de *PEAM6* se mantiene uniforme en todos los primordios de órganos florales en desarrollo. Finalmente, la expresión de *PEAM6* disminuye gradualmente en los primordios de sépalos, a partir del estadio 4, y en flores maduras su expresión se detecta en pétalos, filamentos de estambres y carpelo, acumulándose principalmente en los óvulos. La posible correlación de *PEAM6* con el mutante *veg1*, así como su expresión específica y temprana en los meristemos florales, sugiere la posibilidad de que este gen juegue un papel en el control de la iniciación floral en guisante.

## 5. OBJETIVOS

El guisante es una especie de interés agronómico que ha sido objeto de numerosos trabajos experimentales de tipo fisiológico, bioquímico y genético. Largos años de trabajo han conducido a la disponibilidad de una amplia colección de mutantes de esta planta afectados en diferentes aspectos del proceso de la floración y a la elaboración de modelos genéticos que tratan de explicar cómo tiene lugar la regulación del mismo. Existen, sin embargo, numerosas lagunas en la comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan las distintas etapas de este proceso en guisante y, en particular, la formación de los meristemas inflorescentes y florales, y el desarrollo floral (Ferrándiz *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 1997b).

Como se ha comentado anteriormente, los estudios llevados a cabo por nuestro grupo sobre este tema han tenido como resultado el aislamiento y la caracterización de varios genes de la familia MADS de guisante. Se ha insistido especialmente en tratar de entender el posible papel de estos genes en el control de la iniciación y el desarrollo floral de guisante, intentando asociarlos con algunas de las mutaciones descritas. A partir de datos de homología de secuencia y del patrón de expresión de estos genes se han formulado hipótesis tentativas sobre sus posibles funciones en guisante (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001). Sin embargo, la falta de un sistema eficaz de transformación para esta planta, que permita testar la capacidad de estos genes de complementar mutaciones, o analizar el fenotipo resultante de modificar su expresión, ha dificultado seriamente la asignación de funciones a los genes aislados.

Con el fin de profundizar en la caracterización de los genes MADS de guisante aislados en nuestro laboratorio nos hemos planteado **los siguientes objetivos** para este trabajo:

**PRIMERO.-** Llevar a cabo un estudio sobre la función de los genes MADS de guisante *PEAM1*, *PEAM4* y *PEAM6* mediante dos tipos de abordajes, alternativos a la transformación de guisante: (i) analizando el fenotipo resultante de su expresión constitutiva en plantas silvestres de los sistemas heterólogos *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* y (ii) ensayando la capacidad de los genes *PEAM4* y *PEAM1* de complementar mutantes de *Arabidopsis* de clase A y B, respectivamente.

**SEGUNDO.-** Utilizar la tecnología del doble híbrido en levaduras para: (i) identificar proteínas que interactúan con los productos de los genes MADS *PEAM4* y *PEAM6*, con el fin de diseccionar el circuito de interacciones que tienen lugar entre los genes implicados en el proceso de la floración de guisante, y (ii) testar la interacción entre las proteínas *PEAM4* y

*PEAM6*, cuyos patrones de expresión se solapan y que parecen estar implicadas en la iniciación floral de guisante.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. MATERIAL VEGETAL

En la tabla 3 se muestran las distintas líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

**Tabla 3. Genotipos, ecotipos y procedencia de las plantas de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo.**

| Genotipo              | Ecotipo                       | Procedencia                                | Uso                    |
|-----------------------|-------------------------------|--|------------------------|
| WT                    | Columbia (Col)                |  | Expresión constitutiva |
| WT                    | Landsberg <i>erecta</i> (Ler) |  | Expresión constitutiva |
| <i>ap1-1</i>          | Landsberg <i>erecta</i> (Ler) | Nottingham <i>Arabidopsis</i> stock centre | Complementación        |
| <i>35S::AP1 ap1-1</i> | Landsberg <i>erecta</i> (Ler) | Laboratorio de M. Yanofsky                 | Complementación        |
| <i>pi-1</i>           | Landsberg <i>erecta</i> (Ler) | Nottingham <i>Arabidopsis</i> stock centre | Complementación        |
| <i>ap3-1</i>          | Landsberg <i>erecta</i> (Ler) | Nottingham <i>Arabidopsis</i> stock centre | Complementación        |
| <i>ap3-3</i>          | Landsberg <i>erecta</i> (Ler) | Nottingham <i>Arabidopsis</i> stock centre | Complementación        |

Las plantas de *Nicotiana tabacum* utilizadas en este trabajo corresponden al cv. Petite Havana SR1.

Las muestras de los tejidos vegetales utilizadas para la extracción de ácidos nucleicos se recogieron directamente de la planta, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización. Las muestras destinadas a estudios de microscopía se fijaron para ser procesadas posteriormente, según se indica en el apartado 2.

#### 1.1.1. CONDICIONES DE CULTIVO DE PLANTAS

##### 1.1.1.1. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en macetas

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en cámaras bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. La temperatura se mantuvo constante a  $21^{\circ}\text{C}$  y la iluminación

procedía de tubos fluorescentes que proporcionaban luz blanca fría, con una intensidad de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-2}$  (Sylvania standard F58W/133-T8). Habitualmente, las plantas se cultivaron bajo condiciones de fotoperiodo inductivo, que eran de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL); las condiciones de fotoperiodo no inductivo fueron de 8 h de luz y 16 h de oscuridad (día corto, DC).

Las semillas de los distintos genotipos se sembraron en macetas de plástico de 11 ó 13 cm de diámetro, para cultivos de DL o DC, respectivamente, en una mezcla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1), previamente esterilizada a 1 atmósfera de presión durante 20 min. Las macetas se colocaron en bandejas dentro de las cámaras de cultivo y se regaron, por inmersión con agua destilada; una vez a la semana se regaba con solución Hoagland nº1, suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966). Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener una humedad alta durante la germinación y para evitar contaminaciones de semillas procedentes de otras plantas próximas, y se mantuvieron en oscuridad, a 4°C, durante tres días, a fin de sincronizar la germinación, antes de pasarlas a las cabinas. Cuando aparecía el primer par de hojas se agujereó el plástico en distintos puntos de la bandeja, y el número y tamaño de los agujeros se fue aumentando progresivamente hasta que, al cabo de dos o tres días se eliminó por completo el plástico. Habitualmente se cultivó un total de unas 15 plantas por maceta, bajo condiciones de LD, y de 7, bajo condiciones de DC.

#### **1.1.1.2. Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en cajas de Petri**

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en cajas 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 fué suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36W (Sylvania) con una intensidad de  $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ .

Las semillas se esterilizaron por inmersión, durante 1'5 min, en etanol 70% (v/v) y, posteriormente, durante 7 min, en una solución de lejía comercial al 30% (v/v) y 0'02% Tritón X-100 (v/v); inmediatamente después se lavaron 5 veces con agua Mili-Q estéril, en la campana de flujo laminar, antes de la siembra.

Para la selección de transformantes primarios las semillas esterilizadas se sembraron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro (30 mg de semillas, que equivale a unas 1500, en cada caja) que contenían medio de selección con kanamicina [2'2 g/l sales MS (Duchefa), 20 g/l sacarosa, 0'1 g/l MES pH 5'9, 0'6% agar (Pronadisa), 50 mg/l kanamicina, 300 mg/l timentina] usando agar semisólido (2'2 g/l sales MS (Duchefa), 20 g/l sacarosa, 0'1 g/l MES pH 5'9, 0'4% agar) para extender las semillas. Las cajas con las semillas se almacenaron

durante tres días a 4°C en oscuridad, tras lo cual se trasladaron a una cabina de cultivo *in vitro*. Después de 7-10 días desde la siembra los transformantes, que eran claramente identificables por su color verde y raíz elongada, se transplantaron, con ayuda de unas pinzas, desde las cajas de medio de selección, a alveolos de plástico de 6'5 x 6'5 x 5 cm con turba:perlita:vermiculita, donde se cultivaron en cabinas con temperatura constante y fotoperiodo de día largo bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.1. Para el análisis de segregación de las líneas transgénicas las semillas, tras su esterilización, se sembraron individualmente, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (40 semillas/placa) que contenían medio de selección con kanamicina.

#### **1.1.1.3. Cultivo de *Nicotiana tabacum* en macetas**

Las plantas de tabaco se cultivaron individualmente en macetas de plástico de 13 cm de diámetro que contenían una mezcla de turba:vermiculita (1:1), previamente esterilizada, en una cabina de invernadero bajo condiciones controladas, con una temperatura de 24°C durante el día y 18°C durante la noche. La luz natural se suplementó con luz artificial, mediante lámparas de vapor de mercurio de 400W [Phillips HDK/400 HPI (R)N], para mantener un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). El riego utilizado consistió en solución Hoagland nº1, suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966), aportada mediante un sistema de riego por goteo automatizado durante 2 min cuatro veces al día.

#### **1.1.1.4. Cultivo de *Nicotiana tabacum* en cajas de Petri**

El cultivo *in vitro* de tabaco 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), con una intensidad de luz de 90  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$  suministrada por tubos fluorescentes de luz tipo Gro-lux 36W (Sylvania). Las semillas se esterilizaron durante 5 min en una solución de 15% lejía (v/v), 0'02% tritón X-100 (v/v) y posteriormente se lavaron 5 veces con agua Mili-Q estéril en la campana de flujo laminar. Las semillas así procesadas, se sembraron, una a una, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían medio de selección con kanamicina cuya composición es 4'4 g/l sales MS (Duchefa), 30 g/l sacarosa, 0'1 g/l MES pH 5'9, 3'5 g/l phytigel (Sigma), 300 mg/l kanamicina.

Las plantas destinadas a el análisis fenotípico, cuyo cultivo se había iniciado mediante su siembra en cajas de Petri, fueron posteriormente transplantadas a alveolos de plástico de 6'5 x 6'5 x 5 cm con una mezcla de turba:vermiculita (1:1) previamente esterilizada. Estos

cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente, en el que progresivamente se fueron haciendo agujeros a fin de evitar una excesiva condensación de agua, durante 9 días; tras el periodo de aclimatación, las plántulas se transplantaron a macetas individuales, donde se cultivaron en cabinas en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo, como se describe en el apartado 1.1.1.3.

### 1.1.2. FERTILIZACIÓN CRUZADA

En algunos casos se ha realizado la fertilización cruzada de plantas de *Arabidopsis* y de tabaco. En *Arabidopsis* se ha utilizado para la obtención de dobles hemizigotos expresando constitutivamente dos genes MADS-box de guisante, a partir de plantas homocigotas para cada transgén y para la complementación de los mutantes *pi-1*, *ap3-1* y *ap3-3*. En tabaco, se ha utilizado para mantener líneas transgénicas estériles en hemizigosis.

El procedimiento para cruzar plantas de ambas especies consiste en emascular la flor receptora (madre) antes de la antesis, ya que en este estadio los estambres aún son inmaduros. La polinización de la flor emasculada se lleva a cabo aplicando directamente el polen de la flor donadora (estadio en que las anteras están dehiscentes) sobre el estigma de la flor madre. Para la complementación de los mutantes de *Arabidopsis* mencionados arriba, no fue necesaria la emasculación de la flor receptora ya que en estos mutantes las flores carecen de estambres.

## 1.2. MICROORGANISMOS

### 1.2.1. CEPAS BACTERIANAS

En este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas que se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.**

| Cepa  | Referencia/origen              | Uso                         |
|---|--------------------------------|-----------------------------|
| DH5 $\alpha$ ( <i>E. coli</i> )                   | Hanahan (1983)                 | Transformación de bacterias |
| TOP10 ( <i>E. coli</i> )                          | Invitrogen                     | Transformación de bacterias |
| ElectroMAX DH10B <sup>TM</sup> ( <i>E. coli</i> ) | Life technologies              | Transformación de bacterias |
| C58 pMP90 ( <i>A. tumefaciens</i> )               | Koncz y Schell (1986)          | Transformación de plantas   |
| LBA4404 ( <i>A. tumefaciens</i> )                 | Hoekema <i>et al.</i> , (1983) | Transformación de plantas   |

## 1.2.2. CEPAS DE LEVADURA

En este trabajo se han utilizado las cepas de levadura cuyos genotipos se detallan en la tabla 5.

**Tabla 5. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.**

| Cepa   | Genotipo <sup>a</sup>   | Delator(es) <sup>b</sup>                    | Referencias   |
|--------|---|---|---|
| AH109  | <i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub><sup>-</sup> GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> | <i>HIS3, ADE2, lacZ</i><br>(o <i>MEL1</i> ) | James <i>et al.</i> , (1996);<br>A. Holtz, no publicado   |
| Y190   | <i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh<sup>2</sup>, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3, MEL1 URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>                | <i>HIS3, lacZ</i> (o <i>MEL1</i> )          | Harper <i>et al.</i> , (1993);<br>Flick y Johnston (1990) |
| Hf7c   | <i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3::GAL4<sub>17-mers(x3)</sub>-CYC<sub>TATA</sub>-lacZ</i>                         | <i>HIS3, lacZ</i>                           | Feilotter <i>et al.</i> , (1994)                          |
| SFY156 | <i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, can<sup>r</sup> gal4-542, gal80-538, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>   | <i>lacZ</i>                                 | Harper <i>et al.</i> , (1993)                             |

<sup>a</sup> Las mutaciones *trp1*, *his3*, *gal4* y *gal80* son causadas por delección; *leu2-3*, *112* es una mutación doble. El gen *LYS2* no es funcional en la cepa Hf7c.

<sup>b</sup> Genes marcadores que están integrados en el genoma de la levadura: *lacZ* codifica para la β-galactosidasa; *HIS3* confiere prototrofia para la Histidina (His); *MEL1* codifica para la α-galactosidasa; *ADE2* confiere prototrofia para la Adenina (Ade).

*trp1-901*: requiere triptófano (Trp) en el medio para crecer (es un Trp auxotrofo).

*leu2-3*, *112*: requiere leucina (Leu) en el medio para crecer (es un Leu auxotrofo).

*ura3-52*: requiere uracilo (Ura) en el medio para crecer (es un Ura auxotrofo).

*his3-200*: requiere histidina (His) en el medio para crecer (es un His auxotrofo).

*ade2-101*: requiere adenina (Ade) en el medio para crecer (es un Ade auxotrofo).

*lys2-801*: requiere lisina (Lys) en el medio para crecer (es un Lys auxotrofo).

*gal4-542* o *gal4Δ*: deficiente en la regulación de los genes que metabolizan la galactosa (Flick y Johnston, 1990; Johnston *et al.*, 1994).

*gal80-538*: deficiente en la regulación de los genes que metabolizan la galactosa (genes GAL se expresan constitutivamente).

*cyh<sup>2</sup>*: resistente a cicloheximida

Para realizar los rastreos de una genoteca de cDNA de guisante, clonada en el dominio de activación del plásmido pACT2, con los productos de genes MADS-box de guisante como

cebo, se han usado las cepas AH109, Y190 y Hf7c; todas ellas contienen al menos dos genes delatores (*lacZ* y *HIS3*).

Para ensayar la interacción de dos proteínas conocidas en un ensayo de doble híbrido se utilizaron las cepas AH109, Y190 y la SFY526.

Debido a las diferencias en los promotores fusionados al gen *lacZ*, se dan distintos niveles de expresión de este gen delator en las distintas cepas bajo condiciones equivalentes de inducción por una interacción positiva: la cepa Y190 exhibe un nivel más alto de inducción de la  $\beta$ -galactosidasa que la Hf7c y la AH109; esto reduce el número de falsos positivos para esta cepa en los ensayo de interacción del doble híbrido. La razón es que el gen delator *lacZ* en la cepa Y190 está bajo el control de la secuencia GAL1 UAS intacta mientras que en las cepas Hf7c y AH109, la expresión de *lacZ* está dirigida por una secuencia consenso UAS<sub>G</sub> 17-mer y por una MEL1 UAS, respectivamente, ambas más débiles. La cepa SFY526 sólo tiene como gen delator el gen *lacZ*; esta cepa exhibe un nivel alto de inducción de la  $\beta$ -galactosidasa, aproximadamente igual al de la cepa Y190 en un ensayo positivo de interacción de doble híbrido. Los niveles relativos de  $\beta$ -galactosidasa en las distintas cepas usadas son, por tanto: Y190 $\cong$ SFY526>AH109>Hf7c.

En ausencia de inducción por interacción positiva se da una expresión rezumante del gen *HIS3* (crecimiento de fondo de la cepa); también existen diferencias entre las distintas cepas respecto a los niveles de expresión basal del gen *HIS3*. Para disminuir el fondo de crecimiento de las cepas en un medio SD sin His se usa el 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole), inhibidor competitivo de la actividad de la proteína de levadura *HIS3* (*His3p*) (Durfee *et al.*, 1993; Fields, 1993). La expresión basal del gen *HIS3* es muy alta en la cepa Y190 y, en ausencia de 3-AT, crece normalmente en un medio SD/-His; para suprimir el fondo de crecimiento de la cepa Y190 se requieren concentraciones 25-60 mM 3-AT. La desventaja de esta cepa es que al usar concentraciones elevadas del inhibidor en el medio de selección pueden no detectarse las interacciones débiles del doble híbrido. La cepa Hf7c es ligeramente rezumante para la expresión del gen *HIS3* y, en ausencia de 3-AT, crece lentamente en un medio SD/-His; para suprimir el fondo de crecimiento de la cepa Hf7c se requieren concentraciones 5-15 mM 3-AT y proporciona un rastreo mucho más sensible a la *HIS3*, sin que se pierda la detección de las interacciones débiles del doble híbrido.

La utilización de la cepa AH109, derivada de la cepa PJ69-2A, reduce el número de falsos positivos por usar tres genes delatores-*ADE2*, *HIS3*, y *MEL1* (o *lacZ*) bajo el control de promotores con distintas secuencias de reconocimiento para GAL4 y diferentes cajas TATA. Estos promotores producen respuestas a GAL4 fuertes y específicas. El gen delator *ADE2* proporciona una selección nutricional fuerte. Además, en principio, la cepa AH109 no es rezumante para la expresión del gen *HIS3* y no requiere 3-AT.

**Tabla 6. Promotores usados para regular la expresión de los genes delatores en las distintas cepas de levadura.**

| Cepa   | Gen delator | Origen de UAS                 | Regulación de UAS |   |
|--------|-------------|-------------------------------|-------------------|---|
|        |             |                               | por               | Nivel de expresión <sup>a</sup><br>inducido (no inducido) |
| Hf7c   | <i>lacZ</i> | <i>UAS<sub>G</sub> 17-mer</i> | GAL4              | Bajo  |
|        | <i>HIS3</i> | <i>GAL1</i>                   | GAL4              | Alto (ligeramente rezumante)                              |
| Y190   | <i>lacZ</i> | <i>GAL1</i>                   | GAL4              | Alto  |
|        | <i>HIS3</i> | <i>GAL1</i>                   | GAL4              | Alto (rezumante)  |
| SFY526 | <i>lacZ</i> | <i>GAL1</i>                   | GAL4              | Alto  |
| AH109  | <i>HIS3</i> | <i>GAL1</i>                   | GAL4              | Alto (no rezumante)                                       |
|        | <i>ADE2</i> | <i>GAL2</i>                   | GAL4              | Alto  |
|        | <i>lacZ</i> | <i>MEL1</i>                   | GAL4              | Bajo  |

<sup>a</sup> Nivel de expresión cuando es inducido por una interacción positiva en el doble híbrido; “rezumante” “no rezumante” o “ligeramente rezumante” se refiere a los niveles de expresión en ausencia de inducción.

### 1.2.3. CONDICIONES DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Los cultivos líquidos de bacterias, *E. coli* y *A. tumefaciens* se incubaron toda la noche a 37°C y 28°C respectivamente, con agitación de 200 rpm. Los cultivos de *E. coli* y *A. tumefaciens* en cajas con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C y de dos a tres días a 28°C, respectivamente.

Los cultivos líquidos de las distintas cepas de levadura se incubaron toda la noche a 30°C y con agitación de 250 rpm. Los cultivos en cajas con medio sólido se incubaron de tres a cinco días en estufa a 30°C.

### 1.2.4. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados para el crecimiento de los cultivos bacterianos fueron:

- **Medio LB (Luria-Bertani-Medium):** 1% triptona, 0'5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7'0; cuando se utilizó el medio sólido éste se solidificaba mediante la adición de 1'5% agar (Pronadisa).
- **SOC (Hanahan's SOC medium):** 2% triptona, 0'5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2'5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa.

Los medios utilizados para el crecimiento de los cultivos de levadura fueron:

- **YPD**, medio de crecimiento general sin selección: 2% Difco peptona, 1% extracto de levadura. Cuando se utilizó el medio sólido éste se solidificaba mediante la adición de 2%

agar (Pronadisa). Se ajustaba el volumen a 950 ml y el pH a 5'8 y se autoclavaba; cuando el medio estaba a aproximadamente 55°C se añadía glucosa al 2% (50 ml de una solución stock 40%). Para el medio YPD suplementado con adenina, YPDA, se prepara el medio YPD como se indica arriba y cuando el medio estaba a 55°C se le añadía 15 ml de una solución stock de adenina al 0'2% (concentración final del 0'003%).

- **Medio SD (Synthetic dropout)**, medio mínimo usado en las transformaciones de levadura para seleccionar y testar fenotipos específicos. Incluye una base nitrogenada, una fuente de carbono, y un stock de solución "dropout" que contiene una mezcla específica de nutrientes esenciales (aminoácidos y nucleótidos). Uno o más nutrientes esenciales se omitían para seleccionar los transformantes portando el gen nutricional correspondiente. Se añadían 6'7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y 2% agar (Pronadisa, para cajas). Se ajustaba el volumen a 850 ml y se autoclavaba; cuando el medio estaba a 55°C se añadía glucosa al 2% ( 50 ml de una solución stock al 40%), 100 ml de la solución estéril 10x dropout y 1 M de 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) a una concentración que depende de la cepa de levadura.

La solución 10x Dropout (DO): en las soluciones 10x dropout se omitían uno o más de los siguientes componentes nutricionales. Los componentes específicos omitidos dependen del medio de selección deseado. Para preparar SD/-Trp/Leu, por ejemplo, se usa un suplemento de 10x Dropout sin Trp y Leu.

Concentración (10x)

|                |           |
|----------------|-----------|
| L-Isoleucina   | 300 mg/l  |
| L-Valina       | 1500 mg/l |
| L-Adenina      | 200 mg/l  |
| L-Arginina HCl | 200 mg/l  |
| L-Histidina    | 200 mg/l  |
| L-Leucina      | 1000 mg/l |
| L-Lisina (HCl) | 300 mg/l  |
| L-Metionina    | 200 mg/l  |
| L-Fenilalanina | 500 mg/l  |
| L-Treonina     | 2000 mg/l |
| L-Triptófano   | 200 mg/l  |
| L-Tirosina     | 300 mg/l  |
| L-Uracilo      | 200 mg/l  |

## **2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS VEGETALES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)**

### **2.1. FIJACIÓN**

Las muestras vegetales se fijaron introduciéndolas en p-formaldehído al 4% (p/v) en 1x PBS pH 7, inmediatamente después de su recolección. Posteriormente, fueron sometidas a dos o tres pulsos de vacío, de 3 min cada uno, se les cambió la solución fijadora por una fresca y se mantuvieron en ella durante 4-16 h a 4°C. Tras el proceso de fijación los tejidos se lavaron 2 veces con 1x PBS y se deshidrataron hasta 70% etanol mediante una serie de lavados sucesivos, de 30 min, a 4°C, en soluciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%); en este punto las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente a 4°C hasta el momento en que vayan a ser analizadas por microscopía electrónica de barrido.

### **2.2. PUNTO CRÍTICO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

Las muestras previamente fijadas y almacenadas en etanol del 70%, tal y como se explica en el apartado anterior, se incubaron en etanol del 85% durante 30 min y luego en etanol absoluto durante al menos una hora. Posteriormente, las muestras se desecaron en CO<sub>2</sub> líquido, en un aparato secador de punto crítico Polaron E300, y 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 de barrido JEOL JSM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de 10 kV y distancia de trabajo de 25 mm.

## **3. VECTORES PLASMÍDICOS**

Las clonaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de la procedencia de los fragmentos de DNA y de los fines requeridos (Tabla 7).

Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy, que contiene un sitio de clonación específico para productos de PCR con una adenina libre en los extremos 3'.

El plásmido binario, pBINJIT60, se utilizó para la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* mediante transformación con *Agrobacterium*

*tumefaciens* (apartado 6.). Se utilizó para llevar a cabo la expresión constitutiva de *PEAM1*, *PEAM4* y *PEAM6* en plantas de estas dos especies. El plásmido pBINJIT60 está construido a partir del "casette" del plásmido pJIT60, que aporta el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con el "enhancer" duplicado (2x35S), el sitio de clonación múltiple del pUC9 y la secuencia de poliadenilación del CaMV, [CaMV poli (A)<sup>+</sup>] (Guerineau *et al.*, 1992), extraído como fragmento *KpnI* y *XhoI*, y subclonado en los sitios *KpnI* y *Sall* del plásmido binario pBin19. El pBIN19 contiene el gen *NPTII*, que confiere resistencia a la kanamicina, fusionado al promotor y al terminador de la nopalina sintetasa (*pnos* y *tnos*), incluido en el T-DNA (Bevan, 1984). El vector resultante pBINJIT posee un tamaño de 13'2 kb aproximadamente y presenta como sitios únicos de clonaje *Sall*, *BamHI* y *SmaI*.

**Tabla 7. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

| Plásmido    | Características   | Origen/referencia   |
|-------------|---|---|
| pBIN-JIT60  | Kan <sup>r</sup>  | Guerineau y Mulleneaux (1993)   |
| pGEM-T Easy | Amp <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , promotores T7 y SP6  | Promega   |
| pRL171      | Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>  | Elhai y Wolk (1988)   |
| pACT2       | Amp <sup>r</sup> , <i>LEU2</i> , GAL 4 DNA-AD, P <sub>ADH1</sub> , T <sub>ADH1</sub> , HA, NLS SV40 T-antigen, Col E1 ori y 2 μ ori       | Li <i>et al.</i> , (1994);<br>Sistema: GAL4 2H-2; (# U29899)                  |
| PGBKT7      | Kan <sup>r</sup> , <i>TRP1</i> , GAL 4 DNA-BD, P <sub>ADH1</sub> , T <sub>T7 &amp; ADH1</sub> , P <sub>T7</sub> , c-Myc pUC ori y 2 μ ori | Louret <i>et al.</i> , (1997);<br>Sistema: GAL4 2H-3; (# K1612-1)<br>CLONTECH |

Amp<sup>r</sup>: Resistencia a ampicilina.

Kan<sup>r</sup>: Resistencia a kanamicina.

Cm<sup>r</sup>: Resistencia a cloramfenicol.

*lacZ*: región N-terminal del gen de la β-galactosidasa.

Se indican aquellos vectores que contienen promotores de las RNA polimerasas de los fagos T7, SP6.

GAL4 2H-2 y GAL4 2H-3: MATCHMAKER Two-hybrid system 2 y 3, respectivamente (CLONTECH).

*TRP1* y *LEU*: marcador nutricional para selección en levadura.

GAL4 DNA-BD: dominio de unión a DNA del activador transcripcional de levadura GAL4.

GAL4 DNA-AD: dominio de activación del activador transcripcional de levadura GAL4.

P<sub>ADH1</sub>: promotor constitutivo ADH1 para la expresión de la fusión proteica.

P<sub>T7</sub>: promotor para transcripción y traducción *in vitro* de la fusión proteica; también para secuenciar

T<sub>T7 & ADH1</sub>: señal de terminación de la transcripción.

HA: epítipo tag de la hemaglutinina, para la inmunoprecipitación de las fusiones proteicas.

C-Myc: epítipo tag, para la inmunoprecipitación de las fusiones proteicas.

F1 ori: origen de replicación en bacteriófago.

pUC ori y Col E1 ori: origen de replicación en *E. coli*.

2 μ ori: origen replicación en *S. cerevisiae*.

NLS SV40 T-antigen: señal de localización nuclear del antígeno T del virus SV40.

CYH2<sup>S</sup>: confiere sensibilidad de la levadura transformada a la cicloheximida.

El plásmido pRL171, que tiene un sitio de clonaje múltiple simétrico, se utilizó para la adición de sitios de restricción en los extremos de los cDNAs (*PEAM1*, *PEAM4* y *PEAM6*) y permitir así su posterior clonación en el plásmido binario pBINJIT60.

Para los experimentos de doble híbrido se utilizaron los siguientes plásmidos:

El plásmido pGBKT7 DNA-BD se utilizó para generar fusiones de una proteína diana al dominio de unión a DNA del activador transcripcional GAL4; esta construcción híbrida se utilizó como cebo en el rastreo de una genoteca de cDNA (de ápices florales de guisante de la variedad Viktoria) clonada en el vector pACT2 DNA-AD para la identificación de proteínas que interactúan con la proteína cebo y también para testar la interacción de esta proteína diana con otra proteína ya conocida.

El plásmido pACT2 DNA-AD fue usado para generar fusiones de una proteína previamente conocida (para el ensayo de interacción proteína-proteína) o de una colección de proteínas desconocidas (genoteca), al dominio de activación del activador transcripcional GAL4.

#### **4. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS**

Las cepas de *Escherichia coli* que se emplearon en las transformaciones fueron DH5 $\alpha$ , DH10B y Top10. Para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 (C58) y LBA4404, respectivamente.

##### **4.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN**

###### **4.1.1. TRANSFORMACIÓN MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO**

Tras descongelar en hielo una alícuota de 100  $\mu$ l de células competentes preparadas en tampón RF2, con cloruro de rubidio (Sambrook *et al.*, 1989), se añadió una alícuota del vector transformante (5  $\mu$ l del vector en 20  $\mu$ l de RF2) y se incubó en hielo 30 min. Transcurrido este tiempo se calentaron a 42°C durante 90 s y se enfriaron inmediatamente en hielo durante 5 min. Después, del choque térmico se les añadió 1 ml de LB o de SOC y se incubaron 1 h y 15 min a 37°C y con agitación de 200 rpm antes de sembrarlas en cajas de medio de selección.

#### 4.1.2. TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

La preparación de células competentes para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según los protocolos descritos en el catálogo Pulse controller, Accessory for bacterial and fungal electro-transformation (BioRad), en el caso de *E. coli*, y según Wen-jun y Forde (1989) en el caso de *A. tumefaciens*. Tras descongelar en hielo una alícuota de 40  $\mu$ l de células competentes preparadas mediante sucesivos lavados de glicerol, se añadió 1  $\mu$ l del vector transformante. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0'1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser™ (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1'8 kV, para *E. coli*, y 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1'8 kV, para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico se adicionó 1 ml de LB o de SOC y se incubó 1 h y 15 min a 37°C y 200 rpm para *E. coli* y 3 h a 28°C y 200 rpm para *A. tumefaciens*.

#### 4.2. SELECCIÓN DE RECOMBINANTES BACTERIANOS

La selección de recombinantes se llevó a cabo mediante la siembra de las células bacterianas transformadas en cajas de 9 cm de diámetro con medio sólido LB suplementado con el antibiótico al cual el plásmido en uso confería resistencia; en los casos en que el vector permitía la selección por color, por contener parte de gen de la  $\beta$ -galactosidasa, se añadieron 40  $\mu$ l (25 mg/ml) de IPTG y 25  $\mu$ l (20 mg/ml) de X-Gal al medio de cultivo sólido. En la tabla 8 se muestran los antibióticos utilizados para la selección de recombinantes bacterianos y las concentraciones a las que se usaban.

**Tabla 8. Antibióticos y sus concentraciones utilizadas.**

| <b>Antibiótico</b> | <b>Concentración</b>  |
|--------------------|---|
| Ampicilina         | 60-100 $\mu$ g/ $\mu$ l para <i>E. coli</i>   |
| Kanamicina         | 25 $\mu$ g/ $\mu$ l para <i>E. coli</i><br>50 $\mu$ g/ $\mu$ l para <i>A. tumefaciens</i> |
| Tetraciclina       | 5 $\mu$ g/ $\mu$ l para <i>E. coli</i> y para <i>A. tumefaciens</i>                       |

## **5. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS**

### **5.1. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS**

Para la transformación de levaduras se ha utilizado el método del acetato de litio (AcLi) (Ito *et al.*, 1983) con las modificaciones de Hill *et al.*, (1991), Gietz *et al.*, (1992) y Schiestl y Gietz (1989),

Todas las cotransformaciones realizadas en este trabajo se han llevado a cabo de manera secuencial: primero la transformación de la levadura con GAL 4 DNA-BD/proteína X (o cebo) y, posteriormente, la transformación con GAL4 AD/proteína Y o con GAL4 AD/genoteca. Para las transformaciones se han utilizado dos protocolos distintos, a pequeña y gran escala, que se describen a continuación.

#### **5.1.1. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS A PEQUEÑA ESCALA**

El protocolo de transformación a pequeña escala se ha utilizado para:

- verificar que las proteínas de fusión DNA-BD/proteína X y GAL4 AD /proteína Y, no activan de manera autónoma los genes delatores.
- transformación con GAL4 DNA-BD/proteína X como primer paso de la transformación secuencial.
- cotransformación secuencial de los dos tipos de plásmidos híbridos GAL4 DNA-BD/proteína X y GAL4 AD/proteína Y, para testar su interacción en un ensayo de doble híbrido.

Básicamente la transformación de levadura a pequeña escala se realiza de la siguiente manera: se inoculan 10 ml de medio YPD(YPDA) ó SD/-Trp (transformación secuencial) con 200 µl de un precultivo de 4 ml del mismo medio, cultivado toda la noche a 30°C con agitación, inoculado a partir de una colonia aislada de 3 mm de diámetro. Se deja crecer el cultivo de 10 ml hasta que la DO<sub>600</sub> esté entre 0'5-0'6. Una vez alcanzada esta DO, se centrifuga la suspensión celular a 4000 rpm 15 min, se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 10 ml de H<sub>2</sub>O; se vuelven a centrifugar las células a 4000 rpm 5 min, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 5 ml de una solución 1x TE/AcLi [(10x TE: 0'1M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7'5), (10x AcLi:1 M acetato de litio)]; se centrifugan las células a 4000 rpm 5 min, se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 2'5 ml de una solución 1x TE/AcLi. Se repite el lavado anterior y se resuspende finalmente el sedimento en 500 µl 1x TE/AcLi. Para cada reacción de transformación se añaden: 100 µl de las células competentes de la levadura, 100 ng del

DNA de la construcción con la que se va a transformar, 10  $\mu$ l de DNA "portador" (Sigma-D1626 Type III Sodium from Salmon Testes, 10 mg/ml) preparado según Schiestl y Gietz (1989), 12  $\mu$ l de DMSO y 600  $\mu$ l de una solución PEG/TE/AcLi (40%/1x/1x). Se agita el tubo con la mezcla de reacción y se incuba 30 min a 30°C y 15 min a 42°C. La suspensión celular se centrifuga a 4000 rpm 5 min, y el sedimento de células se resuspende en 250  $\mu$ l de 1x TE. La selección de los recombinantes de levadura se describe en el apartado 5.2.

### **5.1.2. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS A GRAN ESCALA**

El protocolo de transformación de las levaduras con la genoteca de cDNA (a gran escala), es básicamente como el que se describe arriba, aunque presenta algunas modificaciones que se detallan a continuación. En este caso, se utiliza un precultivo de la levadura que contiene el cebo, crecido durante toda la noche en SD/-Trp a 30°C, para inocular 500 ml de medio SD/-Trp de manera que se alcance una  $DO_{600}$  inicial de 0'1, y este cultivo se incuba nuevamente hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0'4, momento en el que se somete a centrifugación. El sedimento obtenido se lava con agua dos veces consecutivas (resuspendiendo primero en 250 ml y la segunda vez en 100 ml) y 5 veces con 1x TE/AcLi, resuspendiendo finalmente las células en 2 ml de H<sub>2</sub>O que serán utilizados en 10 reacciones de transformación cada una de las cuales contiene: 200  $\mu$ l de células competentes de la levadura, 10  $\mu$ g de DNA de la genoteca, 100  $\mu$ l del DNA "portador", 32  $\mu$ l de DMSO y 1'5 ml de una solución PEG/TE/AcLi (40%/1x/1x). Las mezclas de reacción se incuban 30 min a 30°C y 15 min a 42 °C. Pasado este tiempo, todas las reacciones se mezclan en un mismo tubo y se anota el volumen final resultante ( $v_1$ , dato necesario para estimar la eficiencia de la transformación). Para determinar la eficiencia de la transformación, se utilizan 100  $\mu$ l de la mezcla de las reacciones para hacer diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  que se siembran en cajas de medio sólido SD/-Trp/-Leu, contabilizándose el número de colonias cotransformadas (cfu) que aparecen en cada una de ellas. El resto de la suspensión celular se centrifuga y el sedimento se resuspende en 15 ml de 1x TE; la suspensión celular resultante se vierte sobre un matraz que contiene 100 ml de medio líquido SD/-His/Trp/-Leu y se incuba durante 4 h a 30°C con agitación. Transcurrido ese tiempo, el cultivo se centrifuga y el sedimento se resuspende en 20 ml de SD. La selección de los recombinantes (clones positivos del rastreo de la genoteca de cDNA) se describe en los apartados 5.2. y 10.3.3.

## 5.2. SELECCIÓN DE RECOMBINANTES DE LEVADURA

Para la selección de los transformantes de levadura resultantes de la transformación a pequeña escala, se siembran 100  $\mu$ l de la suspensión de células transformadas, o cotransformadas (transformación secuencial) (apartado 5.1.1.), en cajas de 9 cm de diámetro de medio sólido SD/-Trp ó SD/-Trp-Leu, respectivamente, y se cultivan incubando las cajas en una estufa a 30°C.

Para la selección de los cotransformantes de levadura resultantes de la transformación a gran escala (transformación con la genoteca) se siembran alícuotas de 400  $\mu$ l de las células transformadas, resuspendidas en SD (apartado 5.1.2.), en cajas de 12 x 12 cm de diámetro de medio sólido de selección, como se describe en el apartado 10.3.3., y se incuban durante 6-10 días en una estufa a 30°C.

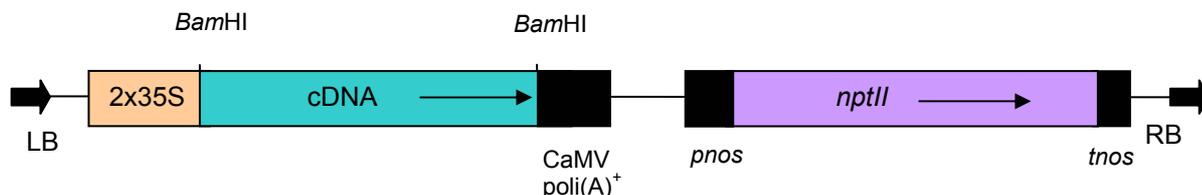
## 6. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS

### 6.1. DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES PARA LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *PEAM1*, *PEAM4* Y *PEAM6* EN *Nicotiana tabacum* Y *Arabidopsis thaliana*

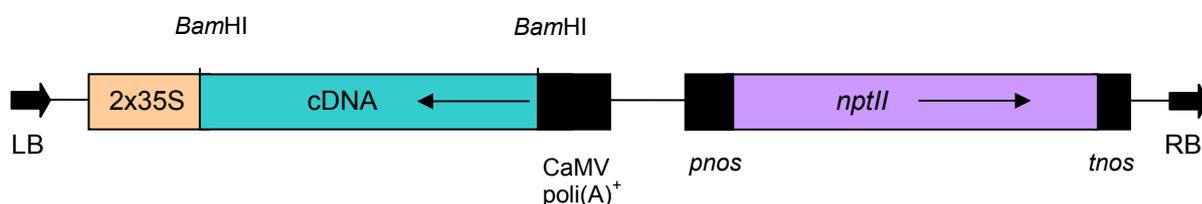
Para ensayar los efectos de la expresión constitutiva de *PEAM1*, *PEAM4* y *PEAM6* en plantas transgénicas, el cDNA de cada uno de estos genes se clonó como una fusión transcripcional al promotor 2x35S CaMV (Benfey *et al.*, 1990) en el sitio *Bam*HI del vector binario de expresión en plantas pBinJIT60 (Tabla 7). Para ello, los cDNAs completos de *PEAM1*, *PEAM4* y *PEAM6* se subclonaron en el sitio *Eco*RI del plásmido pRL171 (Tabla 7), que contiene un sitio de clonaje múltiple simétrico, en el cual la diana de restricción *Eco*RI está flanqueado por dos dianas *Bam*HI. Posteriormente, cada uno de los cDNAs fue liberado del plásmido pRL171 como un inserto *Bam*HI, para su posterior clonación en el plásmido pBINJIT60. La estructura de los T-DNAs resultantes se representa en la figura 18.

La clonación de los cDNAs en el plásmido pBINJIT no fue dirigida, ya que se clonaron como insertos *Bam*HI. La selección de los clones que contenían las construcciones con el cDNA en orientación sentido o antisentido se realizó mediante análisis de restricción de los correspondientes plásmidos o por secuenciación de los mismos utilizando el cebador 2x35S (Tabla 11) que permite "leer" la zona de unión del cDNA al promotor 2x35S.

Construcción "sentido" de los cDNAs



Construcción "antisentido" (AS) de los cDNAs



**Figura 18. Esquema de la estructura del T-DNA para los distintos cDNAs (PEAM1, PEAM4 y PEAM6) utilizados para transformar *Arabidopsis* y tabaco.** El plásmido pBINJIT60, empleado en las construcciones, contiene el promotor 35S CaMV con el enhancer duplicado (2x35S) y la secuencia de poliadenilación del CaMV, [CaMV poli(A)<sup>+</sup>] y el gen *NPTII*, que confiere resistencia a la kanamicina, con el promotor y el terminador de la nopalina sintetasa (*pnos* y *tnos*).

Una vez identificadas las construcciones sentido o antisentido de los cDNAs, se procedió a la transformación de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58 y LBA4404 con las construcciones de interés, para su utilización posterior en la transformación de *Arabidopsis* y tabaco, respectivamente.

**6.2. TRANSFORMACIÓN DE *Nicotiana tabacum***

La transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* se realizó siguiendo el método descrito por Horsh *et al.*, (1984) con las modificaciones propuestas por Fisher y Guiltinan (1995).

Un tubo de 50 ml con 5 ml de medio LB, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 µg/ml rifampicina y 50 µg/ml kanamicina se inoculó, a partir de un glicerinado, con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés (apartado 6.1.) y se incubó toda la noche en oscuridad a 28°C, con agitación de 200 rpm. Al cabo de este tiempo alícuotas de 500 µl de ese cultivo se utilizaron para inocular dos matraces de 250 ml con 50 ml de medio LB, 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 50 µg/ml kanamicina que se incubaron en las mismas condiciones hasta que

la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor comprendido entre 0'5-0'6. El cultivo resultante se recogió por centrifugación y el sedimento con las bacterias se resuspendió en la mitad de volumen de medio MSS líquido [4'4 g/l sales MS (Duchefa), 2% sacarosa, 100 mg/l MES, pH 5'9].

Secciones de hoja de *Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1 (60 explantes por construcción) de 1 cm<sup>2</sup>, provenientes de plantas jóvenes (aproximadamente 4 semanas) propagadas en medio sólido MSS a partir de entrenudos, se sumergieron en la suspensión de *Agrobacterium*, dispuesta en una caja Petri de 9 cm de diámetro, durante 10 min. A continuación, los discos foliares se sacaron de la suspensión de *Agrobacterium*, se escurrieron y se colocaron con el envés hacia arriba sobre medio sólido MSS (3'5 g/l phytigel) y se cocultivaron durante tres días a 25°C en oscuridad para facilitar la infección por *Agrobacterium*. Tras el cocultivo los discos foliares infectados se transfirieron a cajas con medio de regeneración y selección MSSABCK [medio MSS con 0'2 mg/l IAA, 2'2 mg/l 6-BAP, 400 mg/l carbenicilina (para inhibir el crecimiento del *Agrobacterium*) y 130 mg/l kanamicina (para seleccionar el crecimiento de las las células que hubieran incorporado el T-DNA)].

Las placas con los explantes se incubaron en cabinas de cultivo *in vitro* a 25°C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (ver apartado 1.1.1.4.), y cada 7-10 días se cambiaron a nuevas cajas con el mismo medio. Los brotes regenerados (uno de cada explante, para asegurar que se seleccionaban sucesos de transformación independientes) que iban apareciendo se cortaban evitando el callo y se transferían a frascos de 6 cm de diámetro x 9'5 cm de altura con medio de enraizamiento MSSACK (medio MSS sólido con 0'2 mg/l IAA, 200 mg/l carbenicilina y 130 mg/l kanamicina). De cada brote enraizado, se aislaban dos entrenudos, cada uno con una hoja, que se transferían a frascos de medio MSSACK, a partir de los cuales se regeneraban dos plantas completas. Una de ellas se utilizaba para mantener una réplica en cultivo *in vitro*, mientras que la otra, una vez enraizada, se transfería a tierra. Para ello, los brotes enraizados se extrajeron de los frascos, se les eliminó los restos de medio de las raíces, se transplantaron a macetas de 13 cm de diámetro con una mezcla de turba:vermiculita (1:1) y se trasladaron al invernadero, donde se cultivaron bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.3.

### 6.3. TRANSFORMACIÓN DE *Arabidopsis thaliana*

Para la construcción de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se han utilizado, plantas silvestres de los ecotipos *Columbia* (Col) y *Landsberg erecta* (Ler) y plantas del alelo mutante *ap1-1* (ecotipo Ler). La transformación se realizó siguiendo el protocolo de infiltración por vacío descrito por Bechtold *et al.*, (1993).

Aproximadamente unas 60 semillas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 11 cm de diámetro, tal y como se describe en el apartado 1.1.1.1. Transcurridas unas 2 semanas desde la siembra, se eliminaron algunas plantas con el fin de facilitar el crecimiento homogéneo y adecuado de la población. Una vez las plantas habían producido el escape floral, cuando la última hoja caulinar se había separado unos 2-3 cm del ápice de la inflorescencia principal (altura de las plantas de 9-11 cm) éste se decapitó para eliminar la dominancia apical e inducir así la proliferación de las inflorescencias laterales. El tiempo aproximado que transcurría desde que la siembra hasta que se decapitaban las plantas era de aproximadamente un mes para el ecotipo Ler y de un mes y 5-6 días para Col. Una vez decapitadas, las plantas se cultivaron unos 4 días más antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración (día -3) un tubo de 50 ml con 10 ml de medio LB, con 100 µg/ml rifampicina y 50 µg/ml kanamicina, se inoculó a partir de un glicerinado, con la cepa C58 pMP90 de *A. tumefaciens*, portadora de la construcción de interés (apartado 6.1.), y se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28°C, con agitación de 200 rpm. Al cabo de este tiempo (día -2), un matraz de 1 l con 600 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml), se inoculó con los 10 ml del precultivo anterior y se incubó en las mismas condiciones durante 48 h. El día de la infiltración (día 0) el cultivo se recogió por centrifugación y el sedimento con las bacterias se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2'2 g/l sales MS (Duchefa), 5% sacarosa, 1 mg/l BAP, 100 mg/l MES, pH 5'9). Antes de la infiltración, a las plantas se les quitaron todas las silicuas fertilizadas así como las flores abiertas. Para la infiltración a vacío, las macetas se invertían y se introducían en una fiambrrera que contenía los 200 ml de la suspensión de *Agrobacterium* en medio de infiltración, de manera que no sólo los ápices florales sino también las hojas de roseta quedaban sumergidos en el líquido. El montaje se colocaba en una campana de vacío conectada a una bomba de vacío (Bomba EDWARDS RV3, 110-120/220-240V, 50-60 Hz, monofásica A652-01-903) y se sometía a vacío durante 30 min en posición de alto vacío y caudal bajo "posición I" (presión total final:  $3 \times 10^{-2}$  mbar, 3 Pa). El tiempo se empezaba a contar cuando la suspensión de *Agrobacterium* empezaba a burbujear. Pasados los 30 min se sacaban las plantas de la campana y se secaban ligeramente, escurriéndolas sobre un trozo de papel absorbente. Las plantas así tratadas se cubrían con bolsas de plástico y se devolvían a las cabinas de cultivo donde se les permitía que continuaran creciendo bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.1. Durante los 2-3 días siguientes a la infiltración se iban haciendo agujeros en las bolsas, con el fin de aclimatar las plantas a las condiciones de humedad habituales, hasta que éstas se eliminaban definitivamente. Las plantas se cultivaron hasta obtener semillas maduras.

Alternativamente a la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el método de Bechtold *et al.*, (1993), en algunas ocasiones se utilizó una versión modificada de este método que se basa en la utilización del detergente Silwet L.77 (LEHLE SEEDS; Clough y Bent, 1998). En el momento de la infiltración, las plantas se mantenían sumergidas durante 8 s en la suspensión de *Agrobacterium* en medio de infiltración a la que se le había adicionado dicho detergente hasta una concentración final de 0'05%; inmediatamente después, se les sometió a un pulso de vacío de 1 min utilizando las mismas condiciones que en el procedimiento anterior. El tratamiento de las plantas antes y después de la infiltración, así como la preparación de los cultivos de *Agrobacterium* fueron iguales que como se ha descrito con detalle para el procedimiento anterior.

Cuando las silicuas de las plantas transformadas estuvieron maduras se recogieron las semillas, se guardaron en bolsas de celofán y se incubaron en una estufa a 37°C durante al menos una semana. Para la selección de los transformantes primarios (T<sub>1</sub>), las semillas procedentes de plantas individuales T<sub>1</sub> se esterilizaron, se sembraron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro con medio de selección con kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro* (ver apartado 1.1.1.2.). Después de 7-10 días desde la siembra los transformantes eran claramente identificables por su color verde y sus raíces desarrolladas; en ese momento se transplantaron a alveolos (6'5 X 6'5 x 5 cm) con una mezcla turba:vermiculita:perlita (1:1:1) y se trasladaron a un fitotrón para su cultivo bajo las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.1.

#### 6.4. ANÁLISIS FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS

Las plantas de ambas especies se observaron y se fotografiaron con una cámara Nikon F-601 M, acoplada a una lupa MZ8 (Leica) para las fotos de detalle; algunos ápices inflorescentes de *Arabidopsis*, así como secciones de distintos órganos de la planta de tabaco (sépalos, pétalos, estambres, carpelos, brácteas y hojas vegetativas) fueron fijados y observados mediante microscopía electrónica de barrido según se indica en el apartado 2.

Para estimar el número de *loci* en que se había integrado el T-DNA en las distintas líneas transgénicas primarias de *Arabidopsis* y tabaco, 40 semillas procedentes de plantas individuales T<sub>1</sub> se sembraron tras su esterilización en cajas de medio con kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro* tal y como se describe en el apartado 1.1.1.2. y 1.1.1.4. El recuento de plántulas verdes, resistentes al antibiótico, y de plántulas albinas se realizó a los 7-10 días después de la siembra para *Arabidopsis* y a los 30 días para tabaco. Las plantas homocigotas y hemizigotas en cada una de las poblaciones T<sub>2</sub> fueron

identificadas mediante el análisis de las correspondientes progenies T<sub>3</sub> por el mismo método.

Para el análisis de los datos de segregación de la resistencia a kanamicina en la progenie de las distintas líneas transgénicas, las hipótesis nulas (H<sub>0</sub>) planteadas fueron dos: que los datos eran compatibles con una segregación 3:1 (resistentes:sensibles) lo que corresponde a la inserción del T-DNA en un único *locus*, o bien compatibles con una segregación 15:1, que corresponde a la inserción del T-DNA en dos *loci*. En ambos casos la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) fue que no se cumpliera la hipótesis H<sub>0</sub>; las categorías son: plántulas resistentes y sensibles a kanamicina.

Se utilizó el estadístico muestral  $\chi^2$ , que se construye utilizando la siguiente expresión analítica:

$$\chi^2_{\text{muestral}} = \sum_{i=1}^K \frac{[(O_i - E_i) - 0.5]^2}{E_i}$$

donde K = nº de categorías; O<sub>i</sub> = frecuencia observada de la categoría i; E<sub>i</sub> = frecuencia esperada de la categoría i. Este estadístico se distribuye bajo la hipótesis nula como una  $\chi^2$  con K-1 grados de libertad.

Para contrastar el cumplimiento de la H<sub>0</sub> existen dos alternativas:

1. Comparar el valor del estadístico muestral  $\chi^2$  con el valor del  $\chi^2$  de las tablas para K-1 grados de libertad y un nivel de significación  $\alpha$  (probabilidad de rechazo) del 0'05 (5%). Si el valor del estadístico muestral  $\chi^2$  es superior al valor de las tablas ( $\chi^2_{K-1}$ ) se rechaza la hipótesis nula. En este caso concreto K-1 = 1 y el valor del  $\chi^2$  de las tablas es 3'84.
2. Comparando el nivel de significación  $\alpha$  (probabilidad de rechazo) del 0'05 con la probabilidad muestral (P-valor). Si  $\alpha$  es mayor que el P-valor se rechaza la hipótesis nula.

El test de  $\chi^2$  también se utilizó para analizar los resultados de los ensayos de complementación de las mutaciones *pi-1*, *ap3-1* y *ap3-3* con el gen *PEAM1*; la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) planteada en todos los casos fue que los datos son compatibles con la complementación de dichas mutaciones por *PEAM1*. En estos ensayos el procedimiento es similar al seguido para el test de segregación; en este caso para  $\alpha=0'05$  y tres grados de libertad, el valor del  $\chi^2$  de las tablas es 7'81.

El parámetro habitualmente utilizado para estudiar el tiempo de floración en *Arabidopsis* y tabaco fue el número total de hojas producido por el tallo principal. En *Arabidopsis*, como número de hojas totales se consideró la suma de las hojas de roseta, excluyendo los

cotiledones, y de la inflorescencia principal (hojas caulinares). El número de hojas de roseta se determinó periódicamente; las hojas contadas cada día se marcaron con un rotulador permanente. En tabaco, para el cálculo del número de hojas totales se consideró la suma de todas las hojas vegetativas, excluyendo los cotiledones, y de las brácteas que forman parte de la estructura apical del tallo principal.

También, en ocasiones, se utilizó como parámetro para medir el tiempo de floración en *Arabidopsis*, el número de días que tardó en elongar 0'5 cm el tallo de la inflorescencia principal, contabilizados desde la fecha de siembra en tierra; en tabaco se contabilizó el número de días transcurridos desde la siembra en placas de medio de selección con kanamicina hasta que fue visible el primer botón floral. En todas las plantas estudiadas en este trabajo, ambos parámetros mostraron una correlación directa. En *Arabidopsis* los conteos de número de hojas se realizaron sobre plantas cultivadas a partir de semillas sembradas directamente en maceta, mientras que los conteos en tabaco se realizaron sobre plantas seleccionadas en medio con kanamicina y transplantadas a maceta (apartado 1.1.1.).

Los niveles de expresión del transgén entre las distintas líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana tabacum*, se determinaron por análisis Northern sobre muestras de RNA total (10–12  $\mu\text{g}$ ) extraído de hojas vegetativas jóvenes (apartado 7.2.). Para *Arabidopsis*, se recolectaron hojas de un conjunto de 120 plántulas jóvenes de una población T<sub>2</sub> segregante, tras 23 días después de su puesta en cultivo (semilla), bajo condiciones de día corto, para las líneas 35S::*PEAM4* y 35S::*PEAM6*, o de día largo, en el caso de las líneas 35S::*PEAM1*. Para tabaco, el material para los análisis Northern se recolectó de un conjunto de 80 plántulas jóvenes de una población T<sub>2</sub> de cada línea transgénica primaria (T<sub>1</sub>), tras 25 días después de su puesta en cultivo (semilla), en cajas de Petri que contenían medio MSS sin kanamicina en cabinas de cultivo *in vitro*, según las condiciones descritas en el apartado 1.1.1.4.

También se han llevado a cabo en tabaco análisis Northern sobre muestras de RNA total (15  $\mu\text{g}$ ) extraído de órganos florales (verticilos 1-4). Se emplearon flores de aproximadamente 2'5 cm de tamaño, que se encontraban en un estadio de desarrollo previo a la antesis, cuando en los pétalos aún no se aprecia la pigmentación rojiza característica. También se ha realizado análisis Northern sobre muestras de RNA total extraído de ápices vegetativos de plantas de tabaco de 1 mes de edad, de ápices florales y de flores jóvenes (4 mm de largo), así como sobre RNA total extraído de hojas adultas correspondientes a plantas ya florecidas cultivadas en macetas en el invernadero.

## **7. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **7.1. AISLAMIENTO DNA PLASMÍDICO**

#### **7.1.1. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE *Escherichia coli***

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina tal como lo describen Sambrook *et al.*, (1989), partiendo de un cultivo de 3 ml crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con el correspondiente antibiótico. Las preparaciones de DNA plasmídico a media o gran escala, se realizaron a partir de cultivos, crecidos durante una noche en 100 ml o 500 ml de medio líquido LB suplementado con antibiótico, según el procedimiento de extracción y purificación de DNA plasmídico de los sistemas de Qiagen Plasmid Midi Kit (columnas Qiagen tip-100) y Qiagen Plasmid Maxi Kit (columnas Qiagen tip-500), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación de DNA plasmídico de la suspensión bacteriana resultante de la amplificación de la genoteca de cDNA de expresión en levadura, clonada en el dominio de activación del plásmido pACT2, se utilizó el Giga Plasmid Purification Kit (QIAGEN) con columnas Qiagen tip-2500.

#### **7.1.2. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE *Agrobacterium tumefaciens***

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *Agrobacterium* se utilizó el método de la lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989) con ligeras modificaciones. Se partía de un cultivo de 3 ml, crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con 50 µg/µl kanamicina. El sedimento de células resultante de centrifugar el cultivo se resuspendió en 100 µl de solución I y se trató tal como se describe en Sambrook *et al.*, (1989). Al sobrenadante resultante de la centrifugación a que se somete el lisado obtenido tras añadir la solución III se le añadió 900 µl de etanol absoluto y se incubó 30 min a – 80°C. Tras centrifugar a 12000 rpm 5 min a temperatura ambiente, el precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 25 µl de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8).

La pureza de la preparación de DNA obtenida por este procedimiento no era suficientemente alta 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.

### 7.1.3. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE LEVADURA

El procedimiento rápido de aislamiento de DNA plasmídico de levadura está basado en el método descrito por Hoffman y Winston (1987) y por Kaiser y Auer (1993).

Se ha usado este método, para el aislamiento de los plásmidos que contienen el dominio de activación a partir de las colonias que resultaron positivas en el rastreo de la genoteca de cDNA de expresión en levaduras en ensayo de doble híbrido. Para ello, 5 ml de medio SD/-Trp/-Leu se inoculaban con una colonia de levadura y este cultivo se incubaba durante una noche a 30°C y con agitación de 200 rpm. El uso de este medio para permite mantener la presión selectiva sobre los clones positivos, ya que si se cultivan sin la selección del Trp, los clones positivos AD/plásmido de la genoteca pueden perderse si la fusión proteica que se expresa presenta cierta toxicidad para la célula hospedadora de levadura. Tras centrifugar 3 ml del cultivo en un tubo de 1'5 ml, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con las células en el líquido residual. Se añadió 400 µl de la solución de lisis de levadura (2% tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8'0, 1 mM EDTA), 400 µl de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y 300 mg de bolas de vidrio (425-600 µm) lavadas con ácido y se agitó en el vortex durante 2 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y 200 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo nuevo donde el DNA se precipitó añadiendo 20 µl de 3 M NaOAc pH 5'2 y 0'5 µl de etanol 100%. Luego, se incubó 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm 30 min; tras lavar el precipitado con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O.

A menudo, el DNA plasmídico aislado de la levadura por este procedimiento está contaminado por DNA genómico y por ello no es adecuado para análisis por restricción o para secuenciación. Para estas aplicaciones, lo que se hizo fue utilizar 2 µl del DNA aislado de la levadura para transformar células de *E. coli* de donde posteriormente se realizaba una preparación del plásmido que sí era adecuada para ese tipo de manipulaciones. Como el DNA aislado de cada colonia positiva de levadura es una mezcla del plásmido DNA-BD/cebo y al menos un tipo de plásmido AD/genoteca, la selección de los transformantes que contienen el plásmido con los clones de la genoteca fusionada al dominio de activación, se llevó a cabo en placas de LB con ampicilina 100 mg/l que es la selección para *E. coli* que aporta dicho vector. El DNA plasmídico aislado de la levadura si que es, sin embargo, adecuado para ser usado en análisis por PCR.

## **7.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL**

Para las extracciones de RNA total para análisis Northern se siguió el protocolo descrito por Longemann *et al.*, (1987), a partir de 1 g de tejido. El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría (Sambrook *et al.*, 1989) y se utilizó inmediatamente o se almacenó a -80°C.

Para la obtención del RNA total utilizado para la construcción de la genoteca de cDNA de ápices florales de guisante se utilizó el kit de preparación de RNA de plantas QIAGEN-tip 500 (QIAGEN) según el protocolo indicado por los fabricantes, partiendo de 600 mg de tejido. El procedimiento consiste básicamente en la extracción con una solución tamponada que contiene una elevada concentración de tiocianato de guanidinio, para asegurar la inactivación rápida de RNAsas endógenas. Este protocolo está diseñado para la obtención de unos 500-1000 µg por cada QIAGEN-tip 500.

## **7.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE mRNA**

El RNA poli(A)<sup>+</sup> que se utilizó en las reacciones de RT-PCR descritas en el apartado 8.2. se aisló directamente a partir de 100 mg de tejido de sépalos y pétalos de tabaco mediante el sistema QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech), según el protocolo indicado por los fabricantes. Básicamente, el procedimiento consiste en una extracción con una solución tamponada que contiene una elevada concentración de tiocianato de guanidinio, para asegurar la inactivación rápida de RNAsas endógenas. La fracción de RNA poli(A)<sup>+</sup> se purifica mediante una cromatografía de afinidad con oligo(dT)-celulosa (2'5 mg/ml). Posteriormente se realizan varios lavados, primero con un tampón con alta concentración de sales (10 mM Tris-HCl pH 7'5, 1 mM EDTA, 0'5 mM NaCl) y después con uno con baja concentración de sales (10 mM Tris-HCl pH 7'5, 1 mM EDTA, 0'1 mM NaCl), y, finalmente, el RNA poli(A)<sup>+</sup> se libera de la columna con un tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 7'5, 1 mM EDTA). En cada purificación se obtuvieron 2– 2'5 µg de mRNA.

El RNA poli(A)<sup>+</sup> que se utilizó para la construcción de la genoteca de cDNA para el sistema del doble híbrido, se aisló a partir de RNA total extraído de ápices florales de guisante (apartado 10.2.2.), mediante el sistema DYNABEADS<sup>R</sup> mRNA Purification Kit (DYNAL), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los Dynabeads están cubiertos con oligo(dT), lo que permite la captura del mRNA. Durante los lavados con tampones salinos

se usa un concentrador magnético de partículas (DynaL MPC<sup>R</sup> E, MPC<sup>R</sup> -1) y la elución se consigue aplicando un tampón libre de sales a 65°C.

## **8. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **8.1. REACCIONES ENZIMÁTICAS**

#### **8.1.1. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Para cada enzima de restricción se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por las distintas casas comerciales. Las digestiones se llevaron a cabo en tubos de 1'5 ml con 5-10 u/μg DNA, durante al menos 3 h a la temperatura óptima para cada enzima.

#### **8.1.2. TRATAMIENTO CON ENZIMAS MODIFICADORES**

##### **8.1.2.1. Defosforilación de extremos cohesivos (5' protuberantes)**

Las reacciones de defosforilación se realizaron con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, Boehringer Mannheim). Las reacciones se llevaron a cabo mezclando 5 μg de vector plasmídico linearizado, 10 μl de tampón 10x (0'5 M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8'5), CIP 0'5 u/μg DNA y H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 100 μl. La mezcla se incubó 30 min a 37°C, añadiendo nuevamente 0'5 u/μg DNA CIP tras ese tiempo e incubando de nuevo 30 min a 37°C. La reacción se paró con 2 μl de 0'5 M EDTA por cada 100 μl de volumen total de reacción, calentando 20 min a 70°C. La solución se extrajo 2 veces con fenol/cloroformo, se precipitó con 1/10 v 3 M NaOAc pH 5'2, 2'5 v EtOH absoluto y 1 μl de glicógeno (Boehringer Mannheim) y el precipitado de DNA se resuspendió en un volumen adecuado (unos 15 μl) procediendo a su cuantificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

##### **8.1.2.2. Fosforilación de extremos cohesivos**

Esta reacción se utilizó para la fosforilación de los adaptadores EcoRI empleados en la construcción de una genoteca de cDNA de guisante para el sistema del doble híbrido (10.2.2.). Se llevó a cabo en un volumen de 50 μl con una mezcla de reacción que contenía: 30 μl de dccDNA en TE (1'5 μg), 5 μl tampón de Kinasa 10x (Promega), 2'5 μl 20

mM ATP, 3  $\mu$ l 0'1 M DTT y 2  $\mu$ l de T4 polinucleótido kinasa PNK (10 u/ $\mu$ l); la reacción se incubó 30 min a 37°C.

### **8.1.2.3. Reacciones de ligación**

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una proporción molar entre inserto y vector de aproximadamente 3:1, en el caso de plásmidos de pequeño tamaño, y de 5:1 en el caso de los vectores de gran tamaño utilizados para la transformación de plantas. La reacción de ligación contenía 50-175 ng de vector (cortado, purificado y defosforilado en el caso de extremos cohesivos), la cantidad de inserto (cortado y purificado) necesaria para obtener las proporciones molares mencionadas, el tampón de ligación (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, DTT, 1 mM ATP, 66 mM Tris-HCl pH 7'5) y 1 unidad de DNA ligasa del fago T4 (Roche Molecular Biochemicals), en un volumen total de 10  $\mu$ l. Las reacciones de ligación se realizaron a 16 °C durante 16 h.

## **8.2. AISLAMIENTO DE cDNAS POR RETROTRANSCRIPCIÓN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR**

Se utilizó la técnica de retrotranscripción de mRNAs seguida de PCR (RT-PCR), con el objeto de aislar fragmentos de los cDNA correspondientes a los genes *NAP1-1* (AF009126) y *NAP1-2* (AF009127) de tabaco, para utilizarlos como sonda en análisis Northern.

### **8.2.1. SÍNTESIS DE cDNA POR RETROTRANSCRIPCIÓN DE mRNA**

Las reacciones de retrotranscripción para RT-PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo 2  $\mu$ g de mRNA poli(A)<sup>+</sup>, aislado de sépalos y pétalos de tabaco para *NAP1-1* y *NAP1-2*, según se describe en el apartado 7.3., 100 ng de un cebador antisentido específico de cada gen (*NAP1-1REV* y *NAP1-2REV*; Tabla 11), 1 mM dN<sub>4</sub>TPs y 25 unidades de RT-AMV (Boehringer), en el tampón de reacción suministrado por el fabricante (50 mM Tris-HCl pH 8'5, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl y 1 mM DTT). Previamente a la reacción, la mezcla del mRNA y el oligonucleótido se calentaron 2 min a 95°C y se dejaron enfriar lentamente hasta llegar a 42°C; a continuación se añadió el resto de los componentes y la reacción se incubó durante 1 h a 42°C.

### **8.2.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA**

Para clonar los fragmentos de cDNA deseados se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR); en general, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l, a partir de 2  $\mu$ l de la reacción de retrotranscripción. La mezcla de reacción de PCR contenía 1  $\mu$ M de los cebadores específicos para fragmento a amplificar, 200  $\mu$ M dN<sub>4</sub>TPs, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8.3 y 2.5 unidades de la polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq* polimerasa, Roche Molecular Biochemicals). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400 en las siguientes condiciones: una incubación inicial a 94 °C 2 min; 30 ciclos de 94 °C 30 s; T °C 30 s; 72 °C T<sub>ext</sub> min, y una incubación final a 72 °C durante 10 min. En cada reacción la temperatura de anillamiento (T) se estimó en función de la T<sub>m</sub> (temperatura de fusión estimada) de los cebadores empleados. El tiempo de extensión utilizado, T<sub>ext</sub>, dependía de la longitud del fragmento a amplificar; en general se utilizó 1 min por cada kb de producto esperado.

En algunos casos en que era necesaria una elevada fiabilidad en la síntesis de los productos amplificados por PCR, la amplificación se llevó a cabo con una polimerasa con prueba de lectura, que le permite corregir errores en la incorporación de nucleótidos (*Pfu* Turbo, Stratagene). Tanto en estos casos como cuando se empleó la *Taq* polimerasa, para cada fragmento se secuenciaron los productos procedentes de dos reacciones de PCR independientes, comprobándose que no se habían introducido mutaciones

Para su subclonación, los productos de las reacciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos de interés se extrajeron y purificaron del gel según el método descrito en el apartado 8.3.

### **8.3. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA**

Tras separar las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, las bandas de interés se cortaron del gel con una cuchilla y el DNA contenido en las mismas se purificó mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción y purificación de los fragmentos de DNA por este método se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en una membrana de silicagel, en presencia de una elevada concentración de sal. La elución del DNA se llevó a cabo en 10 mM Tris-HCl pH 8.

## **8.4. ANÁLISIS NORTHERN**

### **8.4.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE FORMALDEHIDO-AGAROSA**

Para la separación del RNA (habitualmente, muestras de 10-15  $\mu$ g) se utilizaron geles del 1% de agarosa en tampón 1x MOPS (1 mM EDTA, 5 mM acetato sódico y 20 mM MOPS pH 7.0), con 6.7 % de formaldehído como agente desestabilizador de estructuras secundarias. Se añadió 1 v de tampón de carga 5 x [0.16% azul de bromofenol saturado (v/v), 4 mM EDTA, 885 mM formaldehído, 20% glicerol (v/v), 30.84% formamida (v/v), 40% tampón 10x MOPS, 0.1  $\mu$ g de bromuro de etidio ] por cada 2.5 v de RNA. Las muestras se cargaron en el gel tras calentarlas a 65°C durante 5 min y enfriarlas otros 5 min en hielo. La electroforesis se desarrolló a 80 V y el gel se fotografió antes de transferir el RNA a la membrana.

### **8.4.2. TRANSFERENCIA DE RNA A MEMBRANA**

El mRNA se transfirió del gel a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridad, utilizando tampón 20x SSC, según el procedimiento estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El mRNA transferido se fijó a la membrana mediante irradiación ultravioleta utilizando un UV-Stratalinker 800 (Stratagene).

### **8.4.3. FRAGMENTOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE SONDAS**

Para los análisis Northern se utilizó la porción 3' de los distintos genes MADS-box, correspondiente al fragmento C-terminal de los polipéptidos, para evitar hibridaciones cruzadas con la secuencia de la caja MADS de los genes endógenos (Tabla 9).

### **8.4.4. MARCAJE DE SONDAS**

Las sondas radiactivas de DNA se sintetizaron mediante el sistema "Ready to go DNA Labelling Veda (-dCTP)" (Amersham Pharmacia Biotech), basado en el método de los cebadores al azar (Feinberg y Volgelstein, 1983), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizaron 50 ng de DNA molde y 50  $\mu$ Ci de  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech). La reacción de marcaje se incubó un mínimo de 30 min a 37°C.

Posteriormente, las sondas marcadas se purificaron para eliminar los nucleótidos no incorporados, usando columnas de cromatografía de exclusión molecular Sephadex G50 (Roche Molecular Biochemicals) según el procedimiento indicado por el fabricante.

**Tabla 9. Sondas utilizadas en los análisis Northern.**

| Gen           | Fragmento             | Plásmido              | Digestión            |
|---------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>PEAM1</i>  | 355-928 del clon 182  | pUC18                 | <i>SphI/EcoRI</i>    |
| <i>PEAM4</i>  | 507-1287 del clon 126 | pGEM-3Zf (-)          | <i>XbaI</i>          |
| <i>PEAM6</i>  | 448-102 del clon 102  | pbluescript II KS (+) | <i>XhoI/EcoRI</i>    |
| <i>NTGLO</i>  | 457-736               | pbluescript II KS (+) | -                    |
| <i>NTDEF</i>  | 68-335                | pBluescript II KS (+) | <i>EcoRV</i>         |
| <i>NAP1-1</i> | 403-1002              | pGEMT-T Easy          | <i>EcoRI</i>         |
| <i>NAP1-2</i> | 196-729               | pGEMT-T Easy          | <i>HindIII/EcoRI</i> |
| <i>NFL</i>    | 700 pb                | pAM2233               | <i>EcoRI</i>         |

Las secuencias de los clones de cDNA correspondientes a *PEAM1*, *PEAM4* y *PEAM6* se muestra en Ferrándiz (1996). Se indica el plásmido en el que está clonado cada fragmento y las enzimas utilizadas para liberarlos. En todos los casos se ha eliminado la secuencia correspondiente al dominio MADS, para evitar hibridación cruzada con otros miembros de esta familia. Los cDNA de *NAP1-1* y *NAP1-2* se obtuvieron por RT-PCR, como se describe en el apartado 8.2., a partir del RNA poli(A)<sup>+</sup> extraído de sépalos y pétalos de tabaco, usando los cebadores específicos NAP1-1FOR/NAP1-1REV y NAP1-2DIR/NAP1-2REV diseñados a partir de las secuencias con número de acceso AF009126 y AF009127, respectivamente (Submisión GenBank por Y.H. Wu, Q., Li, J.S. Zhang y Y. Li). El cDNA de *NFL* fue proporcionado por R. Elliot y E. Coen, John Innes Institute. Los cDNA de *NTDEF* (nº acceso X96428) y de *NTGLO* (nº de acceso X67959) fueron proporcionados por H. Sommer y B. Davies, Max-Planck Institut. El fragmento de 279 pb del extremo 3' del cDNA de *NTGLO* se amplificó mediante PCR con los cebadores específicos NTGLODIR y NTGLOREV.

#### 8.4.5. HIBRIDACIÓN Y LAVADOS

La metodología utilizada fue la hibridación en tampón PSE (fosfato-SDS-EDTA) descrita por Church y Gilbert (1984). En todos los casos, las hibridaciones se han llevado a cabo con sondas homólogas. Inicialmente, las membranas se lavaron a 65°C durante 15 min con 2x SSC y después se pusieron a prehibridar a 65°C durante 30 min en solución de prehibridación PSE [0'5 M fosfato sódico pH 7'2, 1% (p/v) SDS, 1 mM EDTA]. Posteriormente, la hibridación se llevó a cabo a 65°C durante 14-18 h en esta misma solución conteniendo la sonda de DNA marcada y previamente desnaturalizada durante 5 min a 100°C. Tras la hibridación, los filtros se lavaron dos o tres veces durante 15 min con 2x SSC y 0'1% SDS (p/v) y una vez durante 15 min en 0'1x SSC, 0'1% SDS (p/v); todos los lavados se realizaron a 65°C, controlando la radioactividad remanente en la membrana con un contador Geiger. Después de lavadas, las membranas

se dejaban secar y se colocaban sobre papel Whatman 3MM, fijándolas con cinta adhesiva. Finalmente, los filtros se envolvieron en una lámina de plástico transparente. Las membranas que se utilizaron más de una vez, se lavaron antes de la segunda hibridación con 0'1% SDS (p/v) a 100°C durante 10 min, comprobando que no quedaban restos de la sonda previa mediante una exposición del filtro durante una noche sobre placas de análisis de imágenes BAS-IP, MP 20405(Fuji).

#### **8.4.6. DETECCIÓN DE LA SEÑAL**

La exposición de las membranas hibridadas se llevó a cabo sobre películas HyperfilmMP (Amersham Pharmacia Biotech) a -80 °C en "cassettes" con pantallas intensificadoras 3M Trimax T16. Las autorradiografías se revelaron en una procesadora automática M-35-X-OMAT (Kodak). En algunas ocasiones el revelado se realizó manualmente con revelador AGFA Rodinal en proporción 1:24 (revelador: agua) y fijador AGFA Agefix en proporción 1:4 (fijador: agua).

En ocasiones, se empleó el sistema de detección Fujifilm Bas de fosfoimágenes por su mayor sensibilidad. Las membranas se pusieron en contacto con placas de análisis de imágenes BAS-IP, MP 20405 (20 x 40 cm) durante 4-16 h. Las placas se leyeron en un analizador de bioimágenes "Bio-imaging analyzer" Fujifilm BAS1500 (Fuji) y la lectura fue procesada con el programa MAcBAS v2.2 (Fuji).

### **9. SECUENCIACIÓN**

La secuenciación de fragmentos de DNA clonados se llevó a cabo según el protocolo de secuenciación enzimática desarrollado por Sanger *et al.*, (1977) de modo automático en un secuenciador "ABI PRISM 377" (Perkin Elmer). Para ello, el DNA extraído según el protocolo de aislamiento y purificación de DNA plasmídico del sistema QIAGEN-tip100 descrito en el apartado 7.1.1. se llevó a una concentración de 0'2 µg/µl, y se amplificó con Ampli Taq DNA polimerasa en presencia de ddNTPs, cada uno de ellos marcado con un fluoróforo diferente (Perkin Elmer).

Se utilizaron tanto cebadores propios de los vectores plasmídicos como cebadores internos de los fragmentos de DNA objeto de estudio (Tabla 11).

#### **9.1. ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el paquete de programas GCG (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Devereux *et al.*, 1984). La búsqueda de homologías se realizó en las bases de datos Genbank, Swissprot y EMBL, mediante los programas: BLASTA y FASTA. Las comparaciones de secuencias se realizaron con los programas GAP y BESTFIT .

## 10. SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO

### 10.1. VERIFICACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS CEPAS DE LEVADURA

#### 10.1.1. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Para verificar los requerimientos nutricionales de las diferentes cepas empleadas se sembraba una triple estría de cada una de ellas en medio rico YPD (YPDA) y se cultivaban durante 3-5 días a 30°C. A continuación, las distintas cepas se sembraban, a partir de colonias aisladas, en cajas de Petri con distintos tipos de medio mínimo de selección (SD) a cada uno de los cuales le faltaba un determinado nutriente (Tabla 10).

**Tabla 10. Crecimiento de las distintas cepas de levadura en medios sintéticos de diferente composición.**

| Cepa   | SD/-Ade | SD/-Trp | SD/-Leu | SD/-His | YPD(A) |
|--------|---------|---------|---------|---------|--------|
| AH109  | -       | -       | -       | -       | +      |
| Y190   | -       | -       | -       | -       | +      |
| Hf7c   | -       | -       | -       | -       | +      |
| SFY526 | -       | -       | -       | -       | +      |

#### 10.1.2. Verificación del fenotipo *ade2*

Las cepas Y190, Hf7c y SFY526 portan la mutación *ade2-101*. En un medio con baja cantidad de adenina, las colonias se vuelven rosas a los pocos días y se van oscureciendo con la edad. Estas colonias crecen hasta alcanzar un tamaño de >2 mm de diámetro. El pigmento rojo es aparentemente un oxidado, derivado polimerizado del 5-aminoimidazol ribótido que se acumula en las vacuolas (Smirnov *et al.*, 1967; Weisman *et al.*, 1987). Las colonias blancas y pequeñas de <1mm se forman debido a mutaciones espontáneas y se debe de evitar cogerlas. En ausencia de GAL4, AH109 también exhibe el fenotipo *ade2-101*;

sin embargo, en la presencia de interacciones proteicas que activan a los genes delatores, el marcador *ADE2* complementa en cis el fenotipo *ade2-101* de AH109.

## **10.2. DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES PARA EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO**

### **10.2.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS GENES DE FUSIÓN PARA TESTAR LA INTERACCIÓN ENTRE DOS PROTEÍNAS MADS DE GUISANTE PREVIAMENTE CONOCIDAS**

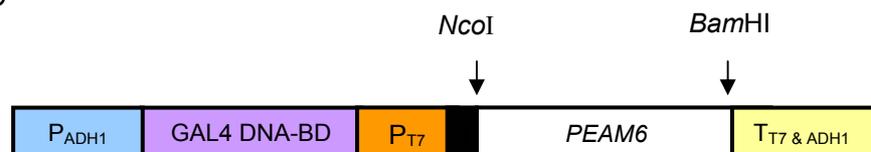
Se generaron construcciones con genes de fusión a partir de los cDNAs de los genes MADS de guisante *PEAM4* y *PEAM6*. *PEAM6* fue fusionado al dominio de unión al DNA (DNA-BD) del activador transcripcional GAL4, en el vector binario para expresión en levadura pGBKT7 (apartado 3), y *PEAM4* fue fusionado al dominio de activación (AD) de GAL4, en el vector binario para expresión en levadura pACT2 (apartado 3). El vector pGBKT7 confiere resistencia a kanamicina a *E. coli* y porta el gen *TRP1* como marcador nutricional para la selección en levadura. El vector pACT2 confiere resistencia a ampicilina a *E. coli* y porta el gen *LEU2* como marcador nutricional para la selección en levadura. Para subclonar en estos vectores los cDNA de *PEAM4* y *PEAM6*, se generó, para cada cDNA, mediante PCR, un fragmento con sitios de restricción que permitió subclonarlos de tal modo que se mantuviera la fase de lectura y se expresasen correctamente, en cada caso, las proteínas híbridas. Para la generación del fragmento de *PEAM6* se emplearon los cebadores PEAM6DIR y PEAM6REV (Tabla 11), que incorporan los sitios *NcoI* y *BamHI*, y para la generación del fragmento de *PEAM4* los cebadores PEAM4DIR y PEAM4REV, que incorporan los sitios *SmaI* y *BamHI* (Tabla 11). La orientación y pauta de lectura correcta en las uniones vector-inserto se verificaron por secuenciación. En ambos casos el fragmento amplificado y subclonado en los vectores abarcaba la secuencia codificante completa de cada cDNA. La figura 19 muestra una representación de los genes de fusión generados.

### **10.2.2. CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE cDNA DE GUISANTE EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS**

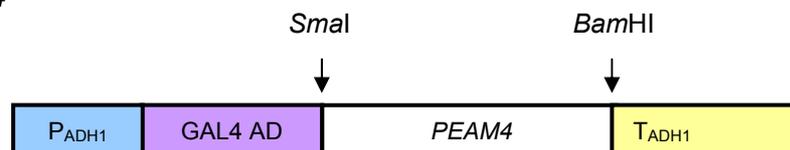
Se construyó una genoteca de cDNA de guisante en el plásmido pACT2, un vector binario de expresión en levadura que se utiliza en el sistema de doble híbrido. Los cDNAs clonados en ese vector generan proteínas híbridas constituidas por una fusión del dominio de

activación del activador transcripcional GAL4 y el polipéptido codificado por el cDNA (Figura 20).

## BD-PEAM6

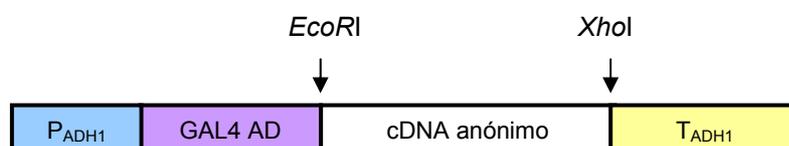


## AD-PEAM4



**Figura 19. Esquema de las construcciones híbridas de dos genes de fusión, para testar su interacción en un ensayo del doble híbrido.** GAL4 DNA-BD: dominio de unión a DNA del activador transcripcional de levadura GAL4. GAL4 AD: dominio de activación del activador transcripcional de levadura GAL4. P<sub>ADH1</sub>: promotor constitutivo ADH1 para la expresión de la fusión proteica. P<sub>T7</sub>: promotor para transcripción y traducción *in vitro* de la fusión proteica; también para secuenciar. T<sub>T7 & ADH1</sub>: señal de terminación de la transcripción.

El material de partida para la síntesis del cDNA para la genoteca fueron ápices florales de guisante de la variedad Viktoria que contenían flores en estadios comprendidos entre -8 a -2 días antes de la antesis. Se procedió primero a la extracción de RNA total de estos ápices, mediante el uso del kit de QIAGEN-tip 500 (QIAGEN) (apartado 7.2.), partiendo de dos muestras de 600 mg de tejido. Se obtuvieron 3'7 mg de RNA total a partir del cual se procedió al aislamiento del RNA poli(A)<sup>+</sup> utilizando el sistema DYNABEADS<sup>R</sup> mRNA Purification Kit (DYNAL) (apartado 7.3.); del RNA poli(A)<sup>+</sup> obtenido se utilizaron 5 µg para la síntesis de la genoteca de cDNA.



**Figura 20. Esquema de los genes de fusión que constituyen la genoteca de expresión cDNA de guisante para ensayos de doble híbrido.**

La síntesis de la primera cadena de cDNA (sccDNA) se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu$ l, en una mezcla de reacción que contenía: 5  $\mu$ g de RNA poli(A)<sup>+</sup>, 20  $\mu$ l de tampón de primera cadena 5x (Gibco), 0'5 mM d(A,G,T)TPs, 0'5 mM 5-Methyl dCTPs, 5  $\mu$ l del oligo pXhodT18V (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 10  $\mu$ Ci de  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP, 1  $\mu$ l de RNasin (40 u/ $\mu$ l, Roche), 10  $\mu$ l de 0'1 M DTT (Gibco) y 2  $\mu$ l de MMLV-RT (40 u/ $\mu$ l, Gibco); la reacción se incubó 45 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo 5  $\mu$ l de 0'5 M EDTA pH 8 y extrayendo con fenol/cloroformo. El cDNA se precipitó añadiendo 20  $\mu$ l de 3M NaOAc pH 6 y 200  $\mu$ l de isopropanol y centrifugando a 17000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente; el sedimento se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE pH 7. El rendimiento de la reacción se estimó cuantificando la radioactividad incorporada en un contador de centelleo (400000 cpm~1'3  $\mu$ g x 2'5  $\mu$ l = 3  $\mu$ g); el rendimiento fue de un 60% de conversión de RNA poli(A)<sup>+</sup> a sccDNA.

La síntesis de la segunda cadena se llevó a cabo en un volumen de reacción de 200  $\mu$ l, en una mezcla de reacción que contenía: 100  $\mu$ l del sccDNA del paso anterior resuspendido en TE, 40  $\mu$ l de tampón de segunda cadena 5x (Boehringer), 3  $\mu$ l de 20 mM dNTPs, 2  $\mu$ l de 15 mM NAD, 2  $\mu$ l de 0'1 M DTT, 10  $\mu$ l DNA polimerasa I (5 u/ $\mu$ l, Boehringer), 2  $\mu$ l de DNA ligasa de *E. coli* (2 u/ $\mu$ l) y 2  $\mu$ l de RNasa H (1 u/ $\mu$ l, Boehringer); la reacción se incubó durante 1 h a 12°C y durante 1 h adicional a 22°C. La reacción se paró añadiendo 5  $\mu$ l de 0'5 M EDTA pH 8 y extrayendo con fenol/cloroformo. El cDNA se precipitó añadiendo 20  $\mu$ l de 3M NaOAc pH 6 y 200  $\mu$ l de isopropanol y centrifugando a 17000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente; el sedimento se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50  $\mu$ l de TE pH 7. El rendimiento de la reacción, que se estimó cuantificando la radioactividad incorporada en un contador de centelleo, fue de 5'4  $\mu$ g de dccDNA a partir de 3  $\mu$ g de sccDNA.

La reacción de reparación del cDNA para conseguir extremos romos se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu$ l con una mezcla de reacción que contenía: 50  $\mu$ l de dccDNA en TE (5'4  $\mu$ g), 5  $\mu$ l de 1M Tris-HCl pH 8'3, 6  $\mu$ l de 0'1 M MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ l de 1 M NaCl, 10  $\mu$ l de 0'1 M DTT, 1  $\mu$ l de 10 mM dNTPs y 5  $\mu$ l DNA polimerasa T4 (1 u/ $\mu$ l); la reacción se incubó 15 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo la reacción se suplementó con 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 600  $\mu$ l

del tampón N<sub>2</sub> de equilibrado de la columna, y el cDNA se purificó utilizando una columna del Kit Nucleobond Ax (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. El dccDNS eluido de la columna se precipitó con isopropanol y se resuspendió en 30 µl de TE.

La reacción para la adición de adaptadores EcoRI se llevó a cabo en un volumen de 50 µl con una mezcla de reacción que contenía: 30 µl de dccDNA reparado en TE, 5 µl de tampón de T4 DNA ligasa 10x (Promega), 10 µl de adaptador RI (0'01 u/µl, Pharmacia), 3 µl T4 Ligasa (3 u/µl); la reacción se incubó toda la noche a 10°C. La reacción se paró añadiendo 2'5 µl de 0'5 M EDTA pH 8 y extrayendo con fenol/cloroformo. El cDNA se precipitó añadiendo 20 µl de 3M NaOAc pH 6 y 200 µl de isopropanol y centrifugando a 17000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente; el sedimento se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de TE pH 7.

La reacción de fosforilación de los adaptadores EcoRI se llevó a cabo en un volumen de 50 µl y la mezcla de reacción se describe con detalle en el apartado 8.1.2.2; la reacción se incubó 30 min a 37°C.

Posteriormente se llevó a cabo la digestión con *Xho*I del oligo pXhodT18V en un volumen final de reacción de 100 µl con una mezcla de reacción que contenía 50 µl de la reacción anterior, 5 µl de tampón H 10x (Boehringer) y 4 µl de *Xho*I (40 u/µl); la reacción se incubó 2 h a 37°C. La reacción se paró añadiendo 3 µl de 0'5 M EDTA pH 8 y extrayendo con fenol/cloroformo. El cDNA se precipitó añadiendo 20 µl de 3M NaOAc pH 6 y 200 µl de isopropanol y centrifugando a 17000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente; el sedimento se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 100 µl del tampón TEN (tampón de equilibrado de la columna de fraccionamiento por tamaño del cDNA).

El fraccionamiento por tamaño de los cDNAs, para eliminar los oligonucleótidos y fragmentos de tamaño inferior a 200 pb, se llevó a cabo en columnas de Sephacell (Gibco BRL); tras el equilibrado de la columna con 5 lavados con el tampón TEN (0'1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) se aplicaron los 100 µl de reacción del paso anterior. Se recolectaron un total de 15 fracciones que se cuantificaron en un contador de centelleo. La fracción 5-7 tenía el pico de radiactividad y fue la que se utilizó para la construcción de la genoteca.

El cDNA se utilizó para la ligación con el vector pACT2, previamente cortado con *Eco*RI-*Xho*I, en una mezcla de reacción, con un volumen final de 30 µl, que contenía: 160 ng pACT2 *Eco*RI-*Xho*I, 400 ng de las fracciones 5-7 del cDNA, 3 µl de tampón T4 DNA ligasa 10x (Promega) y 1 µl de ligasa T4 (3 u/µl). La reacción se incubó toda la noche a 16°C. La reacción se paró añadiendo 1 µl de EDTA 0'5 M pH 8 y se precipitó con 5 µl de 3M NaOAc

pH 6 y 50  $\mu$ l de isopropanol en un volumen total de 100  $\mu$ l. Tras la precipitación, se centrifugó a 17000 rpm 30 min a 21°C, se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió en 20  $\mu$ l TE.

La genoteca de cDNA resultante se amplificó transformando con ella células competentes de *E. coli* DH10B (ElectroMAX DH10B™ Life technologies, tabla 4) por electroporación. Se obtuvo un total de  $3 \times 10^6$  colonias independientes que se sembraron en 7 cajas de Petri de 24'5 x 24'5 cm (Screeningsplate Bio-Assay Dish, NUNCTM Brand Products Nalge Nunc International) con medio LB-agar con 60  $\mu$ g/ $\mu$ l ampicilina. Las células de estas colonias se recogieron de las placas por la adición de medio LB líquido y se procedió a la extracción y purificación del DNA plasmídico que contenían, utilizando el Giga Plasmid Purification Kit (QIAGEN) con columnas Qiagen tip-2500; se obtuvo un rendimiento final de 3500  $\mu$ g de genoteca de cDNA.

### **10.2.3. CONSTRUCCIÓN DEL CEBO**

Como cebo para el rastreo de la genoteca se empleó la construcción del cDNA de *PEAM6* subclonado en el vector pGBKT7 (BD-*PEAM6*, apartado 9.2.1.). Antes de proceder al rastreo de la genoteca con esta construcción se transformó con ella a las distintas cepas de levadura que se iban a emplear, para comprobar que la construcción BD-*PEAM6* no era capaz de activar, por sí sola, la transcripción de los genes delatores de estas levaduras.

También se generó una construcción con el cDNA completo de *PEAM4* en el vector pGBKT7 (BD-*PEAM4*, apartado 10.2.1.). Sin embargo esta construcción activaba a los genes delatores y por ello no se pudo emplear para el rastreo de la genoteca.

### **10.3. ENSAYO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS MEDIANTE EL ENSAYO DEL DOBLE HÍBRIDO**

Para testar la interacción entre la proteína diana (cebo) BD-*PEAM6* con la proteína AD-*PEAM4* o con las proteínas híbridas de la genoteca, las cepas de levadura se transformaron de manera secuencial primero con la construcción BD-*PEAM6* y, posteriormente, con la construcción AD-*PEAM4* o con DNA de la genoteca (apartado 5.1.).

Las células cotransformadas se seleccionaron sembrando en un medio SD/-Trp/-Leu para seleccionar las que contenían ambos tipos de construcciones híbridas. A continuación los cotransformantes se testaron para la activación de los distintos genes delatores.

Antes de proceder al ensayo de interacción entre *PEAM6* y *PEAM4*, las distintas cepas de levadura se transformaron con la construcción BD-*PEAM4*, para comprobar que dicha

construcción no era capaz, por sí sola, de activar la transcripción de los genes delatores de estas levaduras.

### **10.3.1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES DELATORES**

#### **10.3.1.1. Ensayo de la expresión del gen *HIS3***

El gen delator *HIS3* presenta un nivel basal de expresión no inducible por GAL4 que varía en las distintas cepas de levadura utilizadas en este trabajo y que da lugar a un fondo de crecimiento en un medio sin histidina. Para eliminar la actividad enzimática resultante de esta expresión basal se suplementaba el medio de cultivo con diferentes concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), un compuesto que es un inhibidor competitivo de la actividad de la proteína de levadura *HIS3* (His3p) (Durfee *et al.*, 1993; Fields, 1993).

Para establecer la concentración óptima de 3-AT en cada caso, se transformó cada cepa de levadura con las construcciones híbridas BD-cebo o AD-presa y se determinó la concentración del inhibidor 3-AT necesaria para controlar el fondo de crecimiento en un medio sin histidina. Para ello, las células transformadas con la construcción BD-cebo o AD-presa se sembraron en cajas de medio SD/-His/-Trp o SD/-His/-Leu, respectivamente, conteniendo 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 mM de 3-AT, y se evaluó el efecto de las construcciones en el crecimiento de la cepa. Se escogió la concentración más baja que sólo permitía el crecimiento de colonias de un tamaño inferior a 1 mm.

#### **10.3.1.2. Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa sobre colonias extendidas en filtro**

Para los ensayos de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, tanto en filtro como en líquido, es importante que las colonias estén creciendo en un medio mínimo SD para mantener la presión de selección sobre los plásmidos híbridos.

El ensayo en filtro (Breedon y Nasmyth, 1985) de la actividad  $\beta$ -galactosidasa ha sido usado para:

- Verificar que las construcciones híbridas no activan por sí solas el gen delator *lacZ* (células transformadas independientemente con las construcciones de fusión BD-cebo y AD-presa).
- Para testar la interacción entre dos proteínas conocidas, usando el sistema del doble híbrido (colonias cotransformadas con BD-*PEAM6* y AD-*PEAM4*).

- Para verificar la expresión del gen delator *lacZ* en los cotransformantes His<sup>+</sup>, Leu<sup>+</sup>, Trp<sup>+</sup>, ( Ade<sup>+</sup>), rescatados del rastreo de la genoteca de cDNA de expresión en levadura.

Este ensayo se ha llevado a cabo con todas las cepas usadas en este trabajo: Y190, Hf7c, AH109 y SF526 (descritas en el apartado 1.2.2.).

Para el ensayo en filtro de la  $\beta$ -galactosidasa, las colonias que iban a ser testadas se extendían a modo de pequeños parches sobre la superficie de un filtro de nitrocelulosa (Scheiler and Schuell Protran BA 85, 0'45  $\mu$ m, 82 mm diámetro) que se había colocado previamente en contacto directo sobre medio selectivo sólido SD y se dejaban crecer 2 días a 30°C. Para cada caja de transformantes que iba a ser testada se preparaba una caja de Petri de 9 cm de diámetro a la que se le añadían 1'5 ml de una solución de tampón Z/X-gal [1'5 ml tampón Z (16'1 g/l Na<sub>2</sub> HP0<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5'5 g/l NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 0'75 g/l KCl, 0'246 g/l MgSO<sub>4</sub> g/l); 25  $\mu$ l de 20 mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) y 4  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol] y sobre ella se colocaban dos filtros de 90 mm de diámetro Scheiler & Schuell 595 S & S Rundfilter.

El filtro de nitrocelulosa que contiene las colonias que iban a ser testadas, se quitaba de la superficie de la placa de medio SD y se sumergía 30 s en nitrógeno líquido, para lisar las células. Una vez el filtro se había congelado completamente, se sacaba del nitrógeno líquido, se situaba sobre los filtros humedecidos con la solución tampón Z/X-gal y se incubaba 37°C chequeando periódicamente la aparición de colonias azules. El tiempo de incubación necesario para que de las colonias que expresan el gen se vuelvan azules varía desde 30 min a varias horas; incubaciones más largas favorecen los falsos positivos.

#### **10.3.1.3. Ensayo en líquido de la actividad $\beta$ -galactosidasa usando como sustrato el ONPG**

Se ha llevado a cabo para verificar y cuantificar la interacción de las proteínas PEAM4 y PEAM6 en el sistema del doble híbrido en la cepa AH109. Debido a su naturaleza cuantitativa, los ensayos en líquido pueden ser usados para comparar la fuerza relativa de las interacciones proteína-proteína, el resultado para una misma pareja de proteínas no es comparable entre dos cepas de levadura diferentes. Para reducir la variabilidad del ensayo se ensayaron tres colonias cotransformantes independientes.

El ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa usando ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido) no es muy sensible de manera que las interacciones débiles no pueden ser detectadas; sin embargo el ensayo es muy reproducible. Para el ensayo en líquido se preparaba un cultivo, inoculando 4 ml de medio selectivo SD/-Trp-Leu con una colonia de

levadura (2-3 mm), y se incubaba toda la noche a 30°C y con agitación de 250 rpm. Los cultivos deben de alcanzar una  $DO_{600}$  de 0'5-0'8; antes de medir la DO, los cultivos se agitaban para dispersar los grumos. Después se centrifugaban 1'5 ml de cada cultivo a 12000 rpm durante 30 s. Se eliminaba todo el sobrenadante, el sedimento se lavaba con tampón Z (sin  $\beta$ -mercaptoetanol, apartado 10.3.1.2.) y se resuspendía en 300  $\mu$ l del mismo tampón, concentrando las células 5 veces. La suspensión celular se repartía en alícuotas de 100  $\mu$ l, en tres tubos nuevos, y se preparaba un cuarto tubo con 100  $\mu$ l de tampón Z (sin  $\beta$ -mercaptoetanol) que se utilizaba como blanco. Los tubos se introducían en  $N_2$  líquido durante 1 min, para lisar las células, y posteriormente las muestras se descongelaban en un termobloque a 37°C durante 1 min. Los tubos se suplementaban con 700  $\mu$ l de tampón Z (conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol, 2'7  $\mu$ l/ml de tampón Z) y con 160  $\mu$ l ONPG disuelto en tampón Z (4 mg/ml) y se incubaban en un termobloque a 30°C. Una vez que el color de la mezcla de la reacción había virado a amarillo, las reacciones se paraban por la adición de 400  $\mu$ l 1M  $Na_2CO_3$ . Los tubos con la reacción se centrifugaban a 12000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se pasaba a un tubo nuevo y se le medía la  $DO_{420}$ ; la DO debe estar entre 0'02-1 para que esté dentro del rango lineal del ensayo.

Para calcular las unidades de  $\beta$ -galactosidasa, donde 1 unidad de  $\beta$ -galactosidasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de ONPG a o-nitrofenol y D-galactosa por min (Miller, 1972) se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = 1000 \times DO_{420} / (t \times V \times DO_{600})$$

donde:  $t$  = Tiempo en min de la incubación  
 $V$  = 0'1 ml x el factor de concentración (5)  
 $DO_{600} = A_{600}$  de 1 ml de cultivo.

#### 10.3.1.4. Ensayo de la activación del gen *ADE2*

La cepa AH109 porta, además de los genes *HIS3* y *LacZ*, a *ADE2* como tercer gen delator. La activación de la transcripción de este gen se ensayó evaluando el crecimiento de los transformantes en medios sin adenina.

#### 10.3.2. ENSAYO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PEAM4 Y PEAM6

Las distintas cepas de levadura se transformaron de manera secuencial con las construcciones BD-*PEAM6* y AD-*PEAM4* utilizando el método de transformación a pequeña escala tal y como se describe en el apartado 5.1.1.

Las células cotransformadas se seleccionaron sembrando la transformación en un medio SD/-Trp/-Leu para seleccionar las colonias que contenían ambas construcciones híbridas. A continuación se testó la expresión de los distintos genes delatores en los cotransformantes. Se ensayó la expresión de los genes *HIS3* y *ADE2* (cuando la interacción se ensayó en la cepa AH109) sembrando las colonias cotransformantes en cajas de medio sólido SD/-His/-Trp/-Leu con 3-AT (en la concentración necesaria para cada cepa, apartado 10.3.1.1.) y SD/-His/-Trp/-Leu/-Ade, respectivamente, y la expresión del gen *lacZ* mediante el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en filtro de nitrocelulosa y en líquido (apartados 10.3.1.2. y 10.3.1.3.).

### **10.3.3. RASTREO DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN EN LEVADURAS DE cDNA DE GUISANTE MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO**

Las distintas cepas de levadura se transformaron de manera secuencial, primero con la construcción BD-cebo (BD-*PEAM6*) utilizando el método de transformación a pequeña escala, y posteriormente, con la construcción AD-genoteca (100-120  $\mu$ g de genoteca de cDNA) utilizando el método de transformación a gran escala, ambos descritos en el apartado 5.1.

En este trabajo el rastreo de la genoteca en las distintas cepas se ha realizado siempre en condiciones de media astringencia, para evitar la pérdida de interacciones débiles. Para ello, el ensayo de expresión del gen *HIS3* se realizó mediante la siembra de la transformación en cajas de medio selectivo SD/-His/-Trp/-Leu conteniendo la cantidad mínima del inhibidor 3-AT necesaria para controlar, en cada cepa, el fondo de crecimiento en un medio sin histidina (apartado 10.3.1.1.). Se utilizaron 50 cajas (12 x 12 cm) por cada rastreo, en cada una de las cuales se sembraron 400  $\mu$ l de la suspensión de células transformadas; las cajas se incubaron en una estufa a 30°C.

Al cabo de seis a ocho días, las colonias capaces de crecer bajo esas condiciones fueron rescatadas y resembradas en cajas de medio selectivo SD/-His/-Trp/-Leu, aunque en este caso sin 3-AT, como una primera criba para eliminar falsos positivos (se siguió rescatando colonias hasta pasados diez días desde que se sembró la transformación). Para la cepa AH109 la réplica se hizo también en un medio SD/-His/-Trp/-Leu/-Ade para testar la expresión del gen delator *ADE2*. Las cajas de la segunda siembra se incubaron a 30°C durante 3 días y entonces se testó la expresión del gen *lacZ* en las colonias que habían

crecido, sometiéndolas al ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en filtro, tal y como se describe en el apartado 10.3.1.2. El crecimiento de las colonias en medio selectivo y el color azul en el test de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se considera como una indicación de la interacción entre las proteínas híbridas codificadas por el BD-cebo y el clon procedente de la genoteca.

La eficiencia de la cotransformación se calculó mediante la siguiente fórmula

$$\frac{\text{cfu} \times v1}{v2 \times \text{factor de dilución} \times \mu\text{g genoteca}} = \text{cfu}/\mu\text{g DNA}$$

cfu: colonias (colony forming units) crecidas en la placa de dilución que tiene entre 30-300 cfu

v1: volumen total de la suspensión celular ( $\mu\text{l}$ ) (ver apartado 5.1.2.)

v2: volumen de la suspensión celular sembrado en la caja ( $\mu\text{l}$ ) (ver apartado 5.1.2.)

$\mu\text{g}$  genoteca: cantidad total de DNA de la genoteca utilizada en la transformación

El número de clones rastreados se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{cfu}/\mu\text{g} \times \mu\text{g genoteca} = \text{n}^\circ \text{ de clones rastreados}$$

El rescate de los plásmidos de la genoteca, desde las colonias positivas, se llevó a cabo aislando el DNA plasmídico de la correspondiente levadura y usando esa preparación de DNA para transformar de *E. coli*.

**Tabla 11. Cebadores empleados en las amplificaciones por PCR y reacciones de secuenciación llevadas a cabo en este trabajo.**

| Cebador   | Secuencia (5'→ 3')                        | DNA molde          | Posición   |
|-----------|---|--------------------|------------|
| NAP1-1FOR | GGTATGAAAGGTA <del>CT</del> CATATGCTG     | cDNA <i>NAP1-1</i> | 403 → 426  |
| NAP1-1REV | CTTCCTAATCCGTAGAAAGACAAAAC                | cDNA <i>NAP1-1</i> | 1002 → 979 |
| NAP1-2DIR | TGGAATATGCTAAACTCAAGG                     | cDNA <i>NAP1-2</i> | 363 → 382  |
| NAP1-2REV | TCCTTTAAATGTAAGGAGTGG                     | cDNA <i>NAP1-2</i> | 1015 → 996 |
| PEAM6DIR  | <b>CTGAGTGCC</b> ATGGGAAGAGGAAGAGTTGAG    | cDNA <i>PEAM6</i>  | 61 → 81    |
| PEAM6REV  | <b>CGCGGATCC</b> AAGCATCCATCCAGGAACAAATCC | cDNA <i>PEAM6</i>  | 807 → 774  |
| PEAM4DIR  | <b>TCCCCGGGC</b> ATGGGAAGAGGTAGGGTTTCAG   | cDNA <i>PEAM4</i>  | 193 → 213  |

|          |  |                   |             |
|----------|--|-------------------|-------------|
| PEAM4REV | <b>CGCGGATCC</b> AAAGCATCCAAGGTGGCAGGT | cDNA <i>PEAM4</i> | 912 → 892   |
| pACT-21  | GTTTTTCAGTATCTACGATTC                  | pACT2             | 4958 → 4978 |
| pACT-22  | CAAACCCAAAAAAGAGATC                    | pACT2             | 5097 → 5078 |

**Tabla 11 (continuación). Cebadores empleados en las amplificaciones por PCR y reacciones de secuenciación llevadas a cabo en este trabajo.**

| Cebador   | Secuencia (5' → 3')            | DNA molde                  | Posición    |
|-----------|--------------------------------|----------------------------|-------------|
| 5AD       | TGGTTGGACGGACCAAAGT            | pACT2                      | 5210 → 5191 |
| 3AD       | GATGCACAGTTGAAGTGAAGTTC        | pACT2                      | 4931 → 4954 |
| pGBT9-1   | GAATAAGTGCACATCATCATCGG        | pAS2-1                     | 5877 → 5900 |
| 2x35S     | TATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCC       | pBINJIT60                  |             |
| pXhodT18V | AGAGATCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTV | mRNA ápices<br>de guisante |             |
| NTGLODIR  | GAGGAGCAAGACCAACTTAA           | cDNA <i>NTGLO</i>          | 457 → 477   |
| NTGLOREV  | CACTTAAACCATAAGCTAAGG          | cDNA <i>NTGLO</i>          | 736 → 716   |

La posición de los cebadores de los cDNA de *PEAM4* y *PEAM6* hacen referencia a las secuencias indicadas en Ferrándiz (1996). En *PEAM6DIR* y en *PEAM4DIR* se señala en negrita el codón de inicio de la traducción de los genes *PEAM4* y *PEAM6*. Las secuencias subrayadas en los cebadores *PEAM6DIR*, *PEAM6REV*, *PEAM4DIR* y *PEAM4REV* corresponden a las dianas de restricción introducidas para subclonar los cDNA de *PEAM6* y *PEAM4* en los plásmidos pGBKT7 y pACT2, respectivamente (apartado 10.2.1.); en rojo y cursiva se señalan los nucleótidos que no forman parte del DNA molde. La posición de los cebadores de los cDNA de *NAP1-1*, *NAP1-2* y *NTGLO* hacen referencia a las secuencias con nº de acceso AF009126, AF009127 y X67959, respectivamente. V, base V-Wobbles, que puede ser C, G o A.

## ***RESULTADOS***



## 1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM1* MEDIANTE SU EXPRESIÓN CONSTITUTIVA EN SISTEMAS TRANSGÉNICOS HETERÓLOGOS

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización molecular de varios genes de la familia MADS-box de guisante *PEAM1-PEAM8* (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001) con el fin de identificar genes implicados en el desarrollo floral de guisante,

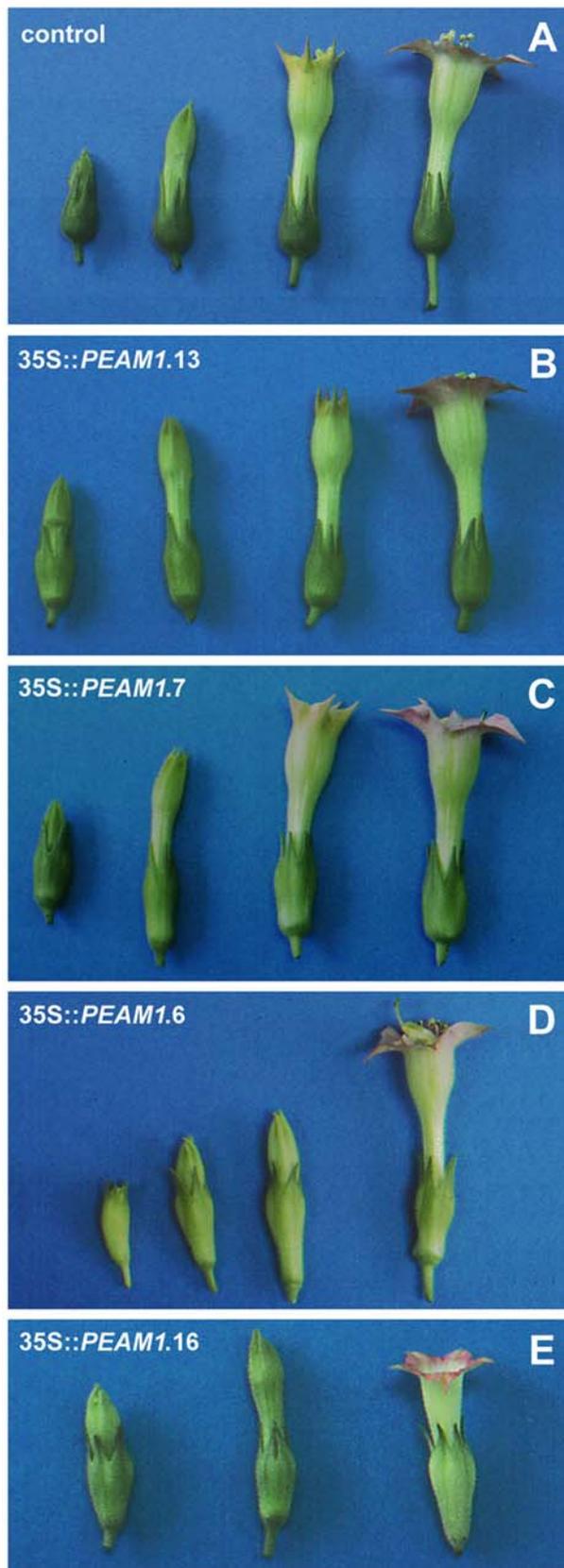
Estudios previos a este trabajo (Ferrándiz, 1996) mostraron que *PEAM1* (*Pea MADS 1*) es un gen de la familia MADS de guisante que presenta un alto nivel de homología de secuencia con genes de identidad de órgano floral de clase B del grupo GLO (Theißen *et al.*, 2000) como *PISTILLATA* (*PI*) y *GLOBOSA* (*GLO*), de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente. El estudio de expresión de *PEAM1* (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001) mostró que su mensajero se localiza fundamentalmente en la flor, comenzando a detectarse en el estadio 3 de su desarrollo, en el grupo de células que darán lugar a los primordios comunes, de los que se diferencian posteriormente los primordios de pétalos y estambres. En flores maduras, su expresión queda restringida a pétalos y a estambres. También se ha detectado la expresión de *PEAM1* en yemas vegetativas jóvenes, aunque en estos órganos la expresión es mucho más débil que en flores.

Los datos de homología de secuencia y patrón de expresión sugieren, por tanto, una posible relación funcional entre *PEAM1* y los genes de identidad de órgano floral de clase B. Para testar esta hipótesis, en este trabajo hemos usado la expresión constitutiva en sistemas transgénicos heterólogos (tabaco y *Arabidopsis*) como herramienta para el estudio de la función de *PEAM1*.

Para ello, un cDNA de 928 pb que contiene toda la región codificante se clonó como una fusión transcripcional al promotor 2x35S CaMV (Benfey *et al.*, 1990) en el vector binario de expresión en plantas pBinJIT60.

### 1.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM1* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Nicotiana tabacum*

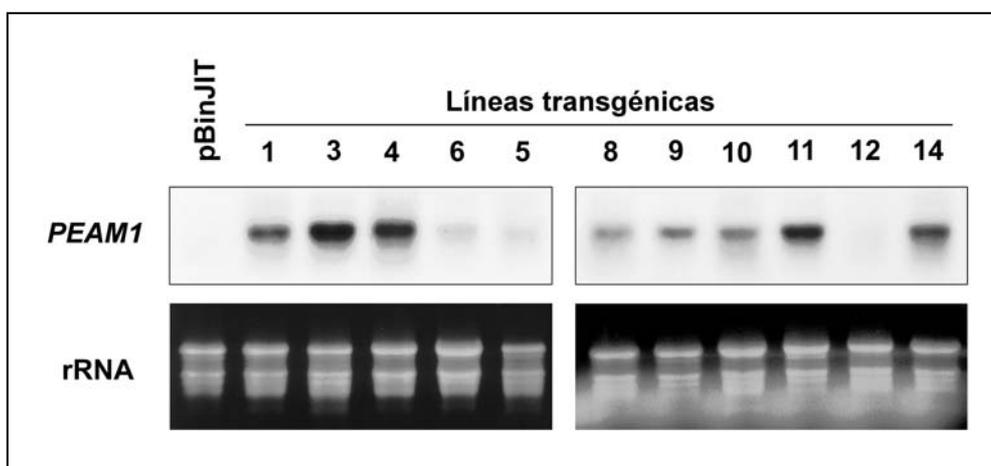
Como resultado de la transformación de plantas de tabaco con la construcción 35S::*PEAM1*, se obtuvieron 19 plantas transgénicas independientes capaces de crecer en un medio de selección con kanamicina; 17 de éstas mostraban las mismas alteraciones fenotípicas en las flores, aunque con distintos grados de intensidad (Figura 21), mientras que las flores de dos de ellas no mostraban modificaciones con respecto a las de las plantas control.



**Figura 21. Fenotipo floral de las plantas transgénicas 35S::PEAM1 de *Nicotiana tabacum*. (A)** Flores control en distintos estadios de desarrollo. **(B-E)** Flores en distintos estadios de desarrollo de diferentes plantas 35S::PEAM1 ordenadas según el grado de severidad de su fenotipo.

Las alteraciones fenotípicas de las plantas transgénicas 35S::*PEAM1* afectan al primer y cuarto verticilo de las flores. Existe, como se muestra más adelante, un claro paralelismo entre la severidad de las alteraciones que se producen en el primer verticilo y las que se producen en el cuarto. No obstante, en general, las transformaciones que se producen en el cuarto verticilo son más severas que las que se producen en el primero.

El nivel de expresión del transgén *PEAM1* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de este análisis se muestra en la figura 22.



**Figura 22. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM1* en plantas de *Nicotiana tabacum* control y transformadas con la construcción 35S::*PEAM1*.** Línea control (pBinJIT) transformada con el vector sin inserto; líneas transgénicas 35S::*PEAM1* (T-1 a T-14). En cada uno de los pocillos se cargó 12 µg de RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *SphI*–*EcoRI* de (573 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM1*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico.

El análisis Northern mostró que el gen *PEAM1* se expresaba de manera variable en todas las líneas transgénicas 35S::*PEAM1* que presentaban alteraciones fenotípicas. Se observó que niveles bajos de expresión del transgén son suficientes para dar lugar a alteraciones fenotípicas acentuadas, tal y como ocurre en las líneas transgénicas T-6 y T-8. La línea donde no se detectó expresión del transgén (T-12) no mostraba alteraciones fenotípicas. Un resumen donde se relaciona el nivel de expresión del transgén y la severidad del fenotipo, en las distintas líneas transgénicas analizadas, se muestra en la tabla 12.

### 1.1.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE TABACO 35S::*PEAM1*

Las plantas 35S::*PEAM1* sólo muestran modificaciones que afectan al desarrollo de las flores. Los órganos vegetativos y la arquitectura de la inflorescencia de estas plantas es perfectamente normal y son idénticas a las plantas control en lo que respecta al tiempo de

**Tabla 12. Nivel de expresión del transgén y severidad de fenotipo de las plantas transgénicas de tabaco 35S::*PEAM1*.**

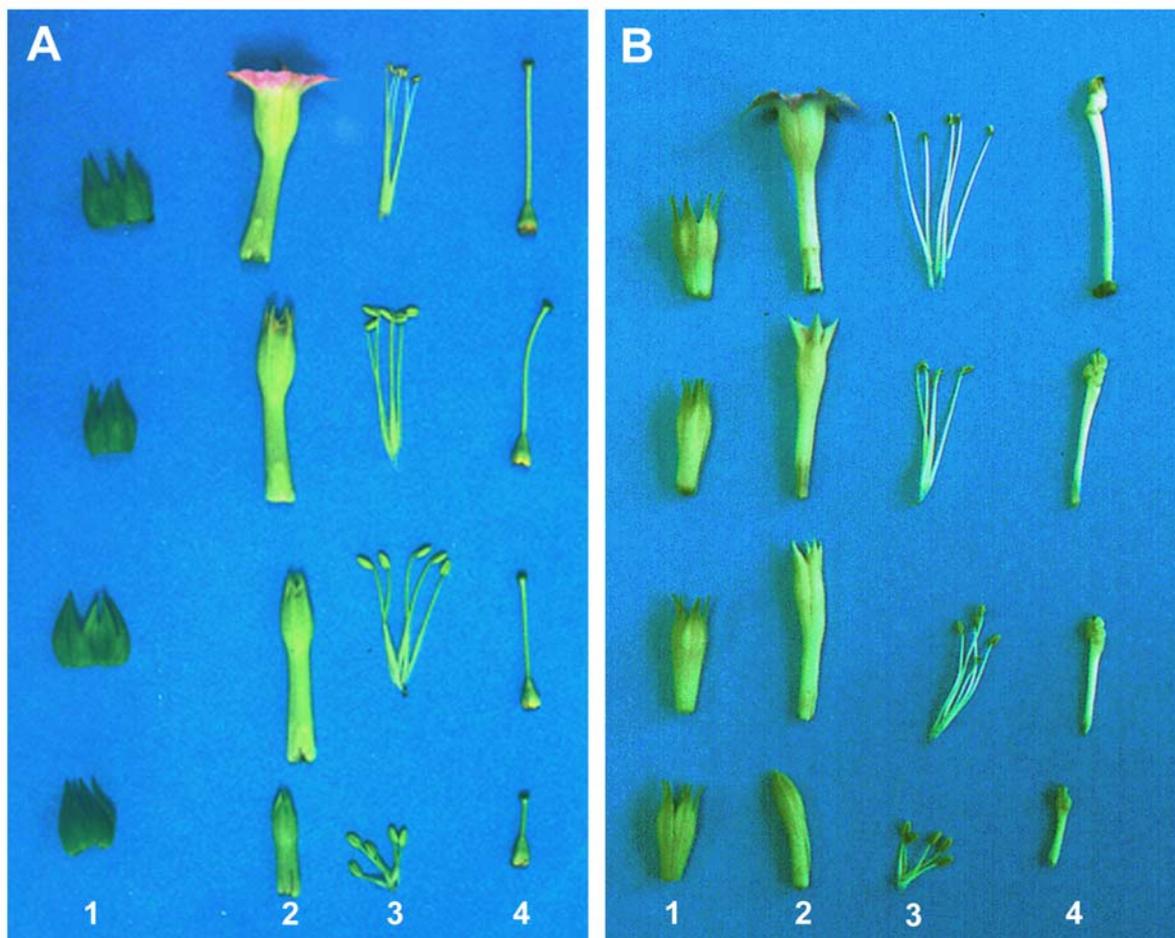
| Línea | Fenotipo  | Expresión de <i>PEAM1</i> |
|-------|-----------|---------------------------|
| T-1   | moderado  | ++                        |
| T-2   | moderado  | nd                        |
| T-3   | severo    | ++++                      |
| T-4   | severo    | +++                       |
| T-5   | silvestre | +                         |
| T-6   | severo    | +                         |
| T-7   | moderado  | nd                        |
| T-8   | severo    | +                         |
| T-9   | moderado  | ++                        |
| T-10  | severo    | ++                        |
| T-11  | severo    | +++                       |
| T-12  | silvestre | -                         |
| T-13  | leve      | nd                        |
| T-14  | severo    | +++                       |
| T-15  | severo    | nd                        |
| T-16  | severo    | nd                        |
| T-17  | moderado  | nd                        |
| T-18  | moderado  | nd                        |
| T-19  | leve      | nd                        |

nd: no determinado

floración. Respecto a las flores, la expresión constitutiva de *PEAM1* no altera ni el número de verticilos ni el de órganos sino que solo afectan a la morfología de los órganos que se desarrollan en el primer y cuarto verticilo. Todas las líneas con fenotipo presentan el mismo tipo de transformaciones, aunque con distinta intensidad, y éstas se pueden detectar desde estadios tempranos del desarrollo, acentuándose con la edad (Figuras 21 y 23, comparar los verticilos 1 y 4 de B con los del control A).

#### **1.1.1.1. Conversión homeótica del primer verticilo de las flores de tabaco 35S::*PEAM1***

Determinados rasgos de la pigmentación y la morfología de los órganos que ocupan el primer verticilo de las flores 35S::*PEAM1* son característicos de los pétalos. En estas flores, los sépalos cortos y de color verde oscuro, típicos de una flor silvestre, son sustituidos por otros más largos y de un color verde más pálido (Figuras 21, 23 y 24A y B). Estos órganos



**Figura 23. Órganos florales en distintos estadios de una planta de tabaco control y una 35S::PEAM1.4 de fenotipo severo. (A)** Flores de una planta control en distintos estadios de desarrollo. **(B)** Flores de una planta 35S::PEAM1.4 de fenotipo severo. Los números indican los distintos verticilos.

pierden la forma globular típica de los sépalos y forman una estructura tubular, más estrecha en la base, que se ensancha en la parte superior y que recuerda la estructura que constituye la parte inferior de los pétalos.

En las plantas 35S::PEAM1 con los fenotipos más severos se acentúa el carácter petaloide de los sépalos, intensificándose la palidez de la pigmentación y la forma tubular de estos órganos (Figura 21). Ocasionalmente, en las líneas de fenotipo severo, se pueden identificar pequeños sectores de pigmentación rojiza en la zona de unión de los órganos del primer verticilo (líneas T-4, T-10, T-15); esta pigmentación rojiza es el resultado de la coloración que adquieren los tricomas en esta región (Figura 24C) y es similar a la encontrada en el limbo de los pétalos. En los fenotipos más extremos, la región superior de estos órganos tiende a curvarse ligeramente hacia fuera, recordando el aspecto de la parte superior coloreada de los pétalos (Figura 24B).

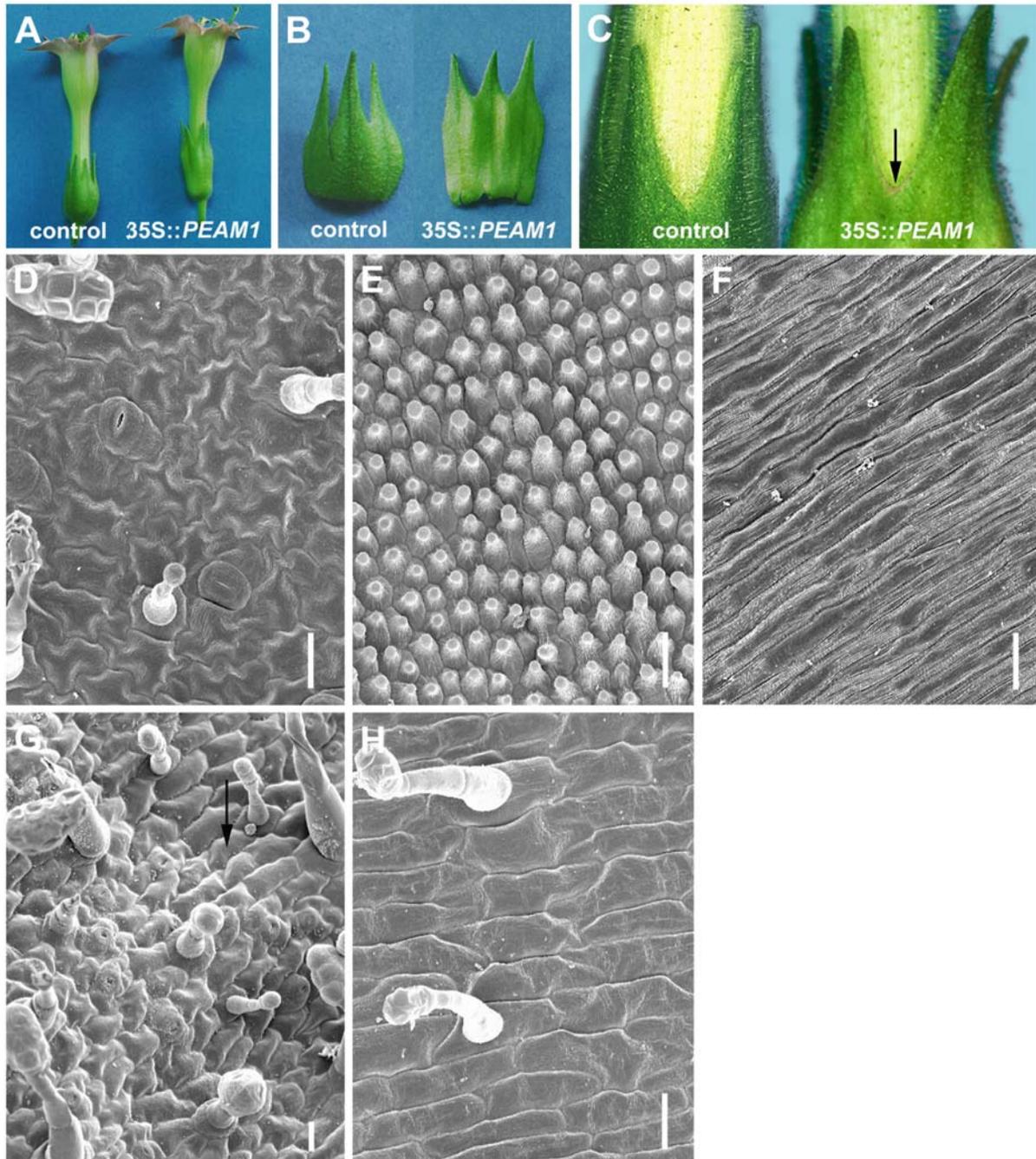
Para confirmar a nivel celular la aparente conversión homeótica de sépalo a pétalo, sugerida a partir de las observaciones a nivel macroscópico, se analizó la superficie abaxial y adaxial de estos órganos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 24D-H). En los órganos que ocupan el primer verticilo de las flores 35S::*PEAM1* (Figura 24G), además de los sectores típicamente sepaloideos (Figura 24D) constituidos por células de morfología irregular, tricomas de cabeza globular y estomas, se encuentran regiones constituidas por células de forma alargada, con tricomas de cabeza globular y que carecen de estomas (Figura 24H), características que recuerdan a las del tipo celular de la parte inferior de un pétalo (Figura 24F). En estas regiones de los sépalos 35S::*PEAM1*, se observa una reducción del número de tricomas en comparación con el observado en el tejido de sépalo. La extensión de estos sectores depende de la severidad del fenotipo analizado siendo de gran tamaño en las plantas de fenotipo severo en la que llega a ocupar prácticamente toda la superficie del órgano transformado.

Se encuentran células parecidas a las de pétalo tanto en la superficie adaxial como en la superficie abaxial de los sépalos de las flores 35S::*PEAM1*, lo que indica que la conversión homeótica de sépalo a órgano petaloide tiene lugar en ambas superficies. No obstante, las transformaciones producidas en la cara adaxial son más completas que las que se dan en la cara abaxial, donde la incidencia de las células petaloideas no es tan marcada. Con frecuencia, en las zonas de transición entre el tipo celular de sépalo y el de pétalo se pueden identificar unas células de características morfológicas intermedias entre ambos tipos celulares (Figura 24G).

---

**Figura 24. Características morfológicas del primer verticilo de las flores de tabaco 35S::*PEAM1*. (A-C)** Visión macroscópica del primer verticilo de las flores de tabaco 35S::*PEAM1*. **(A)** Flores control y 35S::*PEAM1*. **(B)** Sépalos control y 35S::*PEAM1*; el sépalo 35S::*PEAM1* es un órgano tubular de color más pálido que el control. **(C)** Detalle de la zona de unión de los órganos del primer verticilo en una planta control y en una planta 35S::*PEAM1*. La flecha negra señala una región de pigmentación rojiza en el sépalo 35S::*PEAM1*. **(D-H)** Análisis por SEM del tipo celular de los sépalos y pétalos de una flor control y una 35S::*PEAM1*. **(D, E, F y H)** superficie adaxial y **(G)** superficie abaxial. **(D)** Detalle del tipo celular de los sépalos; estas células se caracterizan por su forma irregular y por la presencia de estomas y de tricomas de cabeza globular. **(E)** Detalle de las células cónicas presentes en la parte superior pigmentada de un pétalo control. **(F)** Detalle del tipo celular presente en la parte inferior de un pétalo maduro. **(G)** Tipos celulares identificados en un sépalo alterado 35S::*PEAM1*. Se puede distinguir células de forma irregular típico del tejido de sépalo y células alargadas que recuerdan a las de la parte inferior de un pétalo maduro. La flecha negra señala una célula de características intermedias entre estos dos tipos celulares. **(H)** Detalle de las células alargadas de carácter petaloide mostradas en G presentes en los sépalos 35S::*PEAM1*. Las barras verticales representan en todos los casos 30  $\mu\text{m}$ .

La morfología de los órganos del segundo y tercer verticilo de las flores 35S::*PEAM1* es aparentemente normal, no encontrándose diferencias significativas con respecto a los de las flores control (Figura 23, comparar los verticilos 2 y 3 de A y B). Se ha observado, sin embargo, que en las líneas con las alteraciones morfológicas más severas se produce una reducción en la producción de polen con respecto a las plantas control, no obstante, el polen producido es perfectamente viable.



También se ha observado que, en las flores maduras, los estambres muestran frecuentemente ondulaciones en la parte inferior del filamento. Esto podría ser debido a la compresión que ejerce en esta zona la estructura tubular de los órganos petaloideos que se desarrollan en el primer verticilo o a la que ejerce el engrosamiento del carpelo o a la acción de ambas.

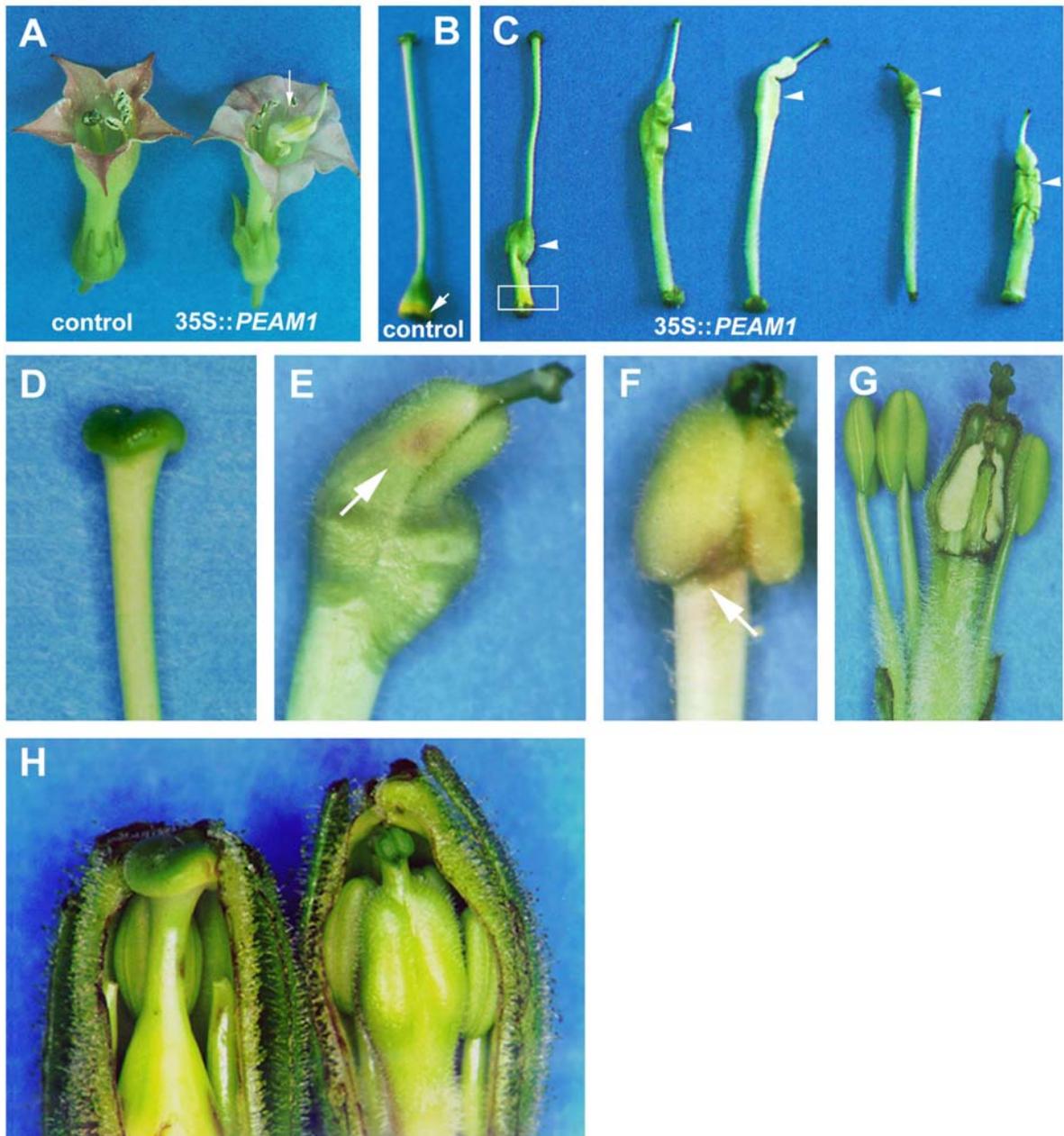
#### **1.1.1.2. Conversión homeótica del cuarto verticilo de las flores de tabaco 35S::*PEAM1***

Los órganos que se desarrollan en el cuarto verticilo de las flores 35S::*PEAM1* muestran grandes diferencias con los de las flores control, (Figuras 23 y 25). En tabaco, dos carpelos fusionados forman el gineceo en el cuarto verticilo (Figura 25B), en el que puede distinguirse un ovario con forma de domo en su base y un largo estilo que finaliza con un estigma de forma redondeada.

En el cuarto verticilo de las flores 35S::*PEAM1* se desarrolla una estructura de forma tubular que presenta un engrosamiento más o menos cercano a su base dependiendo de la severidad del fenotipo, encontrándose en la zona apical del tubo en las flores de las plantas con fenotipos más extremos (Figura 25C). Dentro de este engrosamiento se localizan los óvulos, de modo que, en las flores de fenotipo leve los óvulos se sitúan en la zona media-baja de éstos órganos. En este caso, el estilo es ligeramente más corto que en el carpelo silvestre. Ocasionalmente, en la base de estos órganos débilmente transformados, se puede identificar un anillo de pigmentación amarilla, similar al que se encuentra en la zona de producción de néctar en la base de un carpelo control (Figura 25C).

En los fenotipos más severos, se acentúa la forma tubular de estos carpelos alterados y los óvulos tienden a ocupar posiciones más altas dentro de estos órganos. Así pues, en los carpelos de fenotipo moderado, los óvulos se sitúan en la zona media-alta y en los de fenotipos severo se encuentran en posiciones apicales, llegando incluso a situarse al mismo nivel que las anteras (Figuras 23B y 25C y G). En la superficie externa de estos carpelos transformados, es frecuente encontrar pequeñas áreas de pigmentación rojiza justo en la zona donde se sitúan los óvulos (Figura 25E y F), los cuales, además, muestran también un tono rosáceo, a diferencia del color blanco de los óvulos del carpelo silvestre.

Como resultado de la expresión constitutiva de *PEAM1* también se produce una reducción en la longitud del estilo. En los carpelos débilmente transformados, el estilo sólo es ligeramente más corto que en los carpelos silvestres pero la reducción llega a ser tan marcada en los fenotipos con alteraciones morfológicas severas, que éste aparece como un órgano residual en lo alto de la estructura tubular (Figura 25C, E y F). También el estigma sufre



**Figura 25. Características morfológicas del cuarto verticilo de las flores 35S::PEAM1.** (A) Flor control pBinJIT (izquierda); flor 35S::PEAM1.6 de fenotipo severo (derecha); la flecha señala el carpelo alterado. (B) Carpelo control; la flecha señala la zona de producción de néctar en la base de este órgano. (C) Carpelos transgénicos 35S::PEAM1 con diferentes grados de severidad en el fenotipo; de izquierda a derecha se muestra desde un carpelo ligeramente transformado a otros donde las alteraciones morfológicas son muy severas; el recuadro señala, en un carpelo de fenotipo leve, el anillo de pigmentación amarilla equivalente a la zona de producción de néctar en el carpelo control; las puntas de flecha blancas señalan la posición del ovario en cada carpelo. (D) Detalle de la zona superior de un carpelo control donde se muestra el estigma de forma redondeada al final de un largo estilo. (E) y (F) Carpelos 35S::PEAM1 de fenotipo severo. El estilo es muy corto y el estigma es pequeño y deformado; las flechas indican zonas de pigmentación rojiza en la zona donde se localizan los óvulos. (G) Disección de un carpelo 35S::PEAM1 mostrando la posición que ocupan los óvulos; se observa también la presencia de tricomas en la base de este carpelo alterado al igual que en la parte baja del filamento de un estambre. (H) Comparación entre el cuarto verticilo de flores de una planta control (izquierda) y 35S::PEAM1 (derecha) en un estadio temprano del desarrollo, donde las diferencias morfológicas ya son evidentes.

alteraciones morfológicas apreciables, en tanto que se reduce de tamaño y tiende a perder la forma redondeada típica del estigma silvestre (Figura 25G).

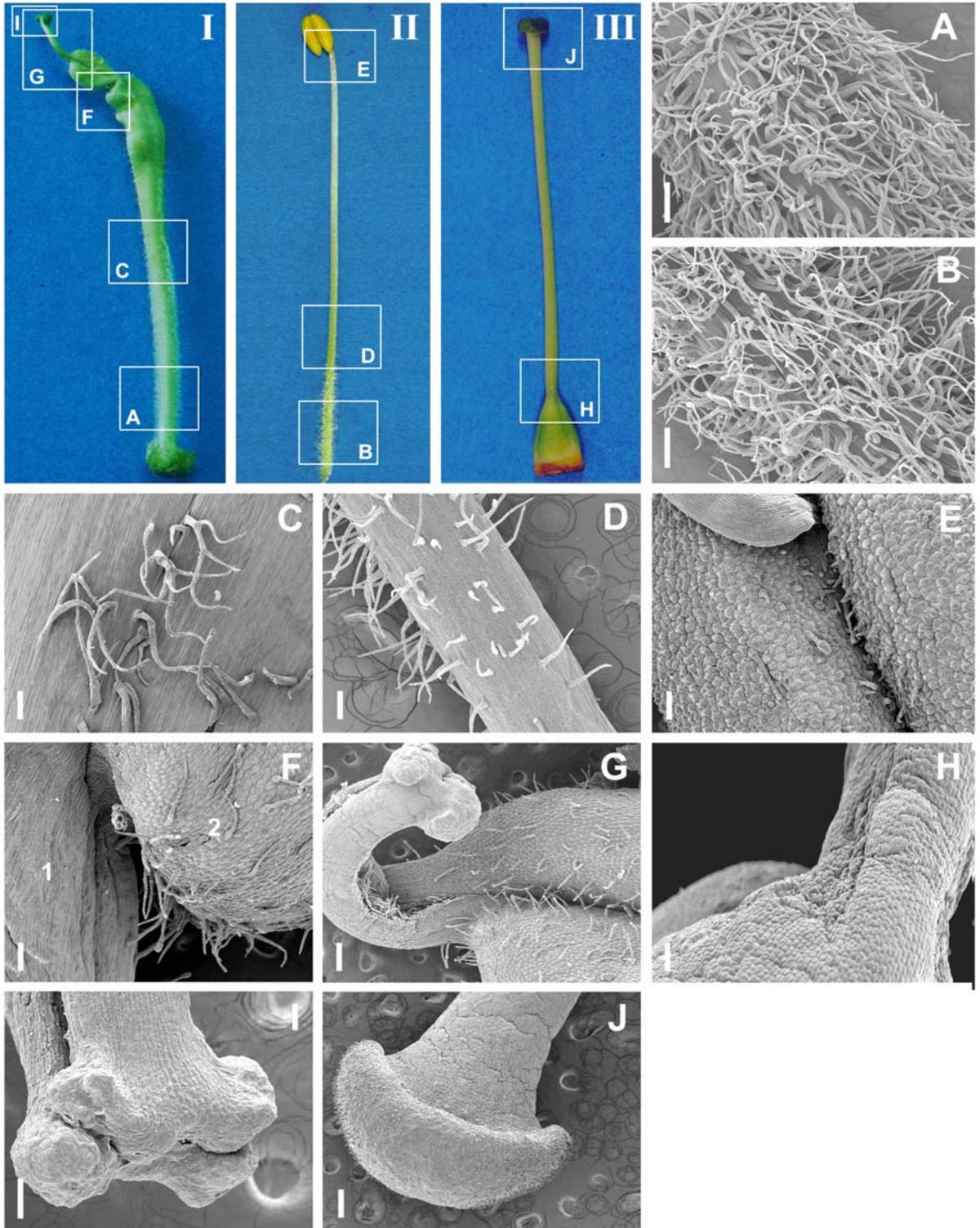
Las alteraciones descritas, observables desde estadios tempranos del desarrollo, confieren a los órganos del cuarto verticilo de las flores 35S::PEAM1, en particular a los de las flores con fenotipo más severo, una apariencia más cercana a la de un estambre que a la de un carpelo típico (Figura 25H); esta semejanza se acentúa en estadios más avanzados del desarrollo.

Para estudiar a nivel celular la modificación homeótica de los carpelos de las flores 35S::PEAM1, se llevó a cabo un análisis, mediante microscopía electrónica de barrido, de la superficie externa de estos órganos alterados. Se analizaron distintas regiones del carpelo 35S::PEAM1 y del estambre y el carpelo de las flores control (Figura 26); el análisis reveló que en el cuarto verticilo de las flores 35S::PEAM1 se desarrolla una estructura que tiene características tanto de estambre como de carpelo. La parte inferior de este órgano muestra una gran semejanza con el filamento de un estambre maduro, mientras que la parte superior conserva determinados rasgos que son propios de un carpelo pobremente desarrollado

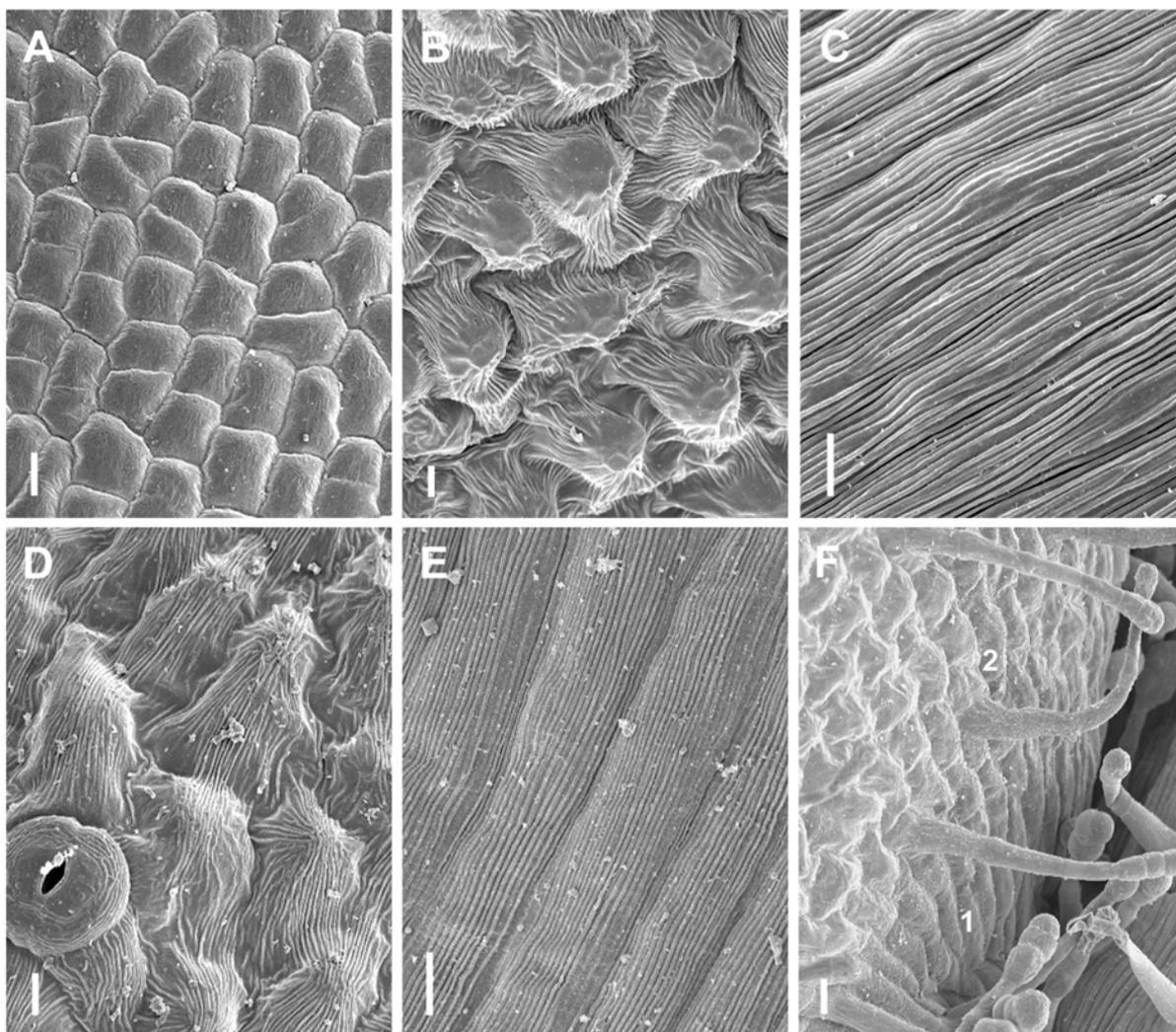
El análisis de la morfología celular de la parte más baja del carpelo de las flores 35S::PEAM1 mostró la presencia de células de morfología estriada con una alta densidad de tricomas ramificados y finalizados en punta, características similares a las que muestra el tipo celular de la parte inferior de un filamento de estambre (Figuras 26A y B y 27C y E); en posiciones superiores de la estructura tubular, el tipo celular se mantiene y la densidad de tricomas disminuye, al igual que ocurre en la parte superior del filamento de estambre (Figura 26C y D).

---

**Figura 26. Fenotipo del órgano tubular que se desarrolla en el cuarto verticilo de las flores de las plantas de tabaco 35S::PEAM1 observado mediante microscopía electrónica de barrido. (I)** Carpelo 35S::PEAM1 de fenotipo severo. **(II)** Estambre de planta control. **(III)** Carpelo control. **(A, C, F, G e I)** Muestran detalles de las zonas señaladas con un recuadro en el carpelo 35S::PEAM1, **(B, D y E)** en un estambre control y **(H y J)** en el carpelo control. **(A)** Región inferior de un carpelo 35S::PEAM1. **(B)** Región de la base de un filamento de estambre de una planta control, mostrando abundancia de tricomas ramificados y finalizados en punta. **(C)** Región media de un carpelo 35S::PEAM1. **(D)** Región intermedia de un filamento de estambre de una planta control, mostrando la reducción en la densidad de tricomas a medida que se asciende a lo largo de esta estructura. **(E)** Detalle de la zona donde se unen las tecas en una antera control. **(F)** Inicio de la zona engrosada, que contiene los óvulos, de un carpelo 35S::PEAM1 mostrando la transición entre dos tipos celulares: el de filamento (1) y el de antera (2). **(G)** Zona superior del carpelo 35S::PEAM1 donde se muestra el surco central; la apariencia de este órgano recuerda la zona de la antera donde se unen las tecas, que se muestran en E; el estilo, de reducido tamaño, aparece fasciado y finaliza en un estigma de morfología alterada. **(H)** Detalle de la zona distal del ovario y el comienzo del estilo en un carpelo control. **(I)** Estigma de un carpelo 35S::PEAM1; es de tamaño reducido, muestra engrosamientos prominentes en sus vértices más externos y se halla dividido por el centro. **(J)** Estigma de forma redondeada, típico de un carpelo control. Las barras verticales representan: 100 µm en C, D, F, E, H e I y 200 µm en A, B, G y J.



El tipo celular similar al de filamento de estambre se mantiene en los carpelos 35S::*PEAM1* hasta alcanzar la zona engrosada que contiene los óvulos (Figuras 26F y 27F). En la porción engrosada del carpelo transgénico, en cuyo interior están los óvulos, la epidermis presenta tricomas y está constituida por células con engrosamientos cuticulares prominentes que forman una ornamentación que recuerda a la del tipo celular característico de las anteras (Figura 27B y D).



**Figura 27. Análisis, mediante microscopía electrónica de barrido, de los tipos celulares presentes en el carpelo de las flores 35S::*PEAM1*. (A) Células de forma aplanada y sin ornamentación de la superficie epidérmica de un ovario control. (B) Tipo celular característico de una antera control, de morfología aplanada y con estrías longitudinales que convergen en la zona superior de cada célula. (C) Tipo celular alargado, con estrías longitudinales, característico del filamento de un estambre control. (D) Células de la zona engrosada de un carpelo 35S::*PEAM1*, en cuyo interior se encuentran los óvulos; su morfología es similar a la de las células del tejido de antera mostradas en B. (E) Tipo celular de la zona inferior y media de un carpelo transgénico, de características morfológicas similares al tipo celular del filamento de estambre mostrado en C. (F) Detalle de los tipos celulares identificados en la zona de transición “filamento-antera” en la zona de inicio del engrosamiento que contiene los óvulos en un carpelo 35S::*PEAM1*; células de filamento en la parte inferior (1) y células de antera en la parte superior (2). Las barras verticales representan: 10  $\mu\text{m}$  en A, B, C, D y E y 25  $\mu\text{m}$  en F.**

En la zona engrosada del carpelo transgénico son frecuentes los plegamientos, los cuales suelen dar lugar a la formación de un surco en la región central de estos órganos y que dan a éste una apariencia que recuerda a la zona en la que se unen las dos tecas de una antera (Figura 26E y G). A veces, la formación de este surco se extiende hasta alcanzar la zona de comienzo del estilo y, en consecuencia, éste tiende a bifurcarse dando lugar a dos estructuras prácticamente simétricas en cuyos márgenes laterales internos es posible identificar los tricomas característicos del tejido de antera (Figura 26G). En las flores transgénicas el estigma también sufre deformaciones que le hacen perder su típica forma redondeada y suele mostrarse como una estructura con un estrangulamiento en la zona central, que origina la formación de cuatro engrosamientos situados en los vértices más externos de este órgano (Figura 26I). Ocasionalmente, en los fenotipos más severos, la bifurcación del estilo se continúa hasta el estigma que aparece como una estructura deformada y partida por la zona central (Figura 26I).

Por tanto, el cuarto verticilo de las flores 35S::*PEAM1* es ocupado por un órgano mosaico cuya estructura tiene características tanto de estambre como de carpelo. En este órgano, de forma tubular, los óvulos se sitúan en lo alto de una estructura similar a un filamento de estambre, dentro de una zona engrosada y de características morfológicas y celulares que recuerdan la apariencia de una antera. Además de los óvulos, se conservan en estos órganos mosaico otras estructuras típicas de un carpelo, como son el estilo y el estigma, aunque éstos aparecen alterados.

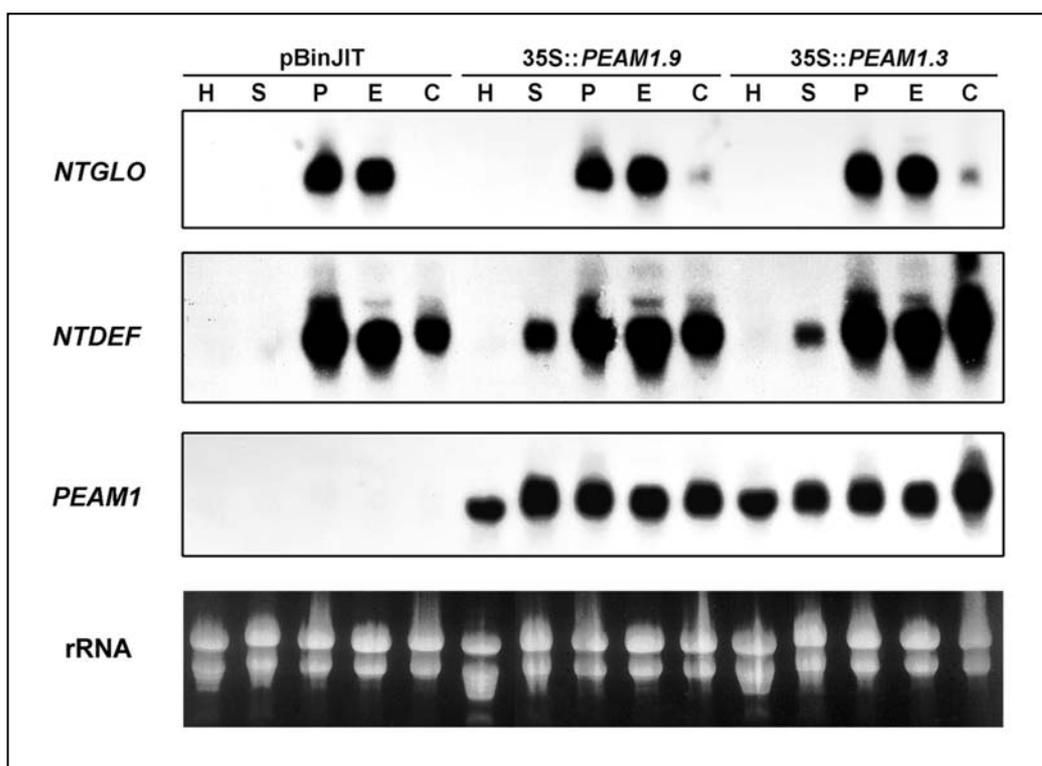
### **1.1.1.3. Análisis de la expresión de los genes endógenos de tabaco de función B en las plantas transgénicas 35S::*PEAM1***

Para intentar explicar a nivel molecular las diferencias entre la intensidad de las alteraciones homeóticas producidas en el primer y cuarto verticilo de las plantas de tabaco 35S::*PEAM1*, se estudió la influencia de la expresión ectópica del gen *PEAM1* en los genes endógenos de identidad de órgano de función B, *NTDEF* y *NTGLO*, los homólogos en tabaco a *DEF* y *GLO* respectivamente, mediante un análisis Northern. Se utilizó RNA aislado de hojas y de los órganos de los distintos verticilos de las flores de las plantas de tabaco 35S::*PEAM1* y se usó como sondas fragmentos de las regiones 3' de los genes endógenos de tabaco *NTDEF* y *NTGLO*, así como del transgén *PEAM1*, que muestran gran diferencia en sus secuencias. El resultado de este experimento se muestra en la figura 28.

De acuerdo a lo descrito previamente para tabaco, la expresión de *NTGLO* en las plantas control se detecta sólo en pétalos y estambres (Hansen *et al.*, 1993). En las plantas transgénicas de tabaco 35S::*PEAM1*, la expresión de *NTGLO* se detecta en sépalos, pétalos

y, además, aunque a un nivel bastante bajo, también en el cuarto verticilo (Figura 28). No se observó expresión de *NTGLO* ni en el primer verticilo ni en hojas vegetativas. Esto indica que el gen endógeno *NTGLO* puede ser activado en el cuarto verticilo por la expresión del gen *PEAM1* de guisante y proporciona una posible explicación para el hecho de que se observan fenotipos más severos en el cuarto verticilo que en el primero. Sin embargo, esta activación es relativamente débil.

El patrón de expresión de *NTDEF* ya ha sido descrito previamente (Davies *et al.*, 1996b). Se detecta un nivel alto de su transcrito en pétalos y estambres, con menor intensidad en carpelos y apenas es visible en sépalos. En las plantas transgénicas de tabaco 35S::*PEAM1* el patrón de expresión de *NTDEF* no muestra diferencias cualitativas con respecto al mostrado por las plantas control, si bien, su nivel de expresión parece intensificarse en todos los verticilos florales, siendo el incremento de la señal más acusado en los verticilos 1 y 4 (Figura 28). No se observó expresión de *NTDEF* en hojas vegetativas.



**Figura 28. Efecto de la expresión ectópica del gen *PEAM1* en la expresión de los genes endógenos de función B de tabaco.** El análisis Northern se realizó sobre el RNA (15 µg) extraído de hojas adultas (H) y de órganos florales de flores en estadio previo a la antesis, con un tamaño aproximado de 2'5 cm, en las que la pigmentación rojiza de los pétalos aún no es apreciable (S: sépalos; P: pétalos; E: estambres; C: carpelos), de plantas transgénicas de tabaco 35S::*PEAM1* (T-3 y T-9) y de plantas control (pBinJIT) transformadas con el vector sin inserto. En las hibridaciones se utilizaron como sondas un fragmento *EcoRV* (267pb) del extremo 3' del cDNA de *NTDEF*, un fragmento de 279 pb del extremo 3' del cDNA de *NTGLO* y un fragmento *SphI-EcoRI* (573 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM1*. En la parte inferior se muestra el control de carga del RNA ribosómico.

La expresión del transgén *PEAM1* se observó en todos los tejidos de las plantas transgénicas examinados; aunque el nivel de expresión de *PEAM1* en los distintos verticilos de las flores de las plantas transgénicas es muy similar, parece detectarse un nivel de expresión mayor en el primer verticilo de la planta 35S::*PEAM1.9* y en el cuarto de la 35S::*PEAM1.3*, lo que parece correlacionar con el aumento de la expresión de los genes endógenos.

## 1.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM1* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Columbia (Col) se generaron 76 plantas independientes capaces de crecer en medio de selección con kanamicina; 18 de estas plantas mostraron el mismo tipo de alteraciones fenotípicas en las flores, consistente en la aparición de sectores blanquecinos en los sépalos, mientras que el resto de las plantas no mostraron cambios apreciables respecto a las plantas control.

Con el fin de determinar el número de *loci* en que se había producido la inserción del T-DNA, se llevó a cabo el análisis de segregación de varias de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T<sub>2</sub> en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y transgénicas. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis* T<sub>2</sub> 35S::*PEAM1*.**

| Línea | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |     |       | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|-------|-------------------------------------|-------------------|-----|-------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|       |                                     | +                 | -   |       |              |                 |                |                            |           |
|       |                                     | (R)               | (S) |       |              |                 |                |                            |           |
| T-3*  | 24                                  | 17                | 7   | 1'2/4 | 3:1          | 0'542           | 0'46           | 1                          |           |
| T-4*  | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4 | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-5*  | 24                                  | 20                | 4   | 0'7/4 | 3:1          | 1'167           | 0'28           | 1                          |           |
| T-7*  | 24                                  | 17                | 7   | 1'2/4 | 3:1          | 0'542           | 0'46           | 1                          |           |
| T-8   | 24                                  | 20                | 4   | 0'7/4 | 3:1          | 1'167           | 0'28           | 1                          |           |
| T-10* | 24                                  | 20                | 4   | 0'7/4 | 3:1          | 1'167           | 0'28           | 1                          |           |
| T-13* | 24                                  | 15                | 9   | 1'5/4 | 3:1          | 1'723           | 0'19           | 1                          |           |
| T-16* | 23                                  | 17                | 6   | 1'0/4 | 3:1          | 0'053           | 0'82           | 1                          |           |
| T-17* | 24                                  | 19                | 5   | 0'8/4 | 3:1          | 0'389           | 0'53           | 1                          |           |

## Resultados

**Tabla 13 (continuación). Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis* T<sub>2</sub> 35S::PEAM1.**

| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |     |        | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|-----|--------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | +                 | -   |        |              |                 |                |                            |           |
|         |                                     | (R)               | (S) |        |              |                 |                |                            |           |
| T-23*   | 24                                  | 19                | 3   | 0'6/4  | 3:1          | 1'878           | 0'17           | 1                          |           |
| T-30*   | 24                                  | 17                | 7   | 1'2/4  | 3:1          | 0'542           | 0'46           | 1                          |           |
| T-38    | 24                                  | 19                | 5   | 0'8/4  | 3:1          | 0'389           | 0'53           | 1                          |           |
| T-50*   | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-56*   | 24                                  | 21                | 3   | 2'0/16 | 15:1         | 0'845           | 0'36           | 2                          |           |
| T-57*   | 24                                  | 17                | 7   | 1'2/4  | 3:1          | 0'542           | 0'46           | 1                          |           |
| T-63*   | 24                                  | 17                | 7   | 1'2/4  | 3:1          | 0'542           | 0'46           | 1                          |           |
| T-67*   | 24                                  | 19                | 5   | 0'8/4  | 3:1          | 0'389           | 0'53           | 1                          |           |
| T-68*   | 23                                  | 17                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-70    | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-75*   | 24                                  | 17                | 7   | 1'2/4  | 3:1          | 0'542           | 0'46           | 1                          |           |
| T-76*   | 23                                  | 18                | 5   | 0'9/4  | 3:1          | 0'293           | 0'59           | 1                          |           |
| Control | 24                                  | 0                 | 24  |        |              |                 |                | 0                          |           |

Las líneas que mostraban alteraciones fenotípicas se indican con un asterisco.

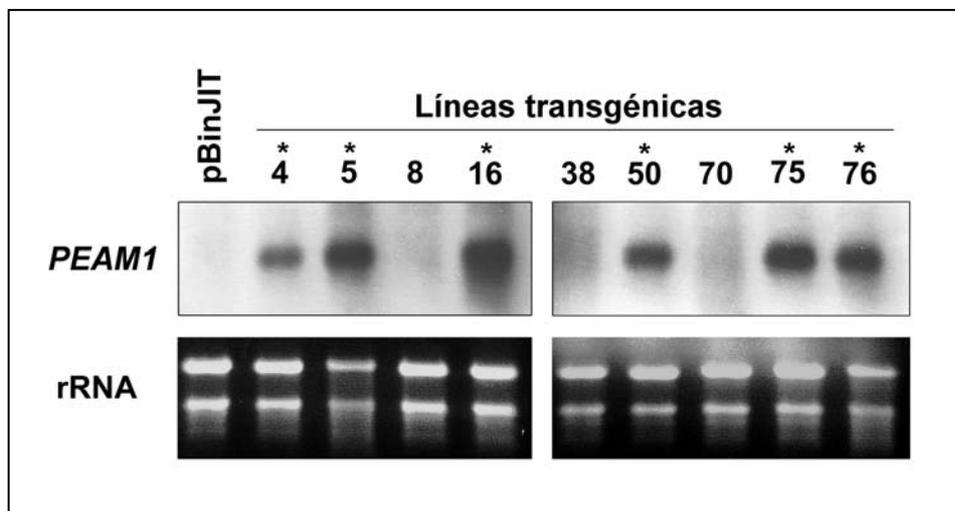
En todas las líneas transgénicas excepto en la T-56 la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1 (resistentes:sensibles), que corresponde con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. En la línea transgénica T-56 la segregación obtenida se ajusta a una relación 15:1 que indica la inserción del transgén en dos *loci* diferentes.

El nivel de expresión del transgén *PEAM1* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 29.

El análisis Northern mostró niveles variables de expresión de *PEAM1* entre las distintas líneas transgénicas 35S::PEAM1 analizadas y la ausencia de hibridación en la línea control pBinJIT. Se observó expresión de *PEAM1* en las líneas T-4, T-5, T-16, T-50, T-75 y T-76, todas ellas mostraban alteraciones fenotípicas. La línea T-16, la que muestra un fenotipo más extremo, es también la que mostró un mayor nivel de expresión del transgén. No se detectó expresión de *PEAM1* en las líneas T-8, T-38 y T-70; en estas líneas no se detectó alteración fenotípica alguna.

Estos resultados confirman que el gen *PEAM1* se está expresando en las líneas transgénicas que presentan alteraciones fenotípicas. Existe además, una correlación entre

el nivel de expresión del transgén y la intensidad de estas alteraciones; las plantas donde los niveles de expresión del transgén son elevados son aquellas en las que el carácter petaloide de los órganos que ocupan el primer verticilo en las flores es más acentuado.



**Figura 29. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM1* en plantas de *Arabidopsis thaliana* control y transformadas con la construcción *35S::PEAM1*.** Línea control (pBinJIT); líneas transgénicas (T-4 a T-76). En cada una de las carreras, se cargaron 10  $\mu$ g de RNA total extraído de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *SphI-EcoRI* de (573 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM1*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. Los asteriscos señalan las líneas que presentan fenotipo alterado.

### 1.2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis 35S::PEAM1*

Las plantas *35S::PEAM1* no exhiben alteraciones morfológicas fuera de los órganos florales; no se han observado cambios en la arquitectura de la planta, ni tampoco las hojas de roseta ni las hojas caulinares muestran cambios asociados a la expresión constitutiva de *PEAM1*.

Para analizar el efecto de la expresión constitutiva de *PEAM1* sobre el tiempo de floración en las plantas transgénicas *35S::PEAM1*, se generaron plantas homocigotas de 5 líneas *35S::PEAM1*. Tanto las plantas control como las distintas líneas *35S::PEAM1* florecen al mismo tiempo bajo condiciones de día largo, aproximadamente cuatro semanas tras ser sembradas (Figura 30A). El tiempo de floración en las distintas líneas transgénicas se estimó mediante el conteo, en plantas crecidas bajo condiciones de día largo, del número total de hojas producido por el tallo principal. Los resultados de dichos conteos se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM1* en el tiempo de floración de *Arabidopsis*.**

| Genotipo                          | n <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales |
|-----------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|
| pBinJIT60(control) <sup>d</sup>   | 28             | 12'0 ± 0'9                   | 2'5 ± 0'5                     | 14'5 ± 1'0    |
| 35S:: <i>PEAM1.5</i> <sup>e</sup> | 27             | 12'2 ± 1'0                   | 3'0 ± 0'5                     | 15'2 ± 1'0    |
| 35S:: <i>PEAM1.16</i>             | 41             | 12'0 ± 1'1                   | 2'7 ± 0'5                     | 14'7 ± 1'1    |
| 35S:: <i>PEAM1.50</i>             | 27             | 12'2 ± 0'5                   | 2'9 ± 0'8                     | 15'0 ± 1'0    |
| 35S:: <i>PEAM1.73</i>             | 31             | 11'7 ± 0'8                   | 2'6 ± 0'7                     | 14'3 ± 1'0    |
| 35S:: <i>PEAM1.75</i>             | 30             | 12'0 ± 0'8                   | 2'9 ± 0'5                     | 15'0 ± 0'9    |

<sup>a</sup> n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM1*.

<sup>e</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM1* numeradas 5, 16, 50, 75 y 76.

No se encontraron diferencias significativas entre el número de hojas con que florecen las plantas control y las líneas 35S::*PEAM1*, lo que confirma que la expresión constitutiva de *PEAM1* en *Arabidopsis* no tiene efecto sobre el tiempo de floración.

#### **1.2.1.1. Fenotipo floral resultante de la expresión constitutiva de *PEAM1* en *Arabidopsis***

La flor de *Arabidopsis thaliana* tiene una estructura simple (Figura 30D), típica de las *Brassicaceae*. Posee un cáliz con cuatro sépalos y una corola de cuatro pétalos, cuyas posiciones son alternas e internas a la de los sépalos. El androceo se compone de seis estambres, cuatro centrales largos y dos laterales cortos. Finalmente, el gineceo ocupa el centro de la flor y está constituido por dos carpelos fusionados.

El cáliz de las flores 35S::*PEAM1* es mucho más abierto que el de las flores control (Figuras 30E y F y 31A y B); esta tendencia a una mayor apertura del cáliz se puede observar desde estadios tempranos del desarrollo aunque se acentúa en estadios más avanzados (Figura 30B y C). Mientras que los verticilos de pétalos, estambres y carpelos de las flores 35S::*PEAM1* son aparentemente normales, en los órganos que ocupan el primer verticilo se pueden distinguir unos sectores de un tejido de color blanquecino que recuerda al tejido que forma los pétalos (Figura 30E y F), que no se observa en los sépalos de las flores control. La extensión del área ocupada por este tejido de naturaleza petaloide, se corresponde con el grado de intensidad de las alteraciones fenotípicas en las flores

35S::*PEAM1*. Los sépalos de las flores 35S::*PEAM1* se desarrollan como órganos mosaico estando formados por dos tipos de tejido claramente identificables; la región central de estos órganos conserva el tejido verde característico de sépalo, mientras que el tejido de color blanquecino se extiende a lo largo de los márgenes laterales (Figura 30G). Con frecuencia, se pueden observar pequeñas deformaciones en los márgenes laterales de estos órganos mosaico que les confieren una forma irregular (Figura 31D y E). En ocasiones, en las flores de fenotipo más severo, la región más apical de estos órganos se deforma formándose estructuras de aspecto filiforme (Figura 31G).

Para estudiar a nivel celular la aparente conversión homeótica de sépalo a pétalo en las flores 35S::*PEAM1*, sugerida por las observaciones a nivel macroscópico, se analizaron las superficies abaxial y adaxial de estos órganos mosaico mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 32). En la cara abaxial de los sépalos 35S::*PEAM1*, se pueden distinguir dos regiones cuyas células exhiben características morfológicas diferentes (Figura 32C). En la zona central (Figura 32C, 1) se puede identificar un tipo celular de forma alargada y ornamentación característica, como el que constituye la epidermis abaxial de un sépalo normal (Figura 32, comparar la región 1 de C y E con A y G). Sin embargo, en la zona de los márgenes laterales de los sépalos 35S::*PEAM1* (Figura 32C, 2), las células alargadas típicas de tejido de sépalo han sido sustituidas por otras de morfología redondeada y con engrosamientos cuticulares prominentes, características que son propias del tipo celular que forma la superficie abaxial de un pétalo (Figura 32, comparar región 2 de C y E con I).

**Figura 30. Fenotipo de las plantas, transgénicas, de *Arabidopsis* 35S::*PEAM1*.** (A) Plantas homocigotas de la línea control pBinJIT60 a la izquierda y de la línea transgénica 35S::*PEAM1*.16, a la derecha, cultivadas bajo condiciones de día largo. En (B) y (C) se muestra, respectivamente, las inflorescencias de una planta control y de una planta transgénica 35S::*PEAM1* que contienen flores en distintos estadios de desarrollo; las alteraciones morfológicas en las flores transgénicas son evidentes en las flores más jóvenes aunque éstas se acentúan en las flores maduras. (D) Flor control en antesis. (E) y (F) Flores 35S::*PEAM1* en antesis; las flechas señalan el tejido de color blanquecino de los órganos del primer verticilo de las flores transgénicas. (G) En la parte izquierda dos sépalos control mostrando el color verde y los tricomas, característicos del tejido de este órgano. En el centro se muestran dos órganos del primer verticilo de flores 35S::*PEAM1*; las puntas de flecha negras señalan el tejido de sépalo en las posiciones centrales de estos órganos y las flechas blancas señalan el tejido blanquecino, de naturaleza petaloide, en los márgenes laterales de estos órganos. A la derecha se muestra un pétalo control.

**Figura 31. Análisis SEM de los órganos del primer verticilo de las flores de *Arabidopsis* 35S::*PEAM1*.** (A) Flor en antesis de una planta control. (B) Flor en antesis de una planta transgénica 35S::*PEAM1*. (C) Sépalo control. (D) y (E) Órganos del primer verticilo de flores 35S::*PEAM1*. Las flechas indican las deformaciones observadas en los márgenes de estos órganos. (F) Región apical de un sépalo control. (G) Región apical de un sépalo transgénico 35S::*PEAM1* de fenotipo severo; la flecha indica la estructura filiforme que, ocasionalmente, se forma en esta zona. (H) Región apical del primer verticilo de una flor 35S::*PEAM1* en estadio 8 de desarrollo (según Smyth *et al.*, 1990). Las flechas señalan células redondeadas en los márgenes de estos órganos modificados de morfología similar al tipo celular de la superficie abaxial de pétalo. Las barras verticales representan: 500  $\mu\text{m}$  en A y B y 100  $\mu\text{m}$  en C, D, E, F, G y H.

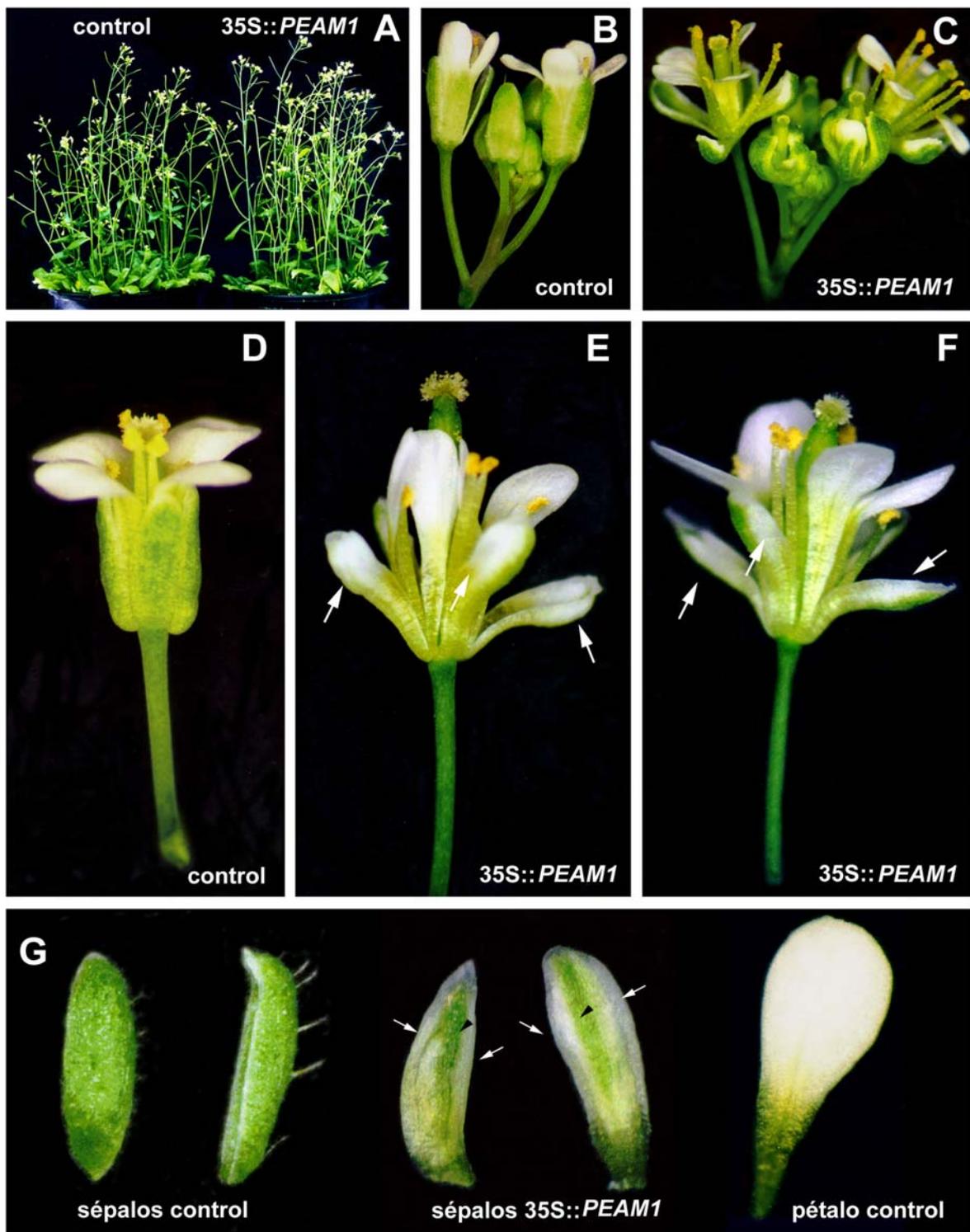


Figura 30. Fenotipo de las plantas, transgénicas, de *Arabidopsis* 35S::PEAM1.

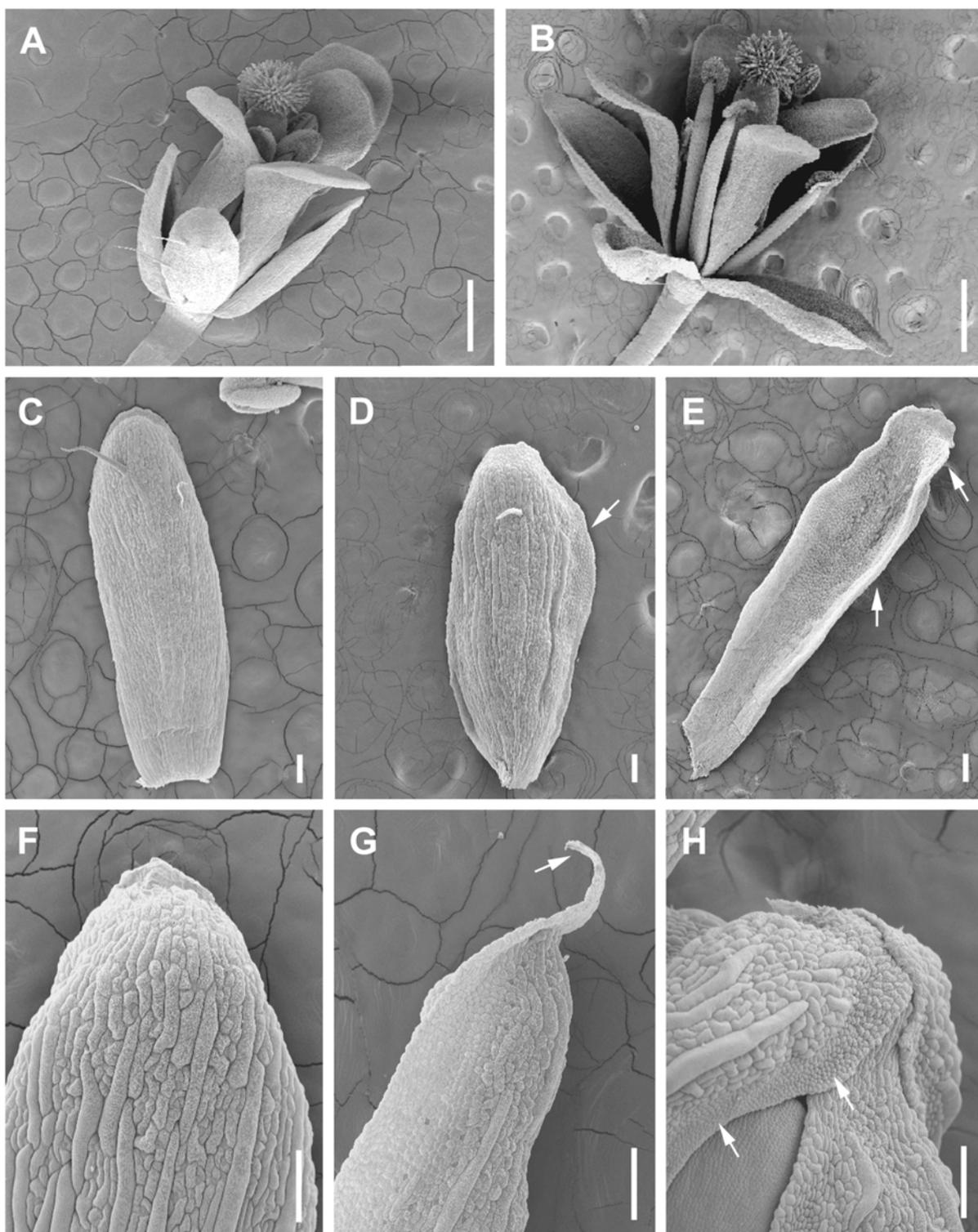


Figura 31. Análisis SEM de los órganos del primer verticilo de las flores de *Arabidopsis 35S::PEAM1*.

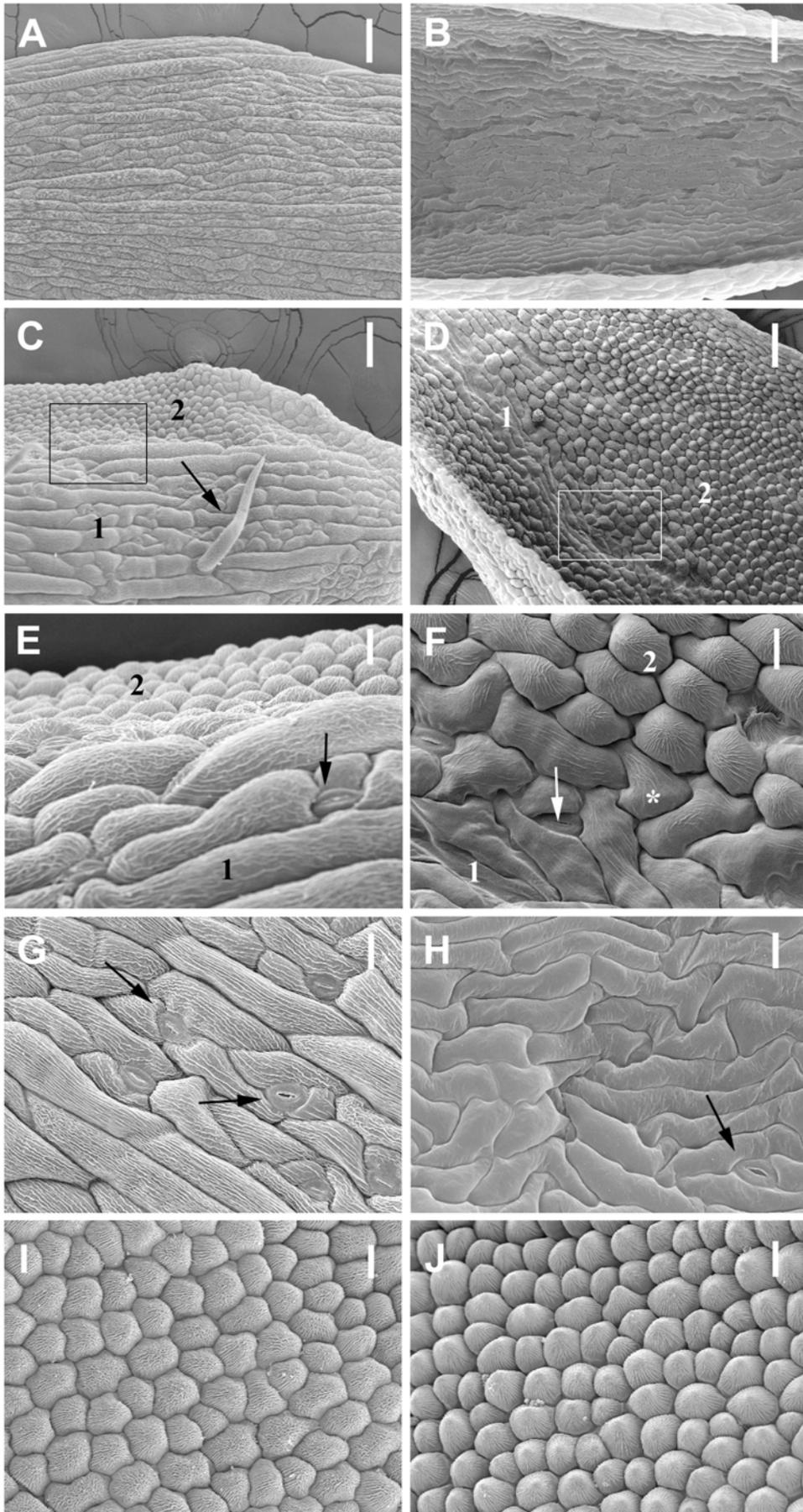
Las células de pétalo se pueden identificar con claridad desde estadios tempranos del desarrollo de estos órganos (Figura 31H). En la superficie adaxial de los sépalos transformados también se encuentran células cónicas características del tejido de pétalo (Figura 32D y F) lo que muestra que la conversión homeótica de sépalo a órgano petaloide en las flores 35S::PEAM1 tiene lugar en ambas superficies. Las transformaciones producidas en la cara adaxial son más completas que las que se producen en la cara abaxial, donde la incidencia de los tipos celulares de pétalo no es tan marcada (Figura 32C y D).

Con frecuencia se pueden observar células de características morfológicas intermedias entre las del tipo celular de pétalo y las de sépalo. Estas células, con forma entre redondeada y alargada (Figura 32F), se sitúan en la zona de transición entre el tejido de sépalo y de pétalo en estos órganos mosaico.

Por otra parte, otras evidencias morfológicas confirman la naturaleza petaloide de los órganos del primer verticilo de las flores 35S::PEAM1. Tipos celulares característicos de la epidermis del sépalo normal de *Arabidopsis*, tales como, los estomas y, en la superficie abaxial, los tricomas (Figura 32C, I y J), no aparecen en las regiones de estos órganos mosaico que contienen el tejido transformado y solamente se conservan en las posiciones centrales de los mismos.

---

**Figura 32. Análisis SEM de las características morfológicas de la superficie epidérmica de los sépalos de las flores de *Arabidopsis* 35S::PEAM1.** Los paneles de la izquierda (**A, C, E, G e I**) muestran las superficies abaxiales de los órganos florales analizados y los paneles de la derecha (**B, D, F, H y J**) muestran las superficies adaxiales. **Superficie abaxial:** (**A**) Sépalo control. (**C**) Sépalo transgénico 35S::PEAM1, mostrando dos regiones con células de características morfológicas diferentes; la región 1 ocupa la zona central de estos órganos y presenta una apariencia similar al tejido de sépalo mostrado en A; la flecha negra señala un tricoma; la región 2 ocupa el margen lateral de estos sépalos modificados. (**E**) Detalle de la zona recuadrada en C, mostrando los tipos celulares encontrados en las regiones 1 y 2; la región 1 está formada por células alargadas de morfología similar a las que forman la epidermis abaxial de sépalo, mostrado en G; la flecha señala la existencia de estomas en esta región. En la región 2, el tipo celular redondeado es similar al que forma la epidermis de pétalo, que se muestra en I. (**G**) Visión más ampliada de las células que forman la epidermis abaxial del sépalo de una flor silvestre; los engrosamientos cuticulares se organizan a lo largo del eje longitudinal de las células. Las flechas señalan la presencia de estomas. (**I**) Detalle de las células redondeadas que forman la epidermis abaxial del pétalo de una flor silvestre; los engrosamientos cuticulares son prominentes en estas células; en la epidermis de pétalo no aparecen los estomas. **Superficie adaxial:** (**B**) Sépalo control. (**D**) Sépalo transgénico 35S::PEAM1, mostrando también dos regiones con células epidérmicas de características morfológicas diferentes; aquí, la región 2, de naturaleza petaloide, ocupa la mayor parte del sépalo transgénico. (**F**) Detalle de la zona recuadrada en D mostrando los tipos celulares encontrados en las regiones 1 y 2 de la cara adaxial de un sépalo transgénico 35S::PEAM1. La región 1 está formada por células alargadas de morfología similar a las que constituyen la epidermis adaxial del sépalo, mostrado en I; la flecha señala un estoma. En la región 2, el tipo celular cónico es similar al que forma la epidermis adaxial de pétalo mostrado en J. El asterisco señala una célula de características intermedias entre el tipo celular de la región 1 y el de la región 2. (**H**) Detalle de las células alargadas que forman la epidermis adaxial de sépalo; la flecha señala la presencia de estomas. (**J**) Detalle de las células cónicas que forman la epidermis adaxial de pétalo; los engrosamientos cuticulares en estas células son prominentes y se disponen de manera convergente al centro de las mismas. Nótese la ausencia de estomas. Las barras verticales representan 50  $\mu\text{m}$  en A, B, C y D y 10  $\mu\text{m}$  en E, F, G, H, I y J.



### 1.3. ESTUDIO FUNCIONAL DEL GEN *PEAM1* DE GUISANTE MEDIANTE LA COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE MUTANTES DE *Arabidopsis*

#### 1.3.1. COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE LA MUTACIÓN *pistillata1* DE *Arabidopsis* CON EL GEN *PEAM1*

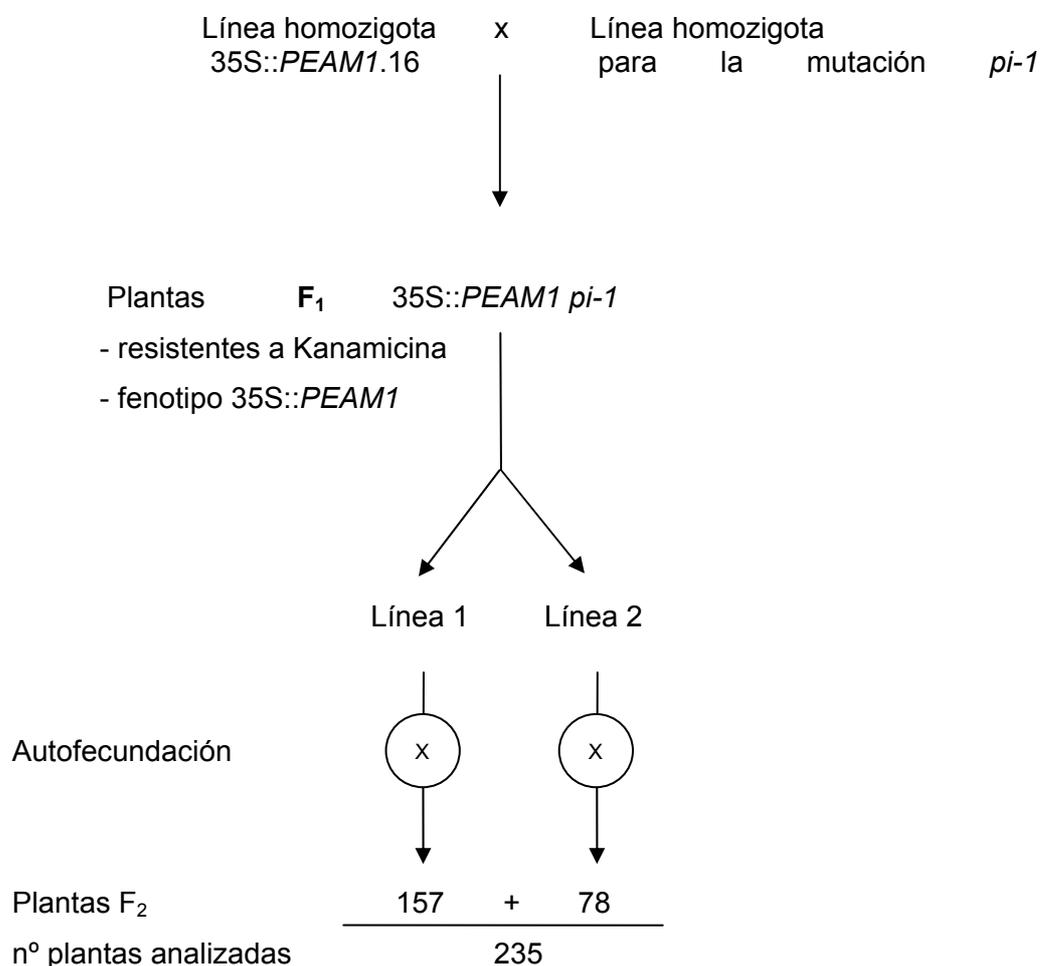
Los datos de homología de secuencia y el fenotipo de las flores 35S::*PEAM1* de *Arabidopsis* y tabaco sugieren que *PEAM1* es el homólogo funcional del gen *PISTILLATA* de *Arabidopsis*. Por ello, otro abordaje experimental para el estudio de la función del gen *PEAM1* de guisante consistió en ensayar la capacidad de dicho gen para complementar la mutación *pistillata* de *Arabidopsis thaliana*.

De los tres alelos recesivos de la mutación *pi* analizados por Bowman *et al.*, (1991), se utilizó el alelo fuerte *pi-1*, cuyas flores son las que muestran las mayores alteraciones fenotípicas con respecto al fenotipo silvestre. Los órganos del segundo verticilo de las flores *pi-1* se hallan completamente transformados en sépalos y las células que en una flor silvestre formarían el tercer verticilo se incorporan al carpelo, con lo cual éste adquiere un tamaño anormalmente grande (Figura 34B); a veces se observa el desarrollo de unas estructuras filamentosas en los flancos de este carpelo anormal.

Se cruzó una planta homocigota de la línea de fenotipo severo 35S::*PEAM1*.16, con una planta homocigota para el alelo mutante *pi-1*. De las semillas ( $F_1$ ) resultantes del cruce se sembraron seis en medio con kanamicina, para comprobar que todas habían heredado el transgén; el resto de semillas del cruce se sembraron directamente en tierra y se comprobó que las plantas resultantes mostraban alteraciones fenotípicas idénticas a las de las transgénicas 35S::*PEAM1*.

El análisis fenotípico se llevó a cabo sobre la descendencia ( $F_2$ ) de dos de estas líneas  $F_1$  35S::*PEAM1 pi-1* resultantes del cruce; se analizaron un total de 235 plantas de las cuales 157 provenían de la línea 1 y 78 de la línea 2. En la figura 33 se muestra un esquema del procedimiento experimental que se siguió en el ensayo de complementación del mutante *pi-1* con el gen *PEAM1* de guisante.

Figura 33. Esquema del experimento de complementación de la mutación *pi-1* con el gen *PEAM1* de guisante.



Las plantas F<sub>2</sub> resultantes del cruce de la transgénica 35S::PEAM1 con el mutante *pi-1* se clasificaron en cuatro clases fenotípicas diferentes: plantas de fenotipo silvestre, fenotipo *pi-1*, fenotipo 35S::PEAM1 y una clase nueva a la que se asignó el nombre de fenotipo complementado y en la que se incluyeron una amplia gama de fenotipos florales intermedios entre el fenotipo de las flores mutantes *pi-1* y el de las flores 35S::PEAM1 (Figura 34). Las plantas complementadas tienen, presumiblemente, un genotipo de homocigotas para *pi-1* y homo o hemizigotas para 35S::PEAM1; el análisis del genotipo de estas plantas no se ha llevado a cabo. Los resultados del análisis fenotípico de las plantas F<sub>2</sub> se muestran en la tabla 15, en la que se contabilizan, de manera conjunta para las dos poblaciones F<sub>2</sub>, el número de individuos correspondiente a las distintas categorías fenotípicas observadas entre las plantas analizadas. Para cada categoría fenotípica se indica también el número de individuos que se esperaría si hubiera complementación de la mutación *pi-1* y si no la hubiera.

## Resultados

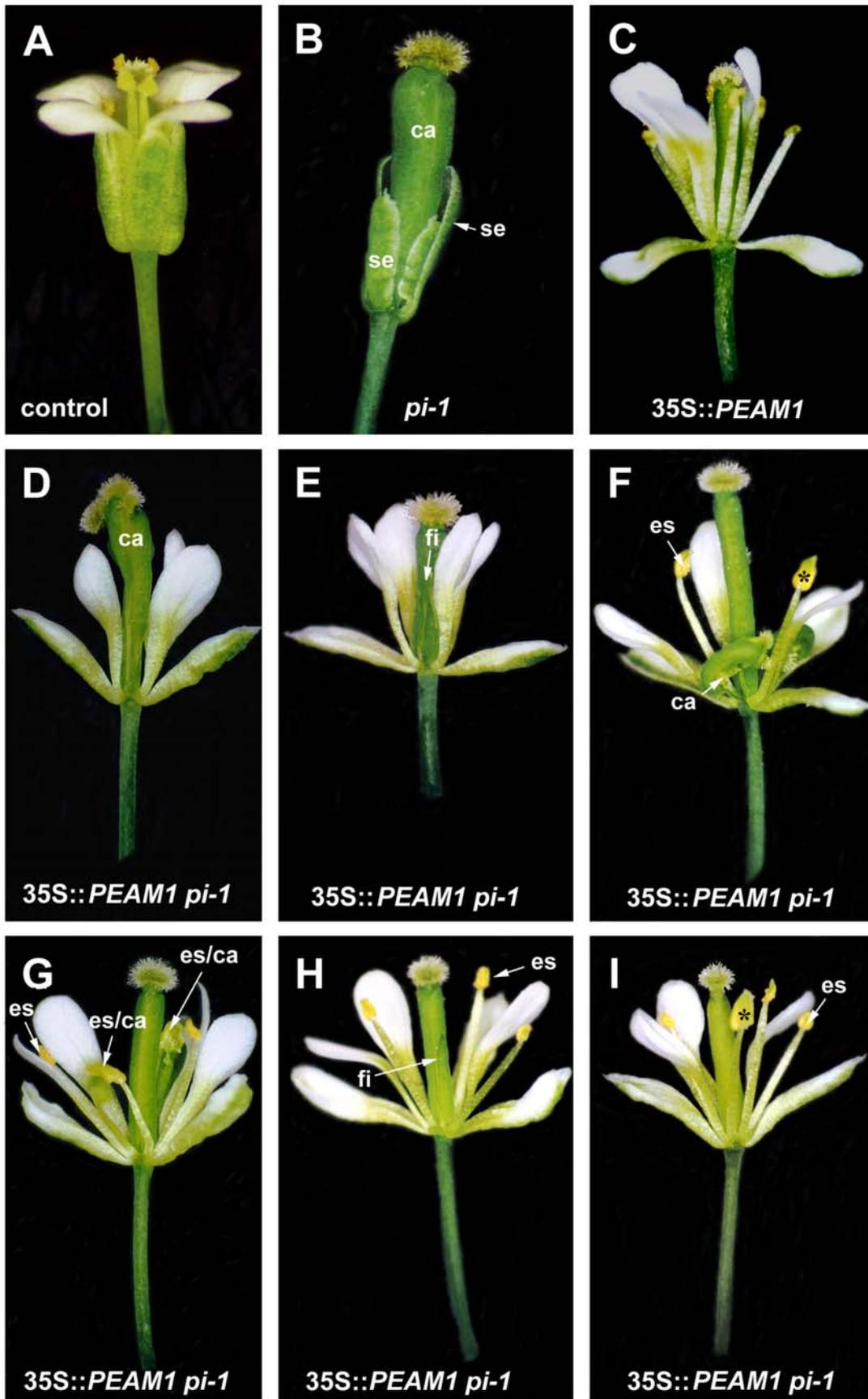
**Tabla 15. Análisis fenotípico de las plantas F<sub>2</sub> descendientes del cruce 35S::*PEAM1.16* con *pi-1*.**

Nº de individuos de cada clase fenotípica

| Fenotipo           | Observados | Esperados              |                           |
|--------------------|------------|------------------------|---------------------------|
|                    |            | Si hay complementación | Si no hay complementación |
| Silvestre          | 45         | 44'1 (3/16)            | 44'1 (3/16)               |
| <i>pi-1</i>        | 18         | 14'7 (1/16)            | 58'8 (4/16)               |
| 35S:: <i>PEAM1</i> | 130        | 132'2 (9/16)           | 132'2 (9/16)              |
| Complementado      | 42         | 44'1 (3/16)            | 0 (0/16)                  |
| Total              | 235        | 235                    | 235                       |

Los resultados de los recuentos muestran que, para cada una de las clases fenotípicas el número de individuos observados se ajusta bastante al número de individuos que se esperaría en caso de darse la complementación de la mutación. Esta hipótesis de complementación (H<sub>0</sub>) se ha contrastado utilizando el test de la  $\chi^2$ . En este caso, dado que el valor del estadístico muestral  $\chi^2 = 0'7453$  en el ensayo de complementación de la mutación *pi-1* es inferior al valor de las tablas  $\chi^2_{3} = 7'81$  (para un  $\alpha = 0'05$ ) no se puede rechazar la hipótesis nula de que hay complementación de la mutación *pi-1* con *PEAM1*. Por lo tanto las proporciones observadas en los recuentos de plantas F<sub>3</sub> son compatibles con la hipótesis de que *PEAM1* complementa la mutación *pi-1* de *Arabidopsis*.

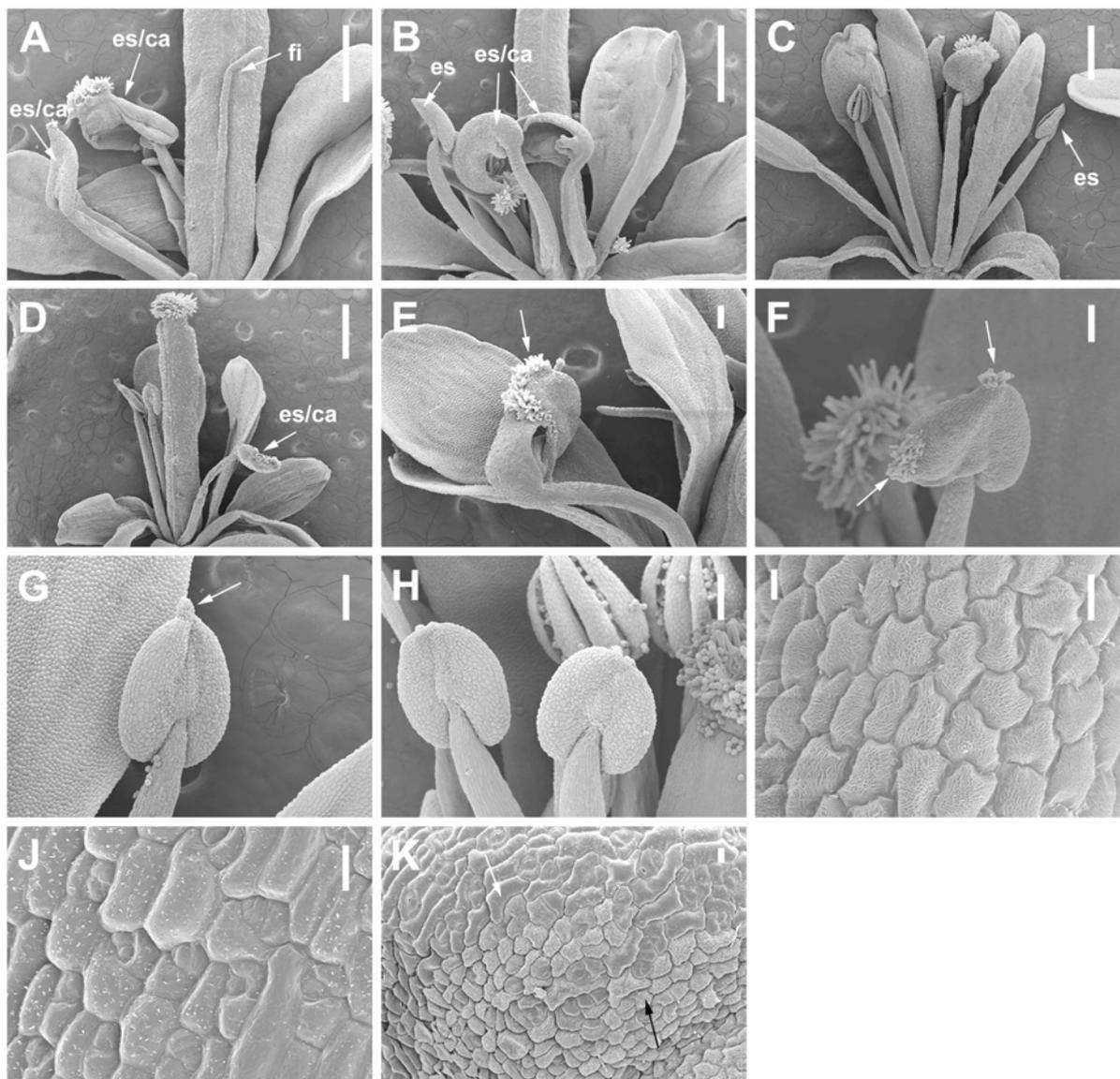
**Figura 34. Fenotipos florales resultantes de la complementación del mutante *pi-1* con el gen *PEAM1* de guisante.** (A) Flor control. (B) Flor de una planta homocigota *pi-1* mostrando dos verticilos de sépalos (se) y un carpelo (ca) anormalmente grande ocupando el centro de la flor; se ha eliminado un sépalo externo para que se vean mejor el resto de órganos. (C) Flor 35S::*PEAM1* con los órganos petaloides en el primer verticilo. (D-I) Flores de plantas 35S::*PEAM1 pi-1* parcialmente complementadas; en todas, los órganos del primer verticilo son petaloides y el verticilo de pétalos (pe) está completamente recuperado en número, tamaño y forma. En algunas flores del panel se ha eliminado algún órgano (sépalo o pétalo) para que se vean mejor el resto de órganos. (D) Flor 35S::*PEAM1 pi-1* donde sólo hay recuperación del verticilo de pétalos (pe). No aparecen órganos en el tercer verticilo. Un carpelo engrosado, similar al del mutante *pi-1*, ocupa el centro de la flor. (E) Flor 35S::*PEAM1 pi-1* en la que el tercer verticilo está ocupado por dos estructuras filamentosas (fi). (F) Flor 35S::*PEAM1 pi-1* en la que en el tercer verticilo se pueden distinguir varios tipos de estructuras: un estambre (es), un carpelo solitario (ca), y un estambre casi normal, que conserva algunas papilas estigmáticas en la región más apical, señalado con un asterisco. (G) En el tercer verticilo de esta flor se pueden distinguir un estambre y dos estambres carpeloide (es/ca). (H) Flor 35S::*PEAM1 pi-1* con recuperación del verticilo de pétalos (pe); en el tercer verticilo se pueden distinguir tres estambres (es) y un filamento (fi) que aparece casi fusionado al carpelo. (I) Flor 35S::*PEAM1 pi-1* en cuyo tercer verticilo se pueden observar cuatro estambres; el asterisco señala un estambre que conserva papilas estigmáticas en la región más apical.



Dentro de la clase fenotípica de las plantas complementadas, el primer verticilo se halla ocupado en todos los casos por unos órganos de naturaleza petaloide similares a los que se forman en las flores 35S::PEAM1 (Figura 34C). El segundo verticilo, se recupera completamente, apareciendo cuatro pétalos de tamaño y forma normal, tal y como sucede en las plantas control (34D-I).

Las diferencias que dan lugar a la gradación de fenotipos florales entre las plantas complementadas vienen determinadas por el número y el tipo de estructuras que se desarrollan en el tercer verticilo. En éste, podemos encontrar estambres prácticamente normales (Figuras 34F-I y 35B-D), estambres carpeloides (Figuras 34G y 35A, B, D y E), filamentos (Figuras 34E y H y 35A), algún carpelo aislado (Figura 34F) o la ausencia aparente de órganos, por estar fusionados al carpelo central (Figura 34D). También se han encontrado diferencias con respecto al tipo de órgano que se desarrolla en el cuarto verticilo. En aquellas líneas donde el grado de complementación es leve, y no se ha recuperado ninguno o casi ninguno de los órganos que forman el tercer verticilo (Figura 34D, E), el cuarto verticilo se halla ocupado por un carpelo anormalmente engrosado y de aspecto similar al del mutante *pi-1*; por el contrario, en las plantas donde la recuperación de órganos en el tercer verticilo es importante (Figura 34F-I), el carpelo que se desarrolla en el cuarto verticilo es de apariencia muy similar al de una planta control.

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se analizaron con más detalle algunas de las estructuras del tercer verticilo de las flores complementadas (Figura 35). Algunos de estos órganos están sólo parcialmente complementados y son, por tanto, órganos mosaico, con características tanto de estambre como de carpelo (Figura 35E) en los se pueden identificar los tipos celulares característicos de los tejidos de cada uno de estos órganos (Figura 35I, J y K). En los bordes de los órganos donde el carácter carpeloide es más acusado, son abundantes las estructuras típicas del tejido carpeloide, como son las papilas estigmáticas (Figura 35E) y su presencia tiende a reducirse considerablemente a medida que aumenta la naturaleza estaminoide de estos órganos (Figura 35F). Algunas estructuras son estambres prácticamente normales y la única diferencia es que la antera suele tener una forma ligeramente más puntiaguda que una antera control (Figura 35, comparar G con el control H).



**Figura 35. Caracterización por SEM de las estructuras del tercer verticilo de las plantas *pi-1* complementadas con *PEAM1*.** (A) Estructuras del tercer verticilo de una flor 35S::*PEAM1 pi-1*, con un nivel de complementación intermedio, en la que se observan dos estambres carpeloideos (*es/ca*) y un filamento (*fi*). (B) Estructuras del tercer verticilo de una flor 35S::*PEAM1 pi-1* con grado de complementación intermedio; se observan dos estambres carpeloideos y dos estambres normales (*es*). (C) Flor 35S::*PEAM1 pi-1*, con complementación fuerte, mostrando cinco estambres rescatados en el tercer verticilo; dos de ellos son prácticamente normales aunque aún conservan algunas papilas estigmáticas. (D) Flor 35S::*PEAM1 pi-1*, de complementación intermedia, mostrando dos estambres normales y uno con características carpeloideas. (E) Órgano mosaico 35S::*PEAM1 pi-1* con características de estambre y de carpelo; la flecha señala papilas estigmáticas en el centro de este órgano. (F) Antera 35S::*PEAM1 pi-1*; las flechas indican algunas papilas estigmáticas en la región apical y en el borde de este órgano. (G) Antera 35S::*PEAM1 pi-1* casi normal; la flecha señala la forma puntiaguda de la región más apical de este órgano. (H) Antera control. (I) Detalle de las células epidérmicas de una antera control. (J) Células epidérmicas de un ovario control. (K) Detalle de la superficie de un órgano mosaico del tercer verticilo de una flor 35S::*PEAM1 pi-1* mostrando dos tipos celulares: de antera (flecha negra) y de ovario (flecha blanca). Las barras verticales representan 500  $\mu\text{m}$  en A, B, C y D; 100  $\mu\text{m}$  en E, F, G y H y 10  $\mu\text{m}$  en I, J y K.

A diferencia del mutante *pi-1*, que es estéril, la mayor parte de las plantas transgénicas complementadas eran fértiles, a excepción, evidentemente, de aquellas donde ningún estambre había sido rescatado. Para comprobar si el fenotipo de complementación se transmitía a la progenie de manera estable, se seleccionaron varias de las líneas transgénicas con diferentes grados de complementación y se sembró su descendencia; el análisis fenotípico de las plantas resultantes confirmó el mismo fenotipo de complementación parcial entre la descendencia.

### 1.3.2. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN *apetala3* DE *Arabidopsis* CON *PEAM1*

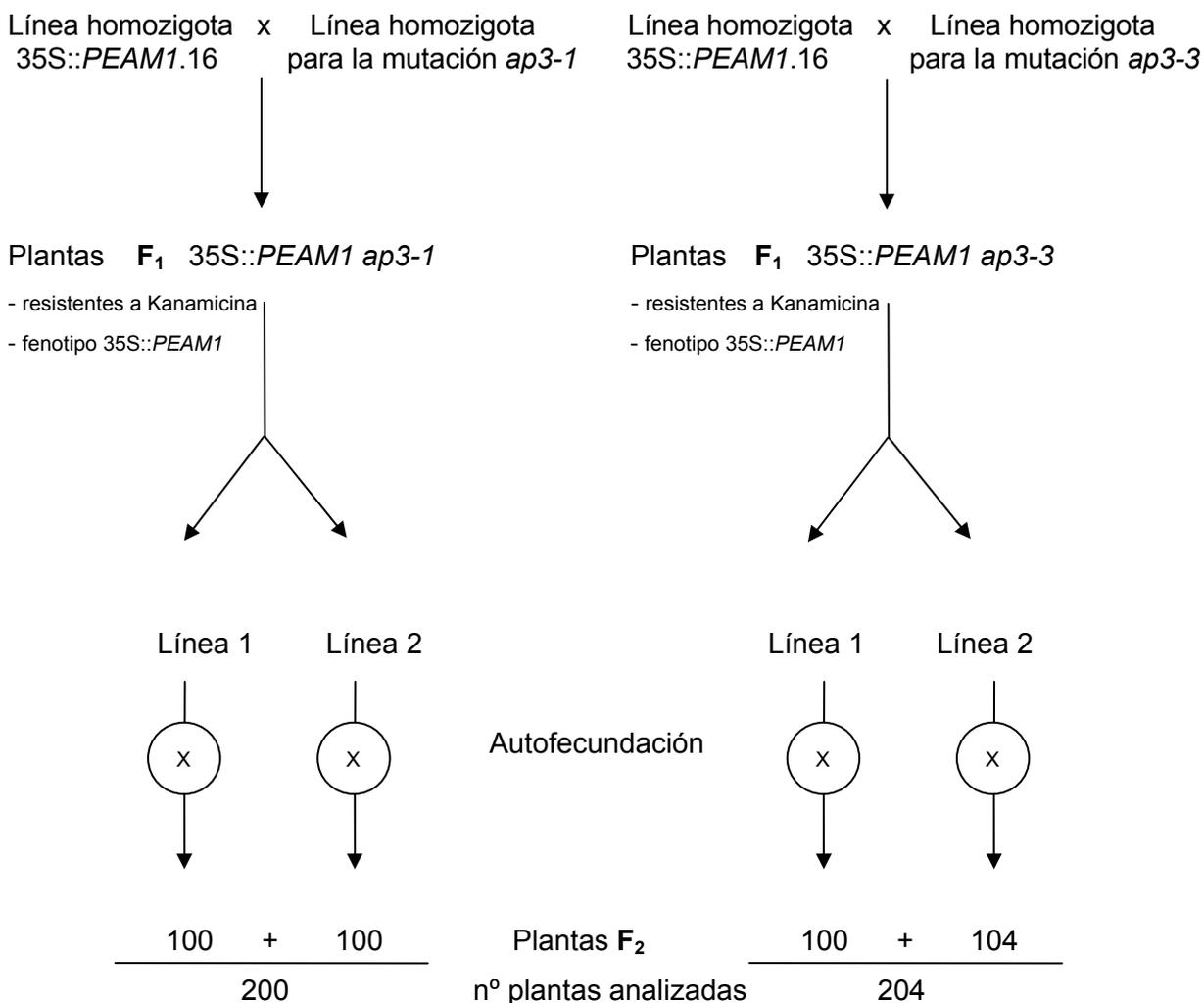
Para comprobar si el gen *PEAM1* de guisante complementa la mutación *pi-1* de *Arabidopsis thaliana* de manera específica, o si por el contrario, también es capaz de suplir al otro gen de identidad de órgano floral de función B de *Arabidopsis*, el gen *APETALA3* (*AP3*), se ensayó la complementación de la mutación *ap3* con el gen *PEAM1*, de la misma forma que se hizo con el mutante *pi-1*.

Las mutaciones recesivas *ap3* originan alteraciones homeóticas en la identidad de los órganos en el segundo y tercer verticilo de la flor de *Arabidopsis* (Bowman *et al.*, 1989; Jack *et al.*, 1992). Las conversiones homeóticas observadas en las flores *ap3* son de pétalo a sépalo y de estambre a órgano carpeloide, transformaciones que se producen en las flores del mutante *pistillata*. Nosotros hemos trabajado con los alelos mutantes *ap3-1* y *ap3-3*. Las flores *ap3-3* son las que presentan un fenotipo más extremo, mostrando, en cualquier condición, transformaciones completas en los dos verticilos. Por el contrario, el fenotipo del alelo más débil, *ap3-1*, depende de la temperatura. En plantas cultivadas a 16°C, las flores *ap3-1* son casi silvestres, excepto en el caso de los pétalos, que son ligeramente sepaloides; sin embargo, a 30°C se producen transformaciones completas tanto en el segundo como en el tercer verticilo. Temperaturas de crecimiento intermedias resultan en fenotipos intermedios. Bajo las condiciones de cultivo usadas en este experimento, los mutantes *ap3-1* y *ap3-3* mostraban idénticas alteraciones fenotípicas.

Se cruzó una planta homocigota de la línea de fenotipo severo 35S::*PEAM1*.16, la misma que se utilizó en la complementación del mutante *pi-1*, con plantas mutantes homocigotas para *ap3-1* ó *ap3-3*. De las semillas F<sub>1</sub> resultantes de cada uno de los dos cruces se sembraron ocho semillas en medio con kanamicina, para comprobar que todas habían heredado el transgén; otras seis semillas de cada cruce se sembraron directamente en tierra y se comprobó que todas las plantas F<sub>1</sub> plantas mostraban alteraciones fenotípicas idénticas a las de las plantas 35S::*PEAM1*.

Para cada uno de los alelos el análisis fenotípico se llevó a cabo sobre la descendencia conjunta de dos de las líneas F<sub>1</sub> 35S::PEAM1.16 *ap3-1* (línea 1 y línea 2) o F<sub>1</sub> 35S::PEAM1.16 *ap3-3* (línea 1 y línea 2). Para el ensayo de complementación de la mutación *ap3-1* se analizaron un total de 200 plantas F<sub>2</sub>, de las cuales 100 provenían de la línea 1 y 100 de la línea 2, y para la complementación de la mutación *ap3-3* se analizaron un total de 204 plantas F<sub>2</sub>, de las cuales 100 provenían de la línea 1 y 104 de la línea 2. La figura 36 muestra un esquema del procedimiento experimental que se siguió en el experimento de complementación de los mutantes *ap3-1* y *ap3-3* con el gen *PEAM1* de guisante.

**Figura 36. Esquema del experimento de complementación de la mutación *ap3* con el gen *PEAM1* de guisante**



## Resultados

Los resultados del análisis fenotípico de las poblaciones F<sub>2</sub> resultantes de los cruces de la línea homocigota 35S::*PEAM1.16* con las plantas homocigotas para *ap3-1* o *ap3-3* se muestran en las tablas 16 y 17, respectivamente. En cada tabla, al igual que en el ensayo de complementación del mutante *pi-1*, se resume el número de individuos correspondiente a las distintas clases fenotípicas observadas entre las plantas F<sub>2</sub> analizadas. De nuevo, para cada clase fenotípica se indica el número de individuos que se esperaría si hubiera complementación de la mutación y si no la hubiera.

**Tabla 16. Análisis fenotípico de las plantas F<sub>2</sub> descendientes del cruce 35S::*PEAM1.16* con *ap3-1*.**

Nº de individuos de cada clase fenotípica

| Fenotipo           | Observados | Esperados              |                           |
|--------------------|------------|------------------------|---------------------------|
|                    |            | Si hay complementación | Si no hay complementación |
| Silvestre          | 35         | 37'5 (3/16)            | 37'5 (3/16)               |
| <i>ap3-1</i>       | 57         | 12'5 (1/16)            | 50 (4/16)                 |
| 35S:: <i>PEAM1</i> | 108        | 112'5 (9/16)           | 112'5 (9/16)              |
| Complementado      | 0          | 37'5 (3/16)            | 0 (0/16)                  |
| Total              | 200        | 200                    | 200                       |

**Tabla 17. Análisis fenotípico de las plantas F<sub>2</sub> descendientes del cruce 35S::*PEAM1.16* con *ap3-3*.**

Nº de individuos de cada clase fenotípica

| Fenotipo           | Observados | Esperados              |                           |
|--------------------|------------|------------------------|---------------------------|
|                    |            | Si hay complementación | Si no hay complementación |
| Silvestre          | 34         | 38'3 (3/16)            | 38'3 (3/16)               |
| <i>ap3-1</i>       | 47         | 12'8 (1/16)            | 51 (4/16)                 |
| 35S:: <i>PEAM1</i> | 123        | 114'8 (9/16)           | 114'8 (9/16)              |
| Complementado      | 0          | 38'3 (3/16)            | 0 (0/16)                  |
| Total              | 204        | 204                    | 204                       |

El análisis fenotípico mostró que, tanto en el ensayo de complementación del alelo *ap3-1* como en el del alelo *ap3-3*, todas las plantas de las correspondientes poblaciones  $F_2$  se podían clasificar únicamente dentro de tres categorías fenotípicas diferentes: plantas de fenotipo silvestre, plantas de fenotipo *ap3* y plantas de fenotipo 35S::*PEAM1*, clases que coinciden con las que se esperaría si no se produjera la complementación de las mutaciones; a diferencia de lo observado en la complementación de la mutación *pi-1*, ninguna de las plantas analizadas mostró un fenotipo intermedio entre el de las flores mutantes *ap3* y el de las flores 35S::*PEAM1*.

Además los resultados de los recuentos para cada uno de los alelos muestran, que para cada una de las categorías fenotípicas establecidas, el número de individuos observados se ajusta bastante al número de individuos que se esperarían si no hubiera complementación. La hipótesis de que hay complementación ( $H_0$ ) se contrastó utilizando el test de la  $\chi^2$ . En este caso, dado que el valor del estadístico muestral  $\chi^2$  en los ensayos de complementación de la mutación *ap3-1* y *ap3-3* es igual a 195'60 y 129'15, respectivamente, y que en ambos casos este valor es mayor que 7'81 (para un  $\alpha = 0'05$ ), se rechaza la hipótesis nula de que hay complementación de las mutaciones *ap3* con *PEAM1*. Por lo tanto las proporciones observadas en los recuentos de las plantas  $F_2$  son compatibles con la hipótesis de que *PEAM1* no complementa las mutaciones *ap3-1* y *ap3-3* de *Arabidopsis*.

Para comprobar si entre las plantas  $F_2$  que presentaban fenotipo *ap3-3* algunas portaban el T-DNA, mostrando a pesar de ello el fenotipo mutante, se seleccionaron al azar 20 de las 47 plantas con fenotipo *ap3-3* y se cruzaron con plantas de la línea silvestre; las semillas de cada uno de los cruces se sembraron en placas de medio de selección con kanamicina y se contabilizaron las plantas resistentes y sensibles a kanamicina para cada uno de los cruces. Se comprobó que, efectivamente, parte de las plantas de fenotipo *ap3-3* contenían el transgén, lo que muestra que el gen *PEAM1* no es capaz de suplir la función del gen *APETALA3*.



## 2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM4* MEDIANTE SU EXPRESIÓN CONSTITUTIVA EN SISTEMAS TRANSGÉNICOS HETERÓLOGOS

Estudios previos a este trabajo, llevados a cabo en nuestro laboratorio (Ferrándiz, 1996) mostraron que *PEAM4* (*Pea MADS 4*) es un gen MADS-box de guisante que codifica un polipéptido altamente homólogo a los codificados por genes pertenecientes a la subfamilia SQUA (Theißen *et al.*, 2000). Entre la subfamilia SQUA, *PEAM4* se agrupa junto con *SQUA*, de *Antirrhinum* o *AP1* y *CAL*, de *Arabidopsis*. El RNA de *PEAM4* no se detecta en órganos vegetativos encontrándose sólo en yemas florales y en flores maduras, donde su expresión queda restringida a sépalos y pétalos (Ferrándiz, 1996). El análisis de la expresión espacial de este gen durante el desarrollo de la flor de guisante, mediante hibridación de mRNA *in situ* (Navarro, 2001), mostró que *PEAM4* comienza a expresarse en el meristemo floral desde estadios muy tempranos de su desarrollo, tan pronto como el primordio floral se inicia desde el meristemo inflorescente secundario; poco después la señal desaparece de la región central del meristemo floral y la expresión del gen se detecta en los primordios de los sépalos y en una región discreta del primordio común que dará lugar a los primordios de los pétalos; finalmente, la expresión de *PEAM4* permanece restringida a sépalos, pétalos, receptáculo floral y pedicelo. Un patrón similar de expresión se ha descrito para *AP1* y *SQUA* (Huijser *et al.*, 1992; Mandel *et al.*, 1992b).

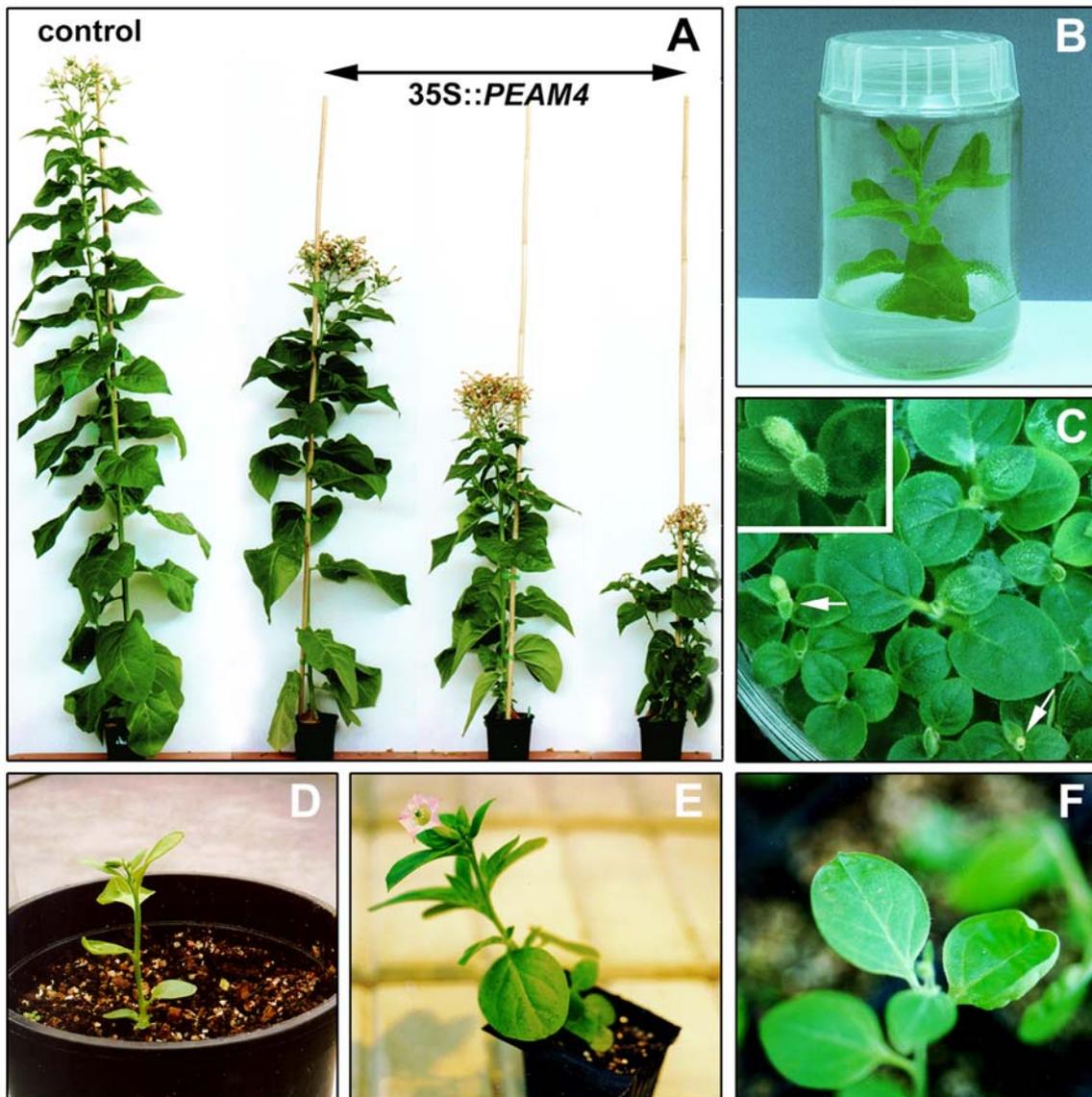
Por tanto, los datos de homología de secuencia y de patrón de expresión sugieren una posible homología funcional entre el gen MADS-box de guisante *PEAM4* y los genes *AP1* y *SQUA*, de *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, respectivamente, implicados en la especificación de los meristemos florales. Para testar esta hipótesis, en este trabajo hemos usado la expresión de *PEAM4* en sistemas transgénicos heterólogos (tabaco y *Arabidopsis*) como herramienta para el estudio de su funcionalidad.

Para ello, un cDNA de 1130 pb que contiene toda la región codificante de *PEAM4* se clonó como una fusión transcripcional al promotor 2x35S CaMV (Benfey *et al.*, 1990) en orientación sentido y antisentido en el vector binario de expresión en plantas pBinJIT60.

## 2.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM4* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Nicotiana tabacum*

### 2.1.1. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE *Nicotiana tabacum* CON UNA CONSTRUCCIÓN SENTIDO 35S::*PEAM4*

Como resultado de la transformación de tabaco con la construcción sentido 35S::*PEAM4*, se generaron 18 brotes transgénicos primarios ( $T_1$ ) independientes; se observó que, una vez transferidas a maceta, nueve de estas plantas florecían tempranamente cuando se comparaban con las plantas control que habían sido transformadas, en paralelo, con el vector sin inserto (Figura 37A); el resto de plantas no mostró diferencias con respecto al fenotipo de las plantas control. Además, se observó que seis de las nueve líneas que mostraron floración temprana en maceta también florecieron *in vitro* (Figura 37B).



Con el fin de determinar el número de *loci* en el que se había producido la inserción del T-DNA se llevó a cabo un análisis de segregación de varias de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T<sub>2</sub> en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y transgénicas. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de tabaco T<sub>2</sub> 35S::PEAM4.**

| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |     |       | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|-----|-------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | +                 | -   |       |              |                 |                |                            |           |
|         |                                     | (R)               | (S) |       |              |                 |                |                            |           |
| T-3*    | 39                                  | 39                | 0   |       |              |                 |                | ≥2                         |           |
| T-4*    | 43                                  | 35                | 8   | 0'7/4 | 3:1          | 1'140           | 0'29           | 1                          |           |
| T-5*    | 40                                  | 30                | 10  | 1'0/4 | 3:1          | 0'033           | 0'86           | 1                          |           |
| T-7     | 42                                  | 31                | 11  | 1'1/4 | 3:1          | 0'032           | 0'86           | 1                          |           |
| T-16    | 40                                  | 30                | 10  | 1'0/4 | 3:1          | 0'033           | 0'86           | 1                          |           |
| T-17    | 41                                  | 28                | 13  | 1'3/4 | 3:1          | 0'837           | 0'36           | 1                          |           |
| T-18*   | 40                                  | 32                | 8   | 0'8/4 | 3:1          | 0'700           | 0'40           | 1                          |           |
| T-19*   | 40                                  | 28                | 12  | 1'2/4 | 3:1          | 0'433           | 0'51           | 1                          |           |
| T-20*   | 40                                  | 29                | 11  | 1'1/4 | 3:1          | 0'100           | 0'75           | 1                          |           |
| T-24    | 40                                  | 35                | 5   | 0'5/4 | 3:1          | 3'700           | 0'05           | 1                          |           |
| T-26*   | 39                                  | 27                | 12  | 1'2/4 | 3:1          | 0'573           | 0'45           | 1                          |           |
| T-33*   | 40                                  | 40                | 0   |       |              |                 |                | ≥2                         |           |
| T-34    | 43                                  | 36                | 7   | 0'7/4 | 3:1          | 2'008           | 0'16           | 1                          |           |
| T-35    | 42                                  | 35                | 7   | 0'7/4 | 3:1          | 1'810           | 0'18           | 1                          |           |
| T-48*   | 39                                  | 28                | 11  | 1'1/4 | 3:1          | 0'162           | 0'69           | 1                          |           |
| Control | 41                                  | 0                 | 41  |       |              |                 |                | 0                          |           |

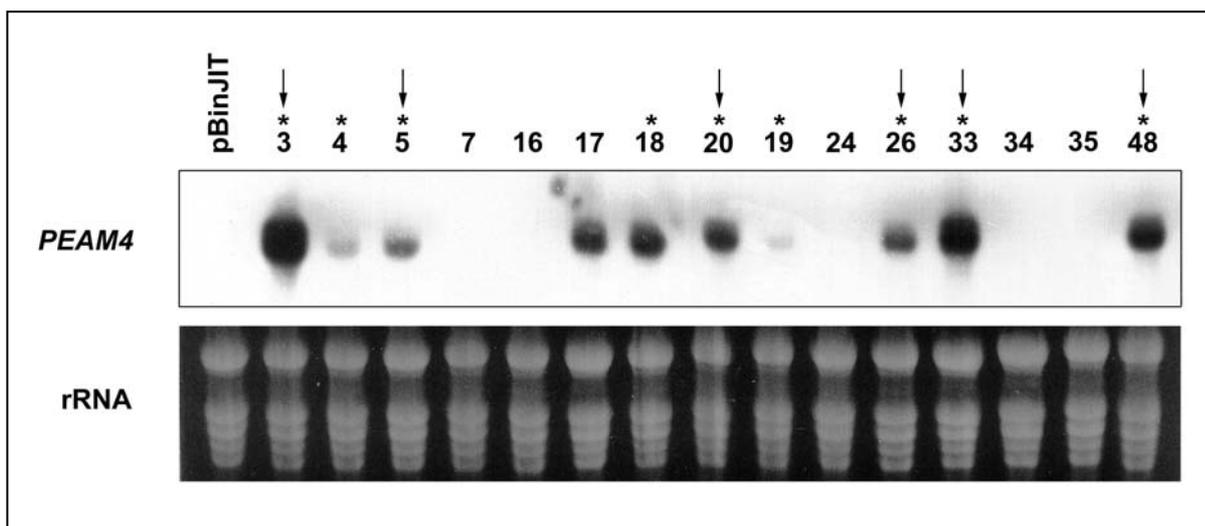
El asterisco señala las líneas que mostraban alteraciones fenotípicas.

**Figura 37. Fenotipo de las plantas transgénicas 35S::PEAM4 de *Nicotiana tabacum*.** (A) Plantas control (izquierda) y transgénicas de tres líneas diferentes 35S::PEAM4 con floración temprana (de izquierda a derecha se muestran las líneas T-5, T-26 y T-18). (B) Brote transgénico T<sub>1</sub> de la línea 35S::PEAM4.18 que ha florecido en cultivo *in vitro*. (C) Plántulas T<sub>2</sub> de 15 días de edad crecidas en cultivo *in vitro* de la línea 35S::PEAM4.3, con inserción múltiple del T-DNA, exhibiendo un fenotipo extremo de floración temprana. Algunas flores están señaladas por flechas. (D) Planta T<sub>2</sub> de la línea 35S::PEAM4.3, a la semana de ser transferida a tierra desde medio de selección *in vitro*. (E) Planta T<sub>2</sub> de la línea 35S::PEAM4.33, con inserción múltiple del T-DNA, que floreció a los 10 días de ser transferida desde una caja de medio de selección a maceta y tras producir sólo unas pocas hojas. (F) Detalle de una hoja vegetativa joven de la línea 35S::PEAM4.3 parcialmente curvada hacia el haz.

## Resultados

En todas las líneas transgénicas, excepto en la T-3 y la T-33, la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1 (resistentes:sensibles), que se corresponde con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. En las dos líneas mencionadas, la segregación obtenida indica la inserción del transgén en dos o más *loci*.

El nivel de expresión del transgén *PEAM4* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 38.



**Figura 38. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM4* en plantas de *Nicotiana tabacum* control y transformadas con la construcción 35S::*PEAM4*.** Línea control (pBinJIT) transformada con el vector sin inserto; líneas transgénicas 35S::*PEAM4* (T-3 a T-48). En cada uno de los pocillos se cargó 10 µg de RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación, se utilizó como sonda un fragmento *Xba*I de (767 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM4*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. El asterisco señala aquellas líneas en las que la correspondiente planta T<sub>1</sub> mostró adelanto de floración. Las flechas señalan las líneas que florecieron en cultivo *in vitro*.

El análisis Northern mostró que la expresión del transgén *PEAM4* varía entre las distintas líneas transgénicas 35S::*PEAM4*. Se observaron niveles muy altos de expresión en las líneas transgénicas T-3, T-33 y T-48, intermedios en las líneas T-4, T-5, T-17, T-18, T-20 y T-26 y bajos de expresión en la línea T-19. En el resto de las líneas, así como en la control no se detectó expresión de *PEAM4*.

El análisis reveló que el gen *PEAM4* se expresa constitutivamente en todas las líneas transgénicas 35S::*PEAM4* que presentan alteraciones fenotípicas. En general, se ha observado que existe una correlación entre el nivel de expresión del transgén y la presencia de fenotipo alterado, en la medida en que las líneas que mostraban el fenotipo de adelanto de floración más evidente, solían ser las que mostraban un nivel más elevado de expresión del transgén; además, las líneas en las que no se detectó expresión del transgén no mostraron alteraciones fenotípicas.

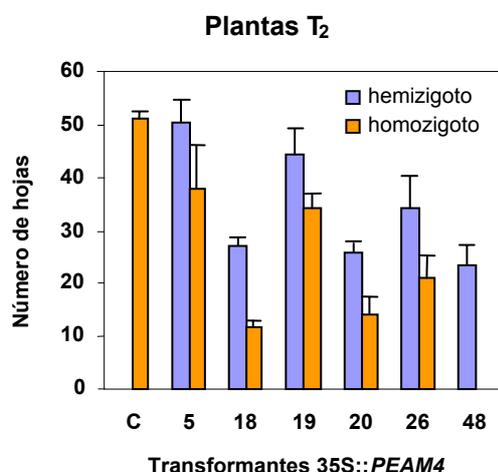
### 2.1.1.1. Caracterización del fenotipo de adelanto de floración de las líneas transgénicas de tabaco 35S::PEAM4

Como se ha mencionado anteriormente, se observó que una fracción de las líneas transgénicas primarias 35S::PEAM4 mostraban adelanto de floración con respecto a las plantas control transformadas con el vector sin inserto. Se llevó a cabo una caracterización fenotípica de seis de las líneas 35S::PEAM4 seleccionadas por mostrar floración temprana en la T<sub>1</sub> en maceta, floración en cultivo *in vitro* y por contener un transgén que segregaba como un único *locus*; en todas ellas se había detectado además expresión de PEAM4 mediante análisis Northern.

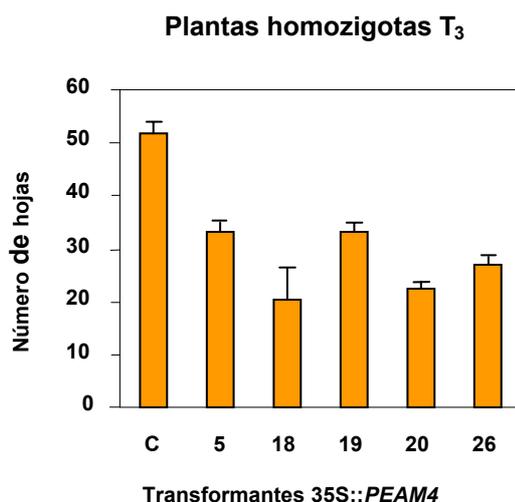
Para analizar el efecto de la expresión constitutiva de PEAM4 sobre el tiempo de floración en las distintas líneas transgénicas 35S::PEAM4 se contabilizó, como medida del tiempo de floración, el número total de hojas producido por el tallo principal antes de la formación de la flor terminal, en plantas T<sub>2</sub> de la línea control (pBinJIT) y de seis líneas transgénicas adelantadas. De cada una de las plantas analizadas se recogió semillas que se utilizaron para determinar el genotipo correspondiente a cada planta. Los resultados de los conteos en las plantas T<sub>2</sub> de las distintas líneas 35S::PEAM4 se muestran en la figura 39A; los valores representados se corresponden con la media del número total de hojas,  $\pm$  la desviación estándar, calculada a partir de muestras de ocho a once plantas hemizigotas o de tres a cinco plantas homocigotas de cada línea transgénica.

Para cada una de las líneas transgénicas 35S::PEAM4 estudiadas, se observó que en la población T<sub>2</sub> las plantas homocigotas para el transgén florecían tras producir un menor número de hojas que las correspondientes plantas hemizigotas, si bien la relación entre el número de hojas observado entre estas dos categorías genotípicas variaba entre las distintas líneas transgénicas 35S::PEAM4. Además, se observó también que en todas las líneas, excepto en la 35S::PEAM4.5, donde las plantas hemizigotas no parecían mostrar diferencias con respecto a las plantas control, el número de hojas producido, tanto por las plantas hemizigotas como homocigotas, fue menor al producido por las plantas control cultivadas bajo las mismas condiciones. La línea 35S::PEAM4.48 constituye un caso especial y su fenotipo se describirá con más detalle en páginas posteriores; en la figura 39A se representa únicamente el resultado de los conteos realizados sobre la fracción de plantas hemizigotas de esta línea que florecieron sin mostrar alteraciones en su arquitectura. Como se puede observar, este conjunto de plantas hemizigotas exhibía el fenotipo más severo de adelanto de la floración entre las plantas hemizigotas correspondientes a las diferentes líneas 35S::PEAM4 analizadas.

A



B



**Figura 39. Análisis cuantitativo del efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* en el tiempo de floración de *Nicotiana tabacum*. (A) Número de hojas de plantas T<sub>2</sub> de varias líneas 35S::PEAM4. (B) Número de hojas de plantas homocigotas T<sub>3</sub> de varias líneas 35S::PEAM4.**

Para testar si el fenotipo de adelanto de floración observado en las plantas de la población T<sub>2</sub> de las distintas 35S::PEAM4 se mantenía también en la siguiente generación, se determinó el tiempo de floración sobre la descendencia de una planta homocigota de cada una de las líneas 35S::PEAM4. Para ello, 12 semillas procedentes de plantas homocigotas T<sub>2</sub> se sembraron en cajas de medio con kanamicina y al cabo de 20 días se pasaron a macetas en invernadero donde se llevaron a cabo los conteos de número de hojas. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 39B. La gráfica muestra cómo el fenotipo de adelanto de floración se mantuvo estable en la generación T<sub>3</sub> en todas

las líneas analizadas. No obstante, las líneas que mostraron los fenotipos más severos en la  $T_2$  (35S::*PEAM4*.18, 20 y 26), mostraron en la  $T_3$  un menor adelanto en el tiempo de floración que en la generación anterior, mientras que el resto de líneas no mostraron diferencias significativas de una generación a otra.

En todas las líneas 35S::*PEAM4* analizadas el parámetro de número de hojas del tallo principal se correlacionaba con el tiempo de floración medido como el número de días desde la siembra en cajas de medio de selección hasta que el primer botón floral fue visible en la inflorescencia principal. Esta medida oscilaba entre valores de 47-54 días entre las distintas líneas transgénicas 35S::*PEAM4* y de aproximadamente 68-73 días para la línea control.

#### **2.1.1.2. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* en la arquitectura de la inflorescencia de tabaco**

El tabaco, como otras solanáceas exhibe inflorescencias determinadas compuestas por cimpos escorpiodes (Weberling, 1989). Esta arquitectura de inflorescencia es muy diferente a la de guisante y a la de *Arabidopsis*. Mientras que guisante y *Arabidopsis* tienen inflorescencias indeterminadas, racimos, la inflorescencia de tabaco es determinada y en ella el meristemo apical del tallo (SAM) se diferencia dando lugar a una flor terminal, que es la primera flor que se produce (Figura 40A). Una vez esta flor terminal se ha formado, varios meristemos axilares, normalmente tres, sostenidos por brácteas, generan tallos contraídos y ramificados que hemos denominado 1<sup>o</sup>la, 1<sup>o</sup>lb y 1<sup>o</sup>lc en los que las flores se producen siguiendo un patrón cimoso. Cada rama inflorescente se desarrolla con el mismo patrón cimoso y ramificado, de manera que en cada nudo se desarrolla una flor en posición perpendicular a la correspondiente bráctea. De la axila de la bráctea, el tallo inflorescente desarrolla por repetición una inflorescencia de 2<sup>o</sup> orden con el mismo patrón cimoso ramificado, pero siempre alternando la orientación de la unidad fitomérica, aunque la mayoría de los meristemos axilares de las brácteas permanecen en dormición y sólo algunos desarrollan inflorescencias secundarias.

Simultáneamente con el desarrollo de la inflorescencia principal, tres o cuatro inflorescencias adicionales se desarrollan como paraclades desde las axilas de las hojas superiores, posiciones II, III, IV y V (Figura 40A).

En las axilas de las hojas inferiores en el tallo principal, se desarrollan tallos secundarios que, como el principal, pasan a través de una fase vegetativa antes de determinarse en una flor terminal (Figura 40A). Las hojas (Figura 43A) producidas por el tallo principal de la planta de tabaco durante la fase vegetativa van reduciendo su talla de forma acropétala, aunque son de mayor tamaño, tanto en anchura como en longitud, que las brácteas que se

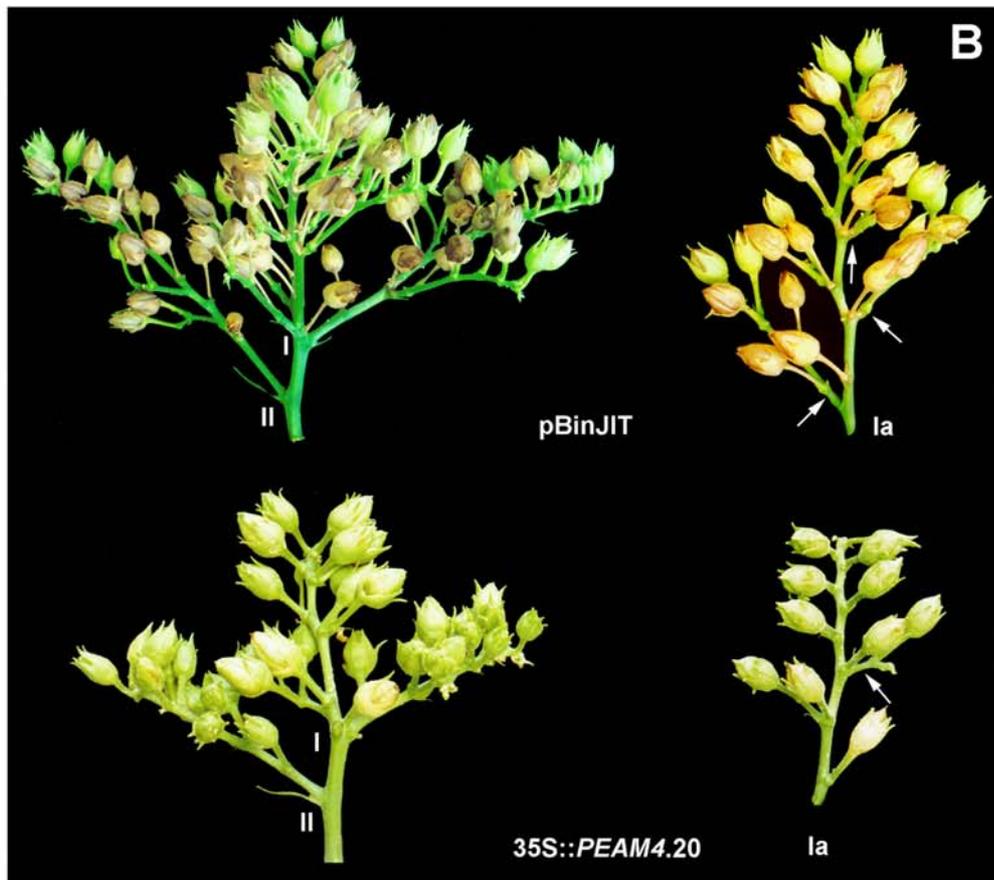
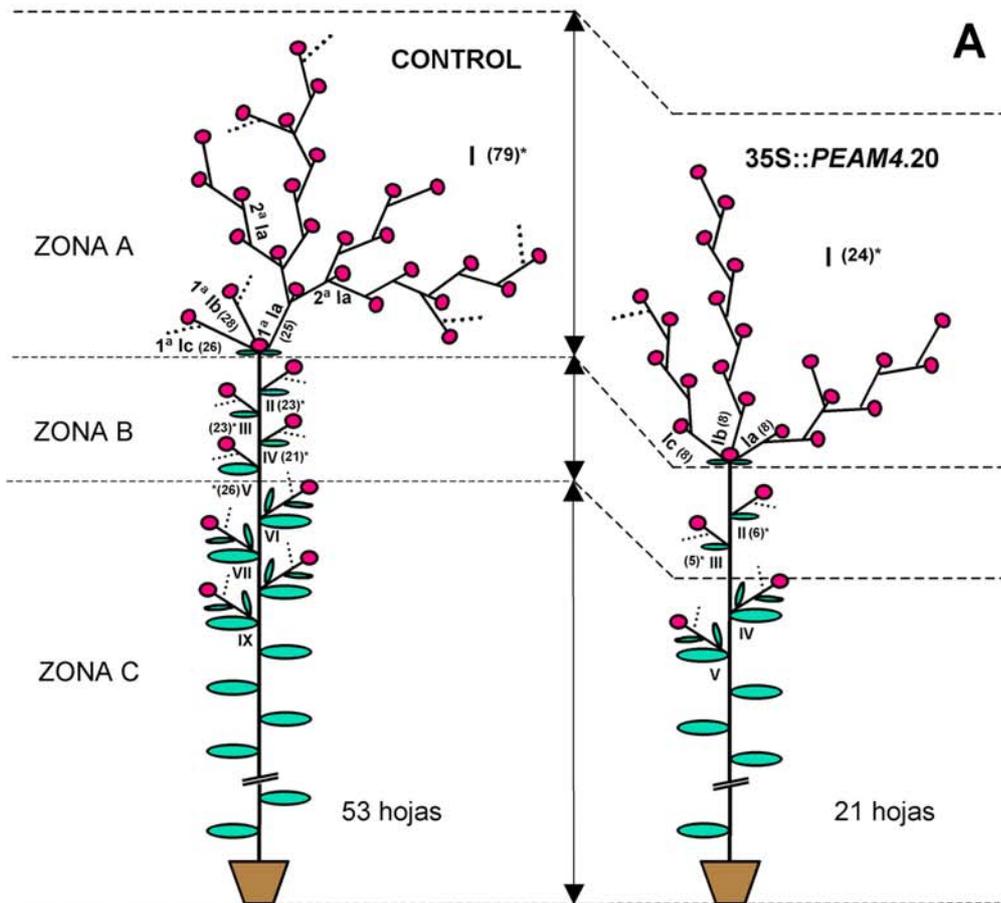
producen durante la fase reproductiva; estas brácteas tienen forma lanceolada y se van estrechando conforme avanzamos hacia la posición que ocupa la estructura apical, (Figuras 40A y 43B).

En la figura 40A se muestra una representación esquemática comparativa de la estructura inflorescente principal de una planta control de tabaco (izquierda) y de una planta de la línea 35S::PEAM4.20 (derecha); la mayor parte de los resultados que se describen a continuación hacen referencia al esquema mostrado en esta figura.

---

**Figura 40. Efecto de la expresión constitutiva de PEAM4 sobre la arquitectura de la inflorescencia de tabaco. (A)** Estructura de la inflorescencia principal de una planta control (izquierda) y de una planta de la línea 35S::PEAM4.20; los números romanos refieren las posiciones de los nudos con respecto al tallo principal. La posición I es la que ocupa la estructura apical, e incluye la flor terminal diferenciada por el SAM y varios tallos axilares cuyos meristemas producen flores siguiendo un patrón cimoso; normalmente la estructura apical esta formada por tres inflorescencias ramificadas que se desarrollan en las axilas de la flor terminal y que se han denominado 1<sup>o</sup>la, 1<sup>o</sup>lb y 1<sup>o</sup>lc, cada una de las cuales se desarrolla en la axila de una bráctea (tipo c; Figura 43B) que se halla situada al mismo nivel que la flor terminal y que las otras dos brácteas; las inflorescencias de segundo orden están indicadas sobre la inflorescencia 1<sup>o</sup>la como 2<sup>o</sup>la; II-V definen aquellas posiciones ocupadas por brácteas, separadas por entrenudos de mayor longitud que las de la estructura apical y en cuyas axilas se desarrollan inflorescencias cuyo patrón de crecimiento es similar al de las que componen la estructura apical. La bráctea que ocupa la posición V es la que se halla más alejada del ápice determinado principal. Las posiciones inferiores están ocupadas por hojas en cuyas axilas se desarrollan tallos secundarios que, como el tallo principal, pasan por una fase vegetativa antes de determinarse en una flor terminal. Las líneas discontinuas definen tres zonas en la planta de tabaco: la zona A (posición I) donde se sitúa la estructura apical, la zona B (posiciones II-IV) donde se encuentran las brácteas que sostienen tallos inflorescentes desarrollados como paraclades en las axilas de las hojas superiores y la zona C (VI hasta 1<sup>o</sup> hoja formada después de los cotiledones) ocupada por hojas vegetativas. Junto a algunas de las posiciones se indica, entre paréntesis, el número de flores contabilizados para cada una de las inflorescencias desarrolladas en ese nudo; esos números se corresponden con los valores marcados con un asterisco en la tabla 19.

**(B)** Ramificación de las inflorescencias en una planta control y en la línea 35S::PEAM4.20. La parte superior corresponde a la planta control y se muestra, a la izquierda, la estructura apical (posición I) y la estructura inflorescente desarrollada como paraclade en la posición II; a la derecha se muestra un detalle de uno de los tallos axilares ramificados de esta estructura apical (1<sup>o</sup>la). La parte inferior corresponde a la línea 35S::PEAM4.20 y se muestra a la izquierda, la estructura apical (posición I) y la estructura inflorescente desarrollada como paraclade en la posición II; a la derecha se muestra un detalle de uno de los tallos axilares de esta estructura apical (1<sup>o</sup>la).



## Resultados

Cuando se realizaron los conteos del número total de hojas en las plantas 35S::*PEAM4*, se incluyeron tanto las hojas vegetativas como las brácteas producidas por cada una de ellas. Para determinar si la reducción en el número de hojas que se observó cuando se compararon con las plantas control era reflejo de una reducción en la producción de ambos tipos de hojas, o si por el contrario solamente se veía afectada la producción de una de ellas, se seleccionó una planta homocigota representativa de cada una de las líneas 35S::*PEAM4* con floración temprana y se contabilizó en cada una de ellas el número de brácteas; al mismo tiempo se comparó la apariencia de cada una de estas brácteas con la de las que se desarrollan en una planta control. Este mismo conteo se llevó a cabo en tres plantas control. Por otra parte, se contabilizó también el número total de flores producidas en la estructura apical (posición I) y en las distintas estructuras florales que se hallen sostenidas por brácteas (II-V).

Los resultados de los conteos del número de brácteas y del número de flores en varias plantas control y transgénicas 35S::*PEAM4* se resumen en la tabla 19; cada uno de los valores mostrados equivale al número de flores contabilizados en las estructuras axilares que se desarrollan en cada una de las posiciones señaladas en números romanos en la figura 40A. La presencia de un guión significa que en esa planta el tipo de bráctea correspondiente a esa posición en una planta control no existe. Así pues, por ejemplo la planta de la línea 35S::*PEAM4*.20 sólo tiene 2 brácteas, las dos son de tipo c; y el aspecto de este tipo de bráctea se muestra en la figura 43B. En la última fila se muestra el número total de hojas para cada una de las líneas analizadas.

**Tabla 19. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* en la producción y tipo de brácteas y sobre la producción de flores en tabaco.**

|              | Control 1 | Control 2 | Control 3 | Líneas 35S:: <i>PEAM4</i> |    |    |     |    |    |
|--------------|-----------|-----------|-----------|---------------------------|----|----|-----|----|----|
|              |           |           |           | 3                         | 5  | 18 | 20  | 26 | 33 |
| I            | 79*       | 76        | 72        | 19                        | 64 | 28 | 24* | 66 | 36 |
| II (tipo c)  | 23*       | 26        | -         | -                         | 16 | -  | 6*  | 17 | 8  |
| III (tipo c) | 23*       | 29        | 31        | 7                         | 20 | 12 | 5*  | 20 | 9  |
| IV (tipo b)  | 21*       | 27        | 34        | -                         | 20 | 6  | -   | 19 | 8  |
| V (tipo a)   | 26*       | 33        | 30        | -                         | -  | -  | -   | -  | -  |
| nºhojas      | 53        | 54        | 51        | 8                         | 36 | 13 | 21  | 22 | 16 |

I, II, III, IV, V: posiciones del tallo principal ocupadas por brácteas en cuyas axilas se desarrollan estructuras florales de patrón de crecimiento similar al de la estructura apical (en posición I).

Tipo a, b y c: tipo de bráctea que ocupa esa posición en la planta silvestre (ver figura 43B).

nº hojas: número total de hojas en el tallo principal de cada planta.

En general se observó que existía entre las líneas transgénicas 35S::*PEAM4* una tendencia a producir un menor número de brácteas que las plantas control crecidas bajo las mismas condiciones. Mientras que en estas últimas el número de brácteas producido oscilaba entre tres y cuatro, las líneas transgénicas 35S::*PEAM4* producían desde una, en las líneas más adelantadas, a tres brácteas, en el resto. También se observó que entre las plantas 35S::*PEAM4* ciertos tipos de brácteas eran más frecuentes que los otros. Así, las brácteas de tipo a, que en los controles ocupaban las posiciones más alejadas de la estructura apical (posición V en la figura del esquema 40A) y que son las de mayor anchura y longitud (Figura 43B), no se produjeron en ninguna de las líneas transgénicas analizadas. En las transgénicas se observó una tendencia a producir con más frecuencia las brácteas de menor tamaño, las de tipo b y c (Figura 43B), que son las que ocupan las posiciones más apicales en las plantas control.

Aparte de la reducción observada en la producción de brácteas para las distintas líneas 35S::*PEAM4*, también se observó una reducción importante en la producción de flores en estas plantas, como se puede observar en los resultados mostrados en la tabla 19. La reducción afectaba no solo a la producción de flores en la estructura apical sino también en las estructuras inflorescentes desarrolladas en los nudos inferiores. Esta reducción, particularmente drástica en las líneas 35S::*PEAM4.3* y 35S::*PEAM4.20* parece deberse no a un agotamiento fisiológico de las plantas, causado por el adelanto de floración y/o a su menor envergadura, en comparación con las plantas control, sino a una menor complejidad en la ramificación de las estructuras inflorescentes. Mientras que en los controles se desarrollan del orden de tres o cuatro inflorescencias secundarias por inflorescencia primaria (1ºIa, 1ºIb y 1ºIc), en las plantas 35S::*PEAM4* con frecuencia sólo se desarrollan una o dos inflorescencias secundarias en las que se producen un menor número de flores que en las equivalentes en las plantas control (Figura 40B).

### **2.1.1.3. Fenotipo de las líneas de tabaco con 35S::*PEAM4* insertado en más de un *loci***

Las líneas transgénicas primarias 35S::*PEAM4.3* y 35S::*PEAM4.33*, en las que el T-DNA se había insertado en más de un *loci*, mostraron un fenotipo de adelanto de floración más acentuado que el resto de líneas transgénicas 35S::*PEAM4*. Aunque estas líneas transgénicas no han sido estudiadas con detalle, se observó que en su progenie T<sub>2</sub> se encontraban plantas que exhibían un fenotipo extremo de floración temprana. En el caso de la línea T-3 llegó incluso a observarse floración en plantas cultivadas *in vitro* en cajas de medio de selección con kanamicina a los 15 días desde su siembra, tras producir solamente 4-5 hojas (Figura 37C), o bien a los pocos días de ser transplantadas a maceta (Figura

37D). Las plantas de esta misma línea que mostraron fenotipos más leves florecieron en maceta después de producir aproximadamente de 10-13 hojas. Además, en una pequeña fracción de las plantas de esta línea de fenotipo extremo se observó que algunas de las hojas vegetativas se curvaban hacia el haz, tanto desde los márgenes laterales de las hojas como desde la región más distal de estos órganos (Figura 37F), un fenotipo que también era evidente entre las plantas que florecieron *in vitro* en las cajas de medio de selección. En la línea T-33, el adelanto de floración no fue tan acentuado como el observado para la línea T-3, no obstante, los conteos del número total de hojas realizados en quince plantas resistentes a kanamicina de la progenie T<sub>2</sub> de esta línea, mostraron que éstas florecían tempranamente, tras producir entre 10-16 hojas, mientras que las plantas control de la misma edad continuaban en fase vegetativa (Figura 37E).

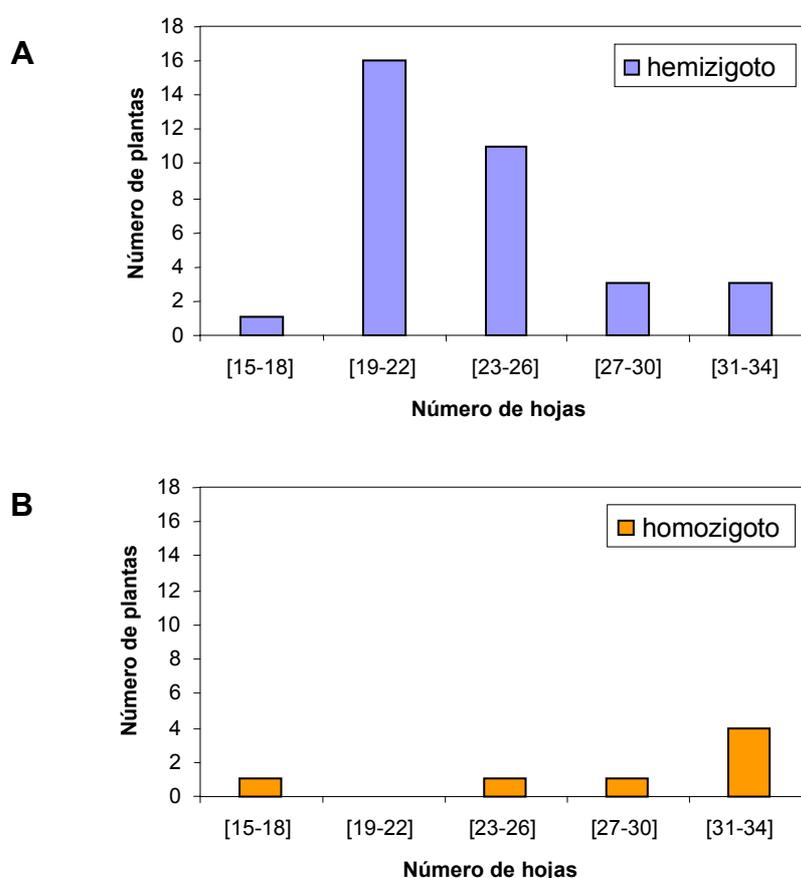
Aparte del fenotipo de adelanto del tiempo de floración, la reducción en la ramificación de las estructuras inflorescentes y la curvatura ocasional observada de las hojas vegetativas más jóvenes, en general, las líneas transgénicas 35S::*PEAM4* analizadas en este trabajo, con la excepción de la línea T-48, no exhibieron otras alteraciones que afectaran a la arquitectura de la planta, ni a la morfología o al número de los órganos florales.

### **2.1.1.4. Inhibición de la floración en tabaco por la expresión constitutiva de *PEAM4***

Como se ha mencionado anteriormente la línea 35S::*PEAM4.48* representa un caso especial. En la generación T<sub>1</sub> esta línea no mostró diferencias con respecto al fenotipo alterado exhibido por el resto de líneas 35S::*PEAM4* que se ha descrito arriba. Sin embargo, cuando se analizó la descendencia de esta línea, entre las plantas de la población T<sub>2</sub> se observó una gran heterogeneidad de fenotipos, encontrándose desde plantas que florecían muy tempranamente, con solo 15 hojas, a otras que parecían tener inhibida la floración y que continuaban produciendo hojas mucho después de que los controles hubieran florecido, mostrando a su vez importantes alteraciones en su arquitectura, como se explica con detalle a continuación.

El resultado de los conteos realizados en las plantas T<sub>2</sub> resistentes a kanamicina de la línea 35S::*PEAM4.48* se muestra en la figura 41, donde las gráficas A y B muestran, respectivamente, la distribución de plantas hemizigotas y homocigotas para el transgén de la población T<sub>2</sub> de la línea 35S::*PEAM4.48* en función del número total de hojas producido. Como se puede observar, la mayor parte de las plantas hemizigotas floreció tras producir entre 19-26 hojas, mientras que la mayoría de las plantas de la población homocigota floreció tras producir entre 31-34 hojas (si bien el número de plantas homocigotas analizado es bastante inferior al analizado para las población hemizigota). Estos resultados muestran

que, aunque en ambas poblaciones el rango del número total de hojas con que florecen las plantas es muy amplio, oscilando entre 15 y 34 hojas, existía en general entre las plantas la población hemizigota, una tendencia a florecer con un número de hojas menor que las correspondientes plantas homocigotas; esta situación es opuesta a lo observado en las otras líneas 35S::*PEAM4* con floración temprana, en las plantas homocigotas cada una de las líneas analizadas florecían tras producir un número de hojas menor que las plantas hemizigotas (Figura 39A). No obstante, tanto las plantas hemizigotas como las homocigotas de la población T<sub>2</sub> de la línea 35S::*PEAM4.48* florecieron antes que los controles.



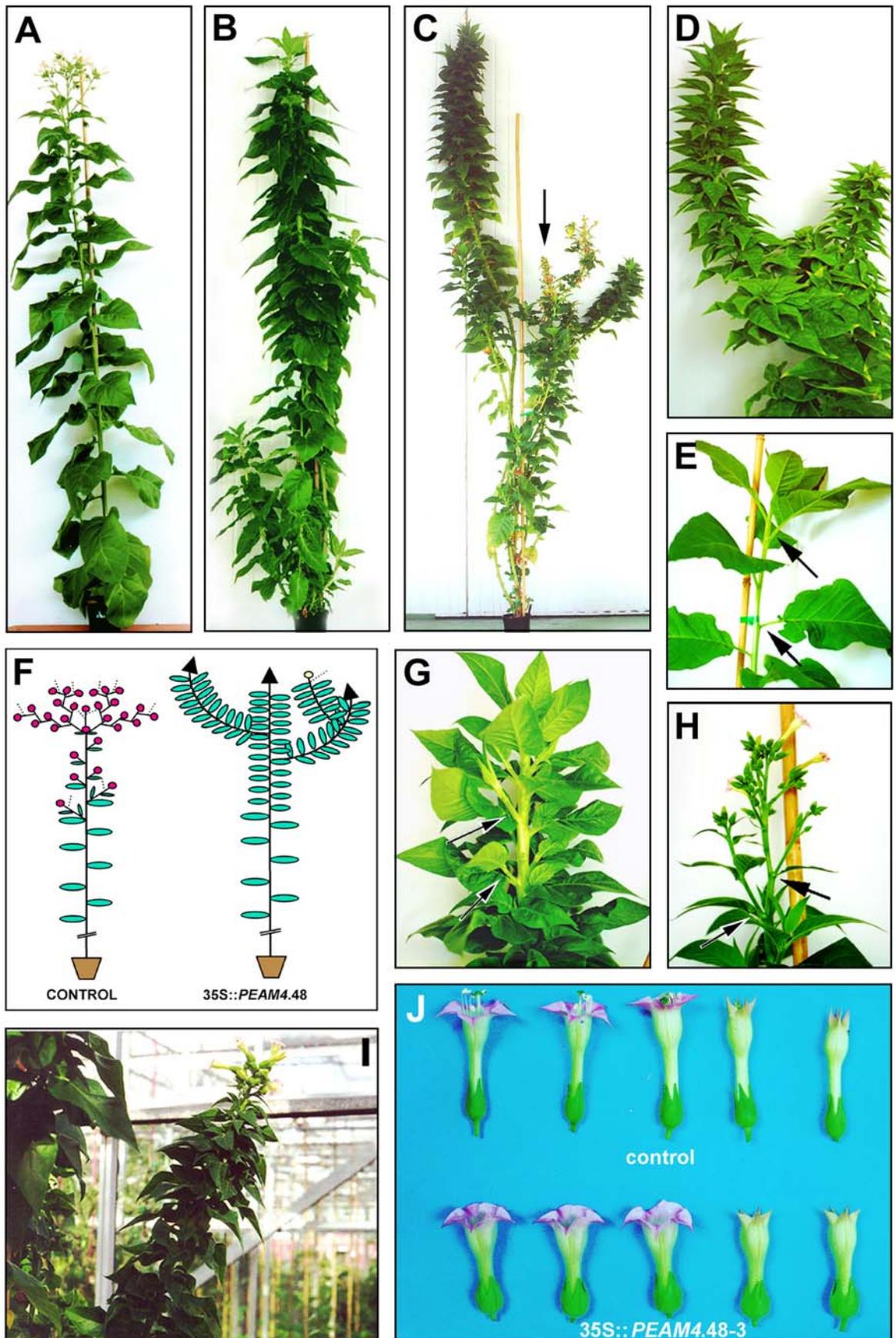
**Figura 41. Distribución de plantas hemizigotas y homocigotas para el transgén de la población T<sub>2</sub> de la línea 35S::*PEAM4.48* en función del número total de hojas producido. (A) Plantas T<sub>2</sub> hemizigotas 35S::*PEAM4.48*. (B) Plantas T<sub>2</sub> homocigotas 35S::*PEAM4.48*.**

Como se mencionó anteriormente, se observó un nuevo fenotipo en varias de las plantas de la población T<sub>2</sub> de la línea 35S::*PEAM4.48*. Algunas de las plantas de esta población T<sub>2</sub>, en lugar de florecer tempranamente, mostraron inhibición de la floración; en éstas plantas, a diferencia a lo que ocurría en las plantas control, el SAM no formó una flor terminal sino que continuó creciendo indefinidamente produciendo hojas (>100) en sus flancos (Figura 42B, C y D). Estas plantas, a juzgar por su velocidad de crecimiento, la longitud de los entrenudos

del tallo y la morfología de las hojas, fueron indistinguibles de las plantas control hasta que se habían producido aproximadamente unos 40 nudos; a partir de este punto, las diferencias con respecto a las plantas control empezaron a hacerse evidentes. En las plantas control, la longitud de los entrenudos permanecía constante durante la fase vegetativa (4-4'5 cm) y alrededor de la transición floral (entre el nudo 45-49 en nuestras condiciones de crecimiento) se reducía de manera brusca a 0'2-0'5 cm en los últimos tres o cuatro nudos previos a la formación de la flor terminal. La longitud de los entrenudos en las plantas 35S::PEAM4 de floración inhibida se mantenía constante en 4-4'5 cm entre los nudos 0-30 y a partir de este punto fue decreciendo gradualmente hasta alcanzar aproximadamente 0'6 cm en el nudo 60 y por encima de éste. El tamaño de la hoja en las plantas control decrece acropétalmente de modo gradual durante la fase vegetativa y una vez se alcanza la fase reproductiva tiene lugar una transición brusca y las hojas vegetativas con forma de pica son reemplazadas por brácteas de menor tamaño y forma lanceolada. Como ya se comentó previamente, en las plantas control se suelen producir un total de cuatro brácteas cuyo tamaño se va reduciendo conforme se sitúan en posiciones más apicales, siendo más estrechas y de menor longitud las que se encuentran más próximas a la estructura apical (Figuras 40A y 43B). En las plantas T<sub>2</sub> de la línea 35S::PEAM4.48 que mostraron un fenotipo de floración inhibida no se observó esta transición abrupta; sin embargo, en estas plantas se observaba una producción reiterada de un tipo peculiar de hojas en los nudos que ocupaban las posiciones superiores del tallo, las más cercanas al ápice. Estas hojas eran en longitud muy similares a las brácteas pero no mostraban su morfología lanceolada (Figura 43D).

---

**Figura 42. Fenotipo de inhibición de la floración en las plantas T<sub>2</sub> de la línea 35S::PEAM4.48.** (A) Planta control florecida después de tres meses desde su siembra. (B) Planta 35S::PEAM4.48-1 de cuatro meses de edad no florecida; esta planta ha perdido las hojas basales del tallo principal y las hojas que se ven en la base corresponden a ramas secundarias. (C) Planta 35S::PEAM4.48-3 de once meses de edad que aun no ha florecido; se puede observar cómo el tallo principal (señalado con una flecha) ha perdido la dominancia apical y el crecimiento más activo se da en ramas laterales. La escala de esta figura es menor que la de A y B. (D) Detalle de la parte superior de la planta 35S::PEAM4.48-9 de siete meses de edad, que aún no ha florecido, mostrando una fuerte compresión del tallo principal y de las ramas laterales. (E) La proliferación de ramas axilares se halla inhibida en el ápice vegetativo de la planta control. (F) Representación esquemática de la arquitectura de una planta control (izquierda) y de una planta 35S::PEAM4.48 de floración inhibida (derecha). La simbología es como la utilizada en la figura 40A; la puntas de flecha representan ápices vegetativos de crecimiento indeterminado. (G) Tallos axilares (indicados por flechas) que proliferan en el ápice vegetativo de una planta 35S::PEAM4.48 de floración inhibida. (H) Tallos axilares (flechas) en una planta control después de la iniciación de las flores. (I) Rama lateral florecida de la planta 35S::PEAM4.48-3 de 18 meses de edad; se observa la compresión de los entrenudos. (J) Flores de una planta control (arriba) y de la planta 35S::PEAM4.48-3 con fenotipo de floración inhibida (abajo); las flores de la línea 35S::PEAM4.48-3 son más achatadas que las flores control y sus sépalos y pétalos presentan un ligero abombamiento.



Para analizar con más detalle las características morfológicas de este tipo particular de hojas encontrado en las plantas floración inhibida, éstas se compararon con muestras de distintos tipos de hoja de una planta control. Para ello, muestras procedentes de hojas vegetativas no expandidas de plantas de corta edad, de hojas vegetativas expandidas y de las brácteas de menor tamaño de una planta control y de las hojas de morfología peculiar de las plantas de floración inhibida se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. Esto nos permitió estimar la densidad de tricomas de cada tipo de hoja, así como, comparar la morfología de los distintos tipos celulares. Los resultados del conteo de tricomas (Tabla 20) mostraron que el tipo foliar encontrado en las posiciones más apicales de las plantas de floración inhibida exhibían una densidad de tricomas muy similar a la mostrada por las brácteas que ocupan las posiciones apicales en una planta control, siendo este valor bastante superior al de las hojas vegetativas, expandidas y no expandidas, de una planta control.

**Tabla 20. Densidad de tricomas en distintos tipos foliares en una planta control y en las plantas T<sub>2</sub> de la línea 35S::PEAM4 de floración inhibida**

|                         | TIPO DE HOJA |           |         |        |        |
|-------------------------|--------------|-----------|---------|--------|--------|
|                         | control      |           |         | 48-1   | 48-3   |
|                         | no expandida | expandida | bráctea | apical | apical |
| % tricomas <sup>a</sup> | 3            | 2'8       | 7'1     | 6'4    | 6'5    |

a: número de tricomas por cada 100 células contabilizadas

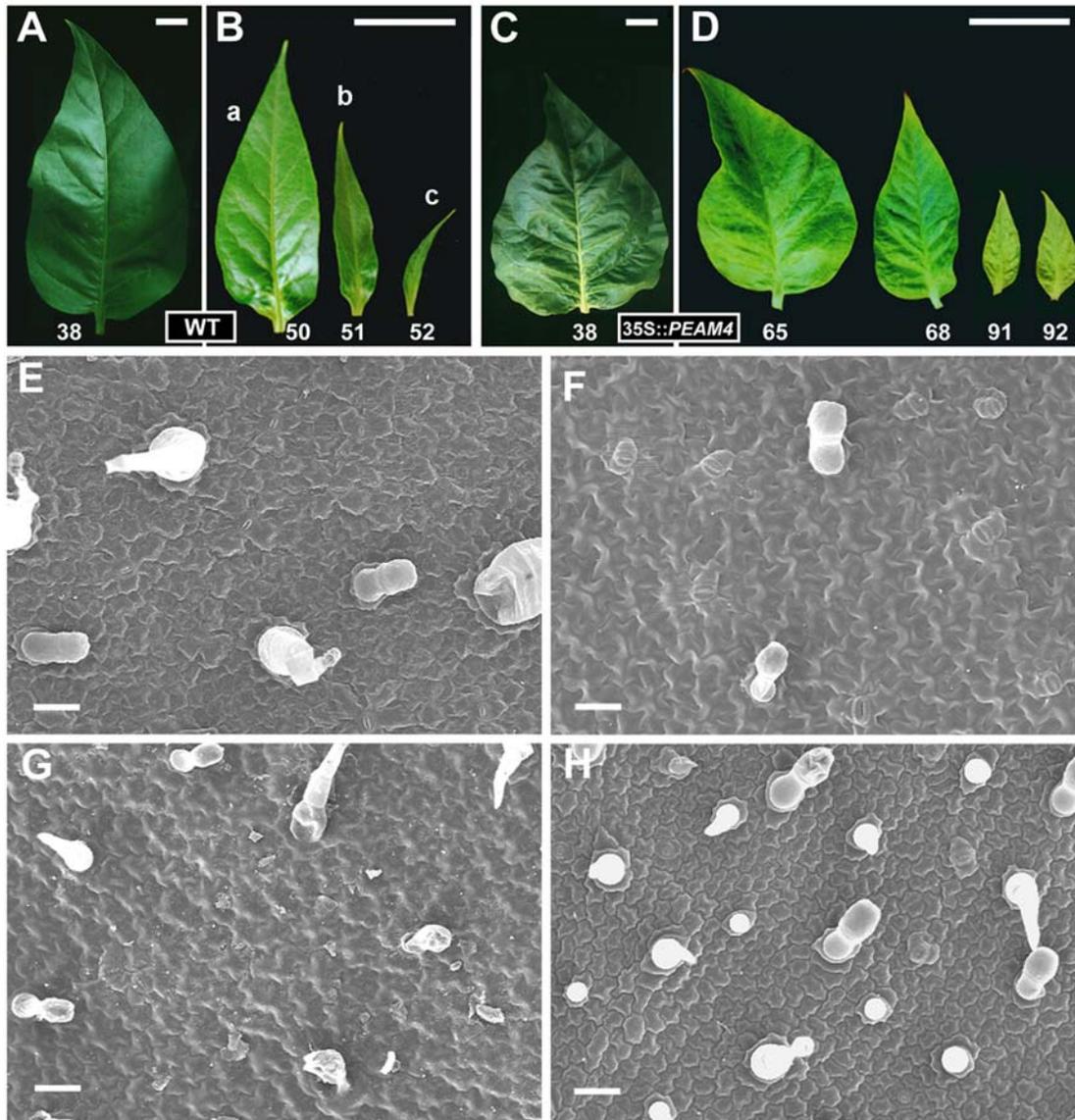
En relación a la morfología celular de los distintos tipos de hoja, la diferencia más llamativa que se encontró fue con respecto al tamaño celular (Figura 43); en las hojas que ocupan las posiciones más apicales en las plantas con floración inhibida el tamaño de las células era de tamaño bastante menor al de los tipos celulares observados en los distintos tipos foliares característicos de una planta control. Las hojas vegetativas no expandidas (Figura 43E) presentan células cuya apariencia es irregular y abombada y donde no se aprecian con claridad los límites de las mismas; además se puede observar la presencia de una alta densidad de estomas. Las hojas vegetativas expandidas (Figura 43F) presentan, al igual que las anteriores, numerosos estomas, son de menor tamaño y sus bordes están mejor delimitados. Las brácteas (Figura 43G) contienen células de apariencia similar a las de las hojas vegetativas no expandidas (Figura 43F) aunque son ligeramente más aplanadas y las invaginaciones de sus márgenes son mucho menos marcadas; además, en

este tejido se observa una reducción de la densidad de estomas con respecto a la encontrada en las hojas vegetativas. En las hojas apicales de las planta con floración inhibida, las células (Figura 43H), presentan una superficie aplanada y con los márgenes ligeramente irregulares, características que les confiere cierta semejanza con las células presentes en la bráctea, sin embargo, a diferencia de estas últimas, los márgenes celulares se hallan claramente delimitados; en este tejido, al igual que se observa en las brácteas, existe una reducción importante del número de estomas en comparación con lo encontrado en los tipos foliares vegetativos.

Las observaciones llevadas a cabo a nivel macro y microscópico sugieren a una cierta similitud entre este tipo particular de hojas y las brácteas típicas de las plantas control.

Otra característica particular de las plantas 35S::PEAM4.48 de floración inhibida está relacionada con la dominancia apical. Mientras que en las plantas control el crecimiento de las ramas laterales permanece inhibido hasta que el SAM forma una flor terminal (Figura 42E y H), las plantas 35S::PEAM4 con floración inhibida perdían la dominancia apical, de manera que, aunque el meristemo apical del tallo seguía manteniendo un patrón de crecimiento indeterminado, se observaba una fuerte proliferación de ramas axilares, particularmente en los nudos más cercanos al ápice (Figura 42G). El acortamiento de la longitud de los entrenudos, el menor tamaño de la hoja y la proliferación de ramas laterales confería a la parte superior de estas plantas un aspecto de compresión y frondosidad no observado en las plantas control.

Las plantas con fenotipo de floración inhibida aparecieron ocasionalmente entre las plantas T<sub>2</sub> de la línea 35S::PEAM4.48. De las 47 plantas T<sub>2</sub> resistentes a kanamicina analizadas solamente cuatro mostraron este fenotipo. Tres de estas plantas acabaron produciendo finalmente un número reducido de flores; la planta T-48-9 floreció después de 15 meses de crecimiento vegetativo mientras que las plantas T-48-1 y T-48-3 florecieron tras 18 meses; en nuestras condiciones de cultivo las plantas control florecieron a los tres meses de la siembra. La planta T-48-6, que también mostró fenotipo de floración inhibida, murió antes de florecer, 14 meses después de su siembra. En las tres plantas las flores se formaron en el ápice de algún tallo de tercer orden formado en tallos secundarios que aparecieron en la axila de hojas situadas en posiciones apicales del tallo principal (Figura 42F e I). Estas flores no mostraron alteraciones homeóticas; sin embargo, cuando se compararon con las flores de las plantas control se pudo observar que eran ligeramente más achatadas y que los sépalos y los pétalos aparecían como abombados al compararlos con los órganos equivalentes de flores de las plantas control en estadios de desarrollo similares. Las flores de las plantas T<sub>2</sub> de la línea T-48 con floración inhibida y de la planta control se comparan en la figura 42J.



**Figura 43. Morfología de las hojas de plantas control y transgénica 35S::PEAM4.48-3 con fenotipo de floración inhibida. (A y B)** Hojas (completamente expandidas) que aparecen en diferentes posiciones del tallo principal de una planta control (la posición del nudo está indicado por el número en la base). **(A)** Hoja vegetativa. **(B)** Tipos de brácteas en función de sus dimensiones y posición en la inflorescencia principal con respecto a la estructura apical. La de tipo a es la de mayor tamaño y la más alejada del ápice; la de tipo b es de tamaño y posición intermedia; la de tipo c, es la de menor tamaño y la que ocupa las posiciones más apicales. **(C y D)** Hojas (completamente expandidas) que aparecen en diferentes posiciones del tallo principal de la línea 35S::PEAM4.48-3 (la posición del nudo está indicado por el número en la base). **(C)** Hoja de la zona media baja con similitud a una hoja vegetativa mostrada en A. **(D)** Hojas características de posiciones apicales de las plantas 35S::PEAM4.48 con floración inhibida con similitud a las brácteas mostradas en B. La barra representa en todos los casos 3 cm. **(E, F, G y H)** Análisis SEM de la morfología de las células de la superficie abaxial de distintos tipos foliares de una planta control y 35S::PEAM4.48-1 con floración inhibida. **(E)** Epidermis de una hoja vegetativa control no expandida; las células muestran una apariencia irregular y abombada, sin márgenes definidos; se observa un gran número de estomas. **(F)** Epidermis de una hoja vegetativa control expandida; las células muestran una apariencia estrellada; también son abundantes los estomas. **(G)** Epidermis de una bráctea control; las células son ligeramente aplanadas, similares en forma a las de F aunque con los márgenes menos acentuados. **(H)** Epidermis de una hoja de la región apical de una planta 35S::PEAM4.48-1 con inhibición de floración; las células presentan forma aplanada y sus márgenes son ligeramente irregulares, características que les confiere cierta semejanza con las células de las brácteas, sin embargo, presentan una clara delimitación de los márgenes celulares. Tanto en (G) como en (H) el número de estomas es inferior al presente en los tipos foliares vegetativos. La barra horizontal indica en todos los casos 50  $\mu$ m.

De las tres líneas que florecieron, T-48-1, T-48-3 y T-48-9, sólo las dos primeras consiguieron producir semillas fértiles; el ensayo de segregación de la resistencia a kanamicina indicó que en ambos casos se trataba de plantas hemizigotas para el transgén (Tabla 21).

**Tabla 21. Distribución de la resistencia a kanamicina en la descendencia de plantas T<sub>2</sub> 35S::PEAM4.48 con fenotipo de floración inhibida.**

| Línea  | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |      | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) |
|--------|-------------------------------------|-------------------|------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|
|        |                                     | +(R)              | -(S) |              |                 |                |                            |
| T-48-1 | 40                                  | 30                | 10   | 1'0/4        | 3:1             | 0'033          | 0'86                       |
| T-48-3 | 42                                  | 29                | 13   | 1'2/4        | 3:1             | 0'666          | 0'41                       |

#### 2.1.1.4.1. Análisis del fenotipo de la progenie de las plantas de tabaco 35S::PEAM4.48 de floración inhibida

Para determinar si el fenotipo de inhibición de la floración observado entre las plantas T<sub>2</sub> 35S::PEAM4.48 era estable y se transmitía a la siguiente generación, se sembró la descendencia de la línea 48-1 (cuya segregación había indicado que era hemizigota para el transgén) y se analizó el fenotipo de 22 plantas T<sub>3</sub> resistentes a kanamicina.

Entre las plantas T<sub>3</sub> de la línea 35S::PEAM4.48-1 se observaron dos fenotipos claramente distinguibles (Figura 44A). La mayor parte de las plantas mostraron el mismo fenotipo que su parental, descrito con detalle en páginas anteriores, es decir, un fenotipo de inhibición de la floración (>100 hojas en el tallo principal) con pérdida de la dominancia apical, reducción de la longitud de entrenudos y la aparición de un tipo particular de hojas, con similitud morfológica a las brácteas, en las posiciones apicales del tallo. Sin embargo, entre las plantas T<sub>3</sub> aparecieron dos plantas que mostraron un nuevo fenotipo: una de ellas floreció muy tempranamente, tras producir sólo 23 hojas, mientras que la otra floreció tras producir 52 hojas, que es aproximadamente el número de hojas producido por las plantas control. Como característica fenotípica común de estas dos plantas se observó que, en ambas, el SAM diferenciaba una flor terminal anómala y estéril (Figura 44B y D), y en la que los distintos tipos de órganos florales eran prácticamente indiferenciables. Además, de las axilas de las hojas vegetativas (normalmente tres) situadas al mismo nivel que esta flor terminal en el tallo principal se desarrollaban tallos secundarios que, como el principal, pasaban por una fase vegetativa antes de producir una flor terminal de características similares (Figura 44B).

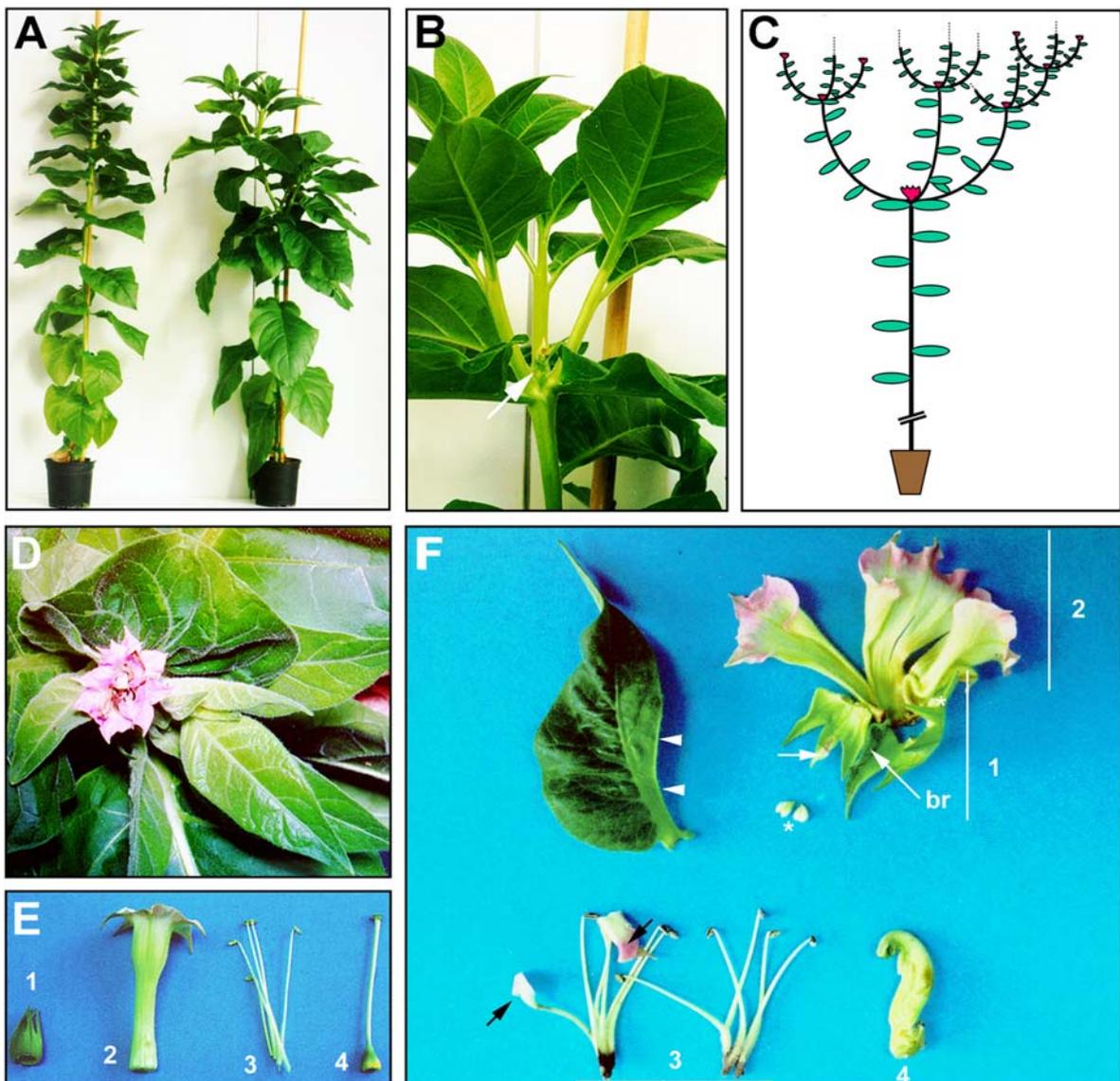
En estos tallos secundarios se repetía el mismo patrón; de nuevo, en las axilas de las últimas hojas del tallo secundario, se inducía la formación de tallos terciarios (de uno a tres) que de nuevo formaban flores terminales anómalas y tallos cuaternarios, etc. (Figura 44C).

En estas plantas no se observó la formación de brácteas típicas sino que en su lugar, acompañando a estas flores terminales aberrantes, tanto en el tallo principal como en los tallos secundarios, terciarios, etc., se observaron unas hojas de características especiales con forma de media luna y que parecen corresponder con un tipo foliar quimérico resultante de la fusión de dos clases de hoja diferentes (Figura 44F): hoja vegetativa a un lado de la nerviación central (el que queda hacia el exterior) y en el otro (el más cercano a la flor terminal) un tipo que recuerda al de las brácteas que ocupan las posiciones ápicales en una planta control. Ambos tipos foliares se distinguen por su textura y color, presentando el tejido de bráctea un aspecto más liso y color más claro (Figura 44F).

En los tallos primarios las flores abortaban, mientras que con frecuencia en los tallos secundarios y terciarios, etc., éstas se desarrollaban completamente aunque mostraban evidentes alteraciones fenotípicas que afectaban a todos los verticilos (Figura 44D y F). Estas flores presentan un aumento generalizado del número de órganos de los distintos verticilos florales, los cuales se disponen en filotaxis espiral, en contraste con la filotaxis verticilada de las flores control.

---

**Figura 44. Fenotipo de las plantas T<sub>3</sub> descendientes de la línea 35S::PEAM4.48-1 de fenotipo de floración inhibida. (A)** A la izquierda, planta T<sub>3</sub> de la línea 35S::PEAM4.48-1 con fenotipo de floración inhibida similar al mostrado por su parental; a la derecha, planta T<sub>3</sub> de la línea 35S::PEAM4.48-1 mostrando un nuevo fenotipo de floración temprana, arquitectura modificada, y producción de flores terminales aberrantes. **(B)** Detalle de la estructura apical de la inflorescencia principal de la planta 35S::PEAM4.48-1, esquematizada en C. El SAM ha dado lugar a una flor terminal que aborta (flecha blanca) y tres tallos secundarios se desarrollan de las axilas de tres hojas vegetativas situadas al mismo nivel que la flor terminal. **(C)** Representación esquemática del nuevo fenotipo aparecido entre la progenie T<sub>3</sub> de la línea 35S::PEAM4.48-1. **(D)** Detalle de una flor terminal de fenotipo aberrante producida en uno de los tallos laterales de una planta T<sub>3</sub> 35S::PEAM4.48-1. Se puede observar el carácter petaloide de esta flor. **(E)** Disección una flor control. **(F)** Disección de una flor terminal de fenotipo aberrante producida en los tallos laterales más tardíos de una de las plantas T<sub>3</sub> 35S::PEAM4.48-1 mostrando los distintos verticilos florales. Las puntas de flecha blancas señalan el margen con características bracteoides de la última hoja formada antes de la flor terminal, no fusionada al verticilo de sépalos; el número de sépalos se ha incrementado con respecto a las plantas control; fusionado a uno de estos sépalos aparece una bráctea señalada por una flecha blanca; otro sépalo se halla fusionado a un pétalo, de manera que el primer verticilo no llega a cerrarse para formar el cáliz; los pétalos, cuyo número se halla incrementado, se distribuyen en tres grupos que aparecen fusionados solo en su parte basal. El número de estambres se halla incrementado y en algunos de ellos aparecen expansiones petaloides (flechas negras) en las posiciones en las que normalmente se desarrollarían las anteras. En el cuarto verticilo, el carpelo aparece como un órgano muy engrosado y curvado hacia abajo en su parte apical. Los asteriscos señalan unos órganos que aparecen entre el primer y segundo verticilo de la parte basal de estas flores; presentan características sepaloides y no llegan a desarrollarse completamente. 1, 2, 3 y 4 indican los distintos verticilos. br: bráctea.



En las flores que mostraron los fenotipos más severos el número de sépalos se incrementó de cinco, en las flores control (Figura 44F) a siete, algunos de los cuales mostraron pequeños sectores de tejido petaloide (Figura 44F). En todas las flores analizadas, uno de los sépalos se hallaba fusionado por un lado, bien a la hoja con forma de media luna, mencionada anteriormente, por la zona que mostraba similitud con una bráctea o, en ocasiones, a una bráctea (Figura 44F). El verticilo de sépalos no llega a cerrarse completamente sobre sí mismo para formar el cáliz típico presente en las flores control ya que por un extremo se halla fusionado a una bráctea (que queda como el órgano más alejado del centro de la flor) y por el otro se continúa con el verticilo de pétalos al que también se halla fusionado. El número de pétalos aumenta de cinco, en las plantas control, a trece, los cuales aparecen fusionados entre sí pero distribuidos en varios grupos independientes, unidos entre sí solo en su base, lo que les confiere la apariencia de

verticilos distintos. Con frecuencia, estos pétalos muestran en sus márgenes (lateral y apical) un color verdoso que recuerda al tejido que forma parte de los sépalos lo que probablemente impide la cohesión normal y el cierre completo de la corola (Figura 44F). El número de estambres aumenta de cinco, en las plantas control, a un número entre nueve y once, algunos de los cuales son petaloides, observándose unas expansiones de tejido característico de pétalo en la región distal del filamento, aparentemente normal (Figura 44F) y remplazando en esa posición el desarrollo normal de las anteras. Estas flores presentan una reducción importante en la producción de polen. A veces la conversión homeótica de antera a pétalo es parcial observándose órganos mosaico mitad anteras y mitad pétalos. El carpelo también aparece alterado, mostrándose como un órgano engrosado, probablemente como resultado de la fusión de varios carpelos en el centro de la flor; frecuentemente se puede observar que en su parte distal, que correspondería al estilo y al estigma, aparece curvada hacia abajo. Las alteraciones fenotípicas observadas en estos dos últimos verticilos causan la esterilidad de estas flores. Entre los sépalos y los pétalos, en la base de estas flores, se observó también la aparición de unos órganos pobremente desarrollados de color verde claro y con abundante cantidad de tricomas recordando la apariencia de los sépalos

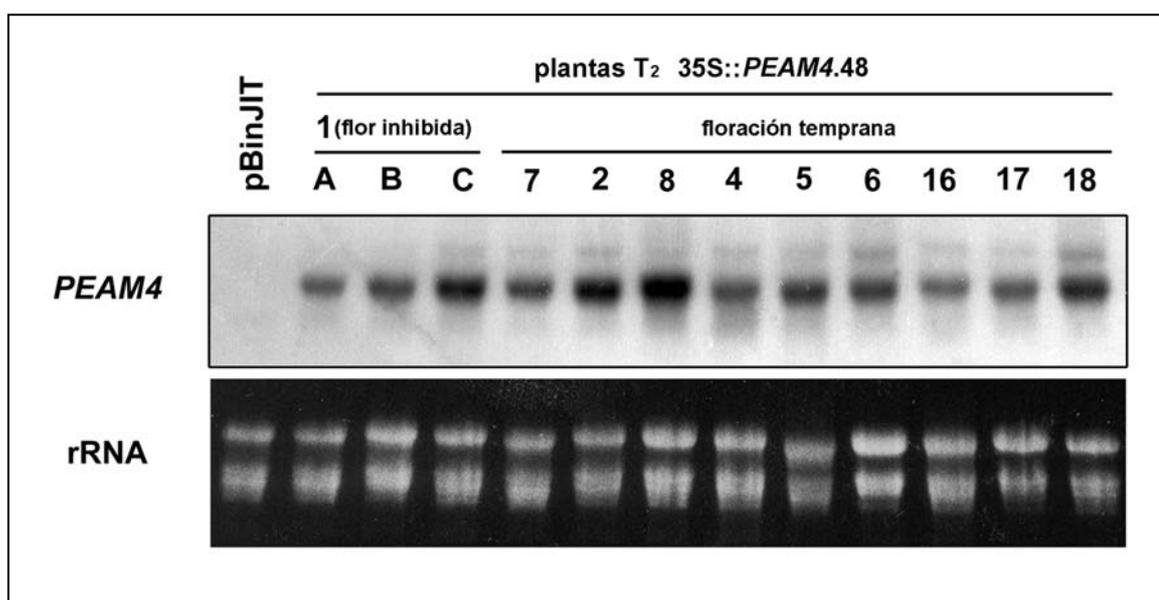
En las flores de fenotipo leve, el primer verticilo es prácticamente similar al descrito anteriormente, si bien se observa con mayor frecuencia la fusión de uno de los sépalos a la hoja de media luna más que a la bráctea de tamaño reducido. El verticilo de pétalos en estas flores no aparecía normalmente separado en varios grupos de pétalos, sino que era continuo como en los controles, sin embargo la corola tampoco se cerraba completamente, ya que seguían mostrando su fusión con el verticilo de sépalos. Se ha observado una reducción en el número de estambres petaloides y la deformación y engrosamiento del carpelo no es tan acusada como en las flores de fenotipo severo.

### **2.1.1.4.2. Análisis de la expresión del transgén *PEAM4* y de los genes endógenos de tabaco *NAP1-1*, *NAP1-2* y *NFL* en las plantas *35S::PEAM4.48* con floración inhibida**

Para analizar el defecto molecular causante del fenotipo de floración inhibida mostrado entre las plantas T<sub>2</sub> de la línea *35S::PEAM4.48*, se comparó el nivel de expresión del transgén *PEAM4* en la planta T-48-1, que mostró el fenotipo de floración inhibida, con el de diferentes plantas de la población T<sub>2</sub> que florecieron tempranamente. El fenotipo de estas plantas no parecía haber sido causado por una mutación clásica de tipo recesivo, según los resultados del test de segregación. Si el fenotipo de inhibición se debiera a un fenómeno de cosupresión simple, se podría esperar que en esas plantas se observase una disminución

de la expresión de algún gen endógeno homólogo a *PEAM4*, así como de la del transgén *PEAM4*.

Para estimar los niveles de expresión del transgén en las diferentes plantas  $T_2$  35S::*PEAM4.48* de floración inhibida, con respecto a las otras plantas, se realizó un análisis Northern con RNA extraído de hojas vegetativas adultas procedentes de varias plantas  $T_2$  de floración temprana y de hojas vegetativas correspondientes a tres posiciones diferentes de una de las ramas secundarias no florecidas de la planta T-48-1, de floración inhibida, siendo la A la posición más alejada del tallo principal (Figura 42F) y la posición C la más cercana al tallo principal. Los resultados del análisis se muestran en la figura 45.



**Figura 45. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM4* en hojas de plantas  $T_2$  de la línea 35S::*PEAM4.48*.** Línea control (pBinJIT) transformada con el vector sin inserto; plantas  $T_2$  35S::*PEAM4.48* con fenotipo de floración temprana (T-2 a T-18) y hojas de distintas posiciones (A, B, C) de una rama secundaria no florecida de la planta 48-1 con floración inhibida. En cada uno de los pocillos se cargó 12  $\mu$ g de RNA total extraído de hojas vegetativas adultas. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *Xba*I de 767 pb del extremo 3' del cDNA de *PEAM4*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico.

El análisis Northern mostró que el transgén se expresaba en todas las plantas  $T_2$  analizadas; cuando se comparó la expresión del transgén *PEAM4* en las distintas plantas de floración temprana se observó que existían ligeras variaciones en el nivel de expresión entre las distintas transgénicas, pero estas diferencias de expresión no parecían tener reflejo en el fenotipo mostrado por las mismas. También, se observó que plantas de floración temprana tales como T-48-2 y T-48-4, presentaban niveles de expresión similares al mostrado por la planta T-48-1 de floración inhibida, de lo que se concluye, que los niveles del transgén eran similares en las plantas con adelanto o con inhibición de la floración. Las diferencias

observadas en la expresión del transgén entre las distintas posiciones A, B y C de la rama secundaria no florecida de la planta T-48-1 no parecen significativas, puesto que este mismo fenómeno de reducción de la expresión en una rama secundaria conforme nos alejamos del tallo principal se observó también en plantas que florecieron tempranamente (no mostrado).

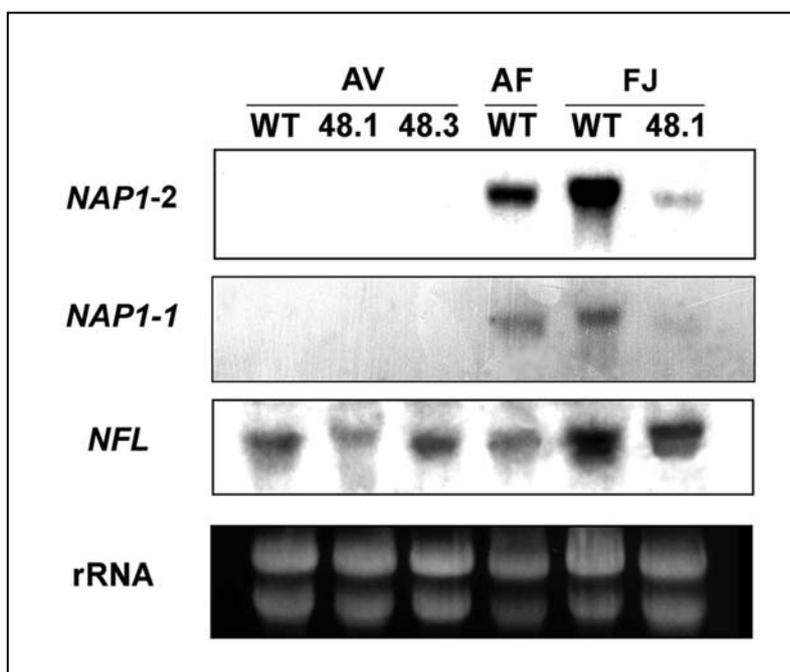
También se estudió la expresión de dos genes endógenos de tabaco, *NAP1-2* y *NAP1-1*, que muestran un alto nivel de similitud con *PEAM4*, en diferentes tejidos de una planta control y de las plantas 35S::*PEAM4.48* con fenotipo de floración inhibida. La proteína deducida *NAP1-2* es un 64% idéntica a *AP1*, 65% a *SQUA* y un 72% a *PEAM4*, y su extremo C-terminal contiene la CaaX-box frecuentemente presente en los genes relacionados con *AP1*. Esto sugiere que *NAP1-2* podría ser el homólogo de *AP1* de tabaco, de acuerdo con esto *NAP1-2* se agrupa en el clade *AP1/SQUA* de la subfamilia *SQUA*. La proteína deducida de *NAP1-1* es un 62% idéntica a *PEAM4* y se agrupa en el clade *FUL* de la subfamilia *SQUA*.

En las plantas control, no se detectó expresión del gen *NAP1-2* en ápices de plantas de un mes de edad (ápices vegetativos), pero se observó una fuerte expresión del gen inmediatamente después de la transición floral (ápices inflorescentes), así como en flores jóvenes de aproximadamente unos 4 mm de longitud (Figura 46). En contraste con esto, cuando la expresión de *NAP1-2* se analizó en los ápices de los tallos axilares que aparecían en las posiciones apicales del tallo principal (entre los nudos 75-100; en la línea silvestre las flores aparecen a partir del nudo 50) de las plantas de floración inhibida de la línea 35S::*PEAM4.48*, no se detectó transcrito *NAP1-2*, lo que indica la naturaleza vegetativa de estos ápices y posiblemente el silenciamiento de la expresión del gen *NAP1-2*. Las secuencias nucleotídicas de *PEAM4* y *NAP1-2* presentan una región de aproximadamente 150 pb de longitud que muestra un 80% de identidad. La expresión de *NAP1-2* se detectó también en las flores que eventualmente terminaron apareciendo en la línea T-48-1; sin embargo, el nivel del transcrito fue mucho más bajo que el encontrado en flores jóvenes de la misma edad y tamaño de la línea silvestre (Figura 46).

Los resultados del análisis de expresión del gen homólogo de *FUL* de tabaco, *NAP1-1*, son similares a los obtenidos para *NAP1-2* lo que sugiere un posible silenciamiento también del gen *NAP1-1* en las plantas 35S::*PEAM4.48* con fenotipo de inhibición de la floración.

Junto con *AP1* y *SQUA*, *LFY* y *FLO* son los genes clave implicados en el control de la identidad del meristemo floral en *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente. En las plantas 35S::*PEAM4.48* con fenotipo de floración inhibida también se analizó el nivel del transcrito de *NFL*, el probable ortólogo de *FLO/LFY* de tabaco (Kelly *et al.*, 1995). Los resultados de este análisis se muestran en la figura 46; en todos los tejidos estudiados se observó claramente la expresión de *NFL* y, además, no parecía haber diferencias

importantes entre el nivel de expresión de *NFL* en los tejidos correspondientes a las plantas control y a los de las plantas 35S::*PEAM4.48* con inhibición de la floración, aunque se observó que la expresión detectada de *NFL* en el ápice vegetativo de la planta T-48-1 era ligeramente inferior a la observada en el ápice vegetativo de una planta control. Esta reducción en el nivel de expresión de *NFL* no se observó, sin embargo, en la otra línea de floración inhibida, T-48-3. Por tanto, la expresión del gen *NFL* no parecía estar alterada en las plantas 35S::*PEAM4.48* con fenotipo de inhibición de la floración.



**Figura 46.** Análisis Northern de la expresión de los genes de tabaco *NAP1-2*, *NAP1-1* y *NFL*, probables homólogos de los genes *SQUA/AP1*, *FUL* y *FLO/LFY*, respectivamente, en diferentes tejidos de plantas de tabaco control y 35S::*PEAM4.48* con floración inhibida. Una membrana cargada con muestras de RNA total extraído de ápices vegetativos (AV), ápices florales (AF) y flores jóvenes (FJ) de plantas control y plantas de floración inhibida 35S::*PEAM4* (48-1 y 48-3), se hibridó con sondas de los genes *NAP1-2*, *NAP1-1* y *NFL* de tabaco. Para la sonda de *NAP1-1* se utilizó un fragmento *EcoRI* de 599 pb correspondiente al extremo 3'; para la de *NAP1-2* se utilizó un fragmento *EcoRI/HindIII* de 526 pb de su extremo 3' y para *NFL* un inserto *EcoRI* de 700 pb de su extremo 3'. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico.

### 1.1.2. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE *Nicotiana tabacum* CON UNA CONSTRUCCIÓN ANTISENTIDO 35S::*PEAM4AS*

Como resultado de la transformación de plantas de tabaco con la construcción antisentido 35S::*PEAM4AS* se obtuvieron 17 plantas transgénicas resistentes a kanamicina. En las transgénicas primarias no se observó ninguna alteración fenotípica evidente con respecto a los controles; la caracterización fenotípica se llevó a cabo en las plantas de la población T<sub>2</sub>.

## Resultados

Con el fin de determinar el número de *loci* en el que se había producido la inserción del T-DNA en las distintas plantas, se llevó a cabo el análisis de segregación del transgén mediante la siembra de las correspondientes progenies T<sub>2</sub> en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control sin transformar y transgénicas. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 22.

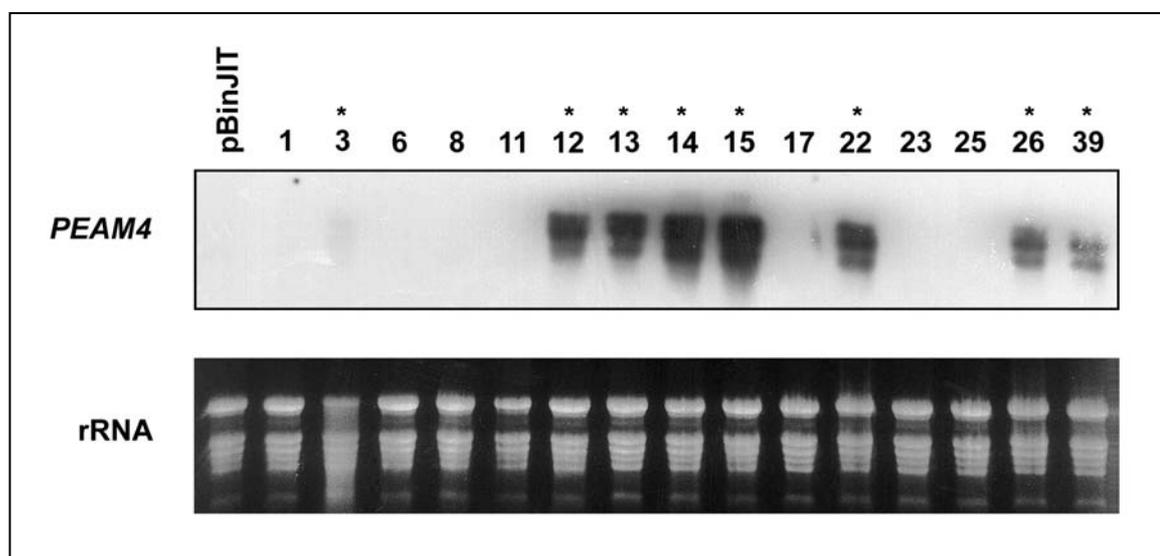
**Tabla 22. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de tabaco T<sub>2</sub> 35S::PEAM4AS.**

| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |      | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | +(R)              | -(S) |              |                 |                |                            |           |
| T-1     | 38                                  | 31                | 7    | 0'7/4        | 3:1             | 1'088          | 0'30                       | 1         |
| T-3*    | 40                                  | 40                | 0    |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-6     | 40                                  | 40                | 0    |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-8     | 38                                  | 38                | 0    |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-11    | 39                                  | 30                | 9    | 0'9/4        | 3:1             | 0'162          | 0'69                       | 1         |
| T-12*   | 40                                  | 32                | 8    | 0'8/4        | 3:1             | 0'837          | 0'36                       | 1         |
| T-13*   | 40                                  | 39                | 1    | 0'4/16       | 15:1            | 1'627          | 0'20                       | 2         |
| T-14*   | 40                                  | 32                | 8    | 0'8/4        | 3:1             | 0'433          | 0'51                       | 1         |
| T-15*   | 40                                  | 40                | 0    |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-17    | 40                                  | 30                | 10   | 1'0/4        | 3:1             | 0'033          | 0'86                       | 1         |
| T-22*   | 40                                  | 40                | 0    |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-23    | 41                                  | 29                | 12   | 1'2/4        | 3:1             | 0'317          | 0'57                       | 1         |
| T-25    | 41                                  | 32                | 9    | 0'9/4        | 3:1             | 0'317          | 0'57                       | 1         |
| T-26*   | 41                                  | 37                | 4    | 1'6/16       | 15:1            | 0'399          | 0'53                       | 2         |
| T-36    | 43                                  | 31                | 12   | 1'1/4        | 3:1             | 0'147          | 0'70                       | 1         |
| T-39*   | 42                                  | 31                | 11   | 1'1/4        | 3:1             | 0'032          | 0'86                       | 1         |
| T-40    | 36                                  | 36                | 0    |              |                 |                |                            | ≥2        |
| control | 41                                  | 0                 | 41   |              |                 |                |                            | 0         |

Las líneas que mostraron alteraciones fenotípicas en la población T<sub>2</sub> se indican con un asterisco.

En nueve de las líneas transgénicas obtenidas la segregación se ajustaba a una relación 3:1 (resistentes:sensibles) que corresponde con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. En el resto de las líneas, la segregación obtenida indica una inserción del transgén en dos o más *loci* distintos.

El nivel de expresión del transgén *PEAM4* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 47.



**Figura 47. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM4* en plantas de *Nicotiana tabacum* control y transformadas con la construcción antisentido 35S::*PEAM4AS*.** Línea control (pBinJIT) transformada con el vector sin inserto; líneas transgénicas con la construcción antisentido 35S::*PEAM4AS* (T-1 a T-39). En cada uno de los pocillos se cargó 12  $\mu$ g de RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *Xba*I de (767 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM4*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. El asterisco señala aquellas líneas que mostraron alteraciones fenotípicas.

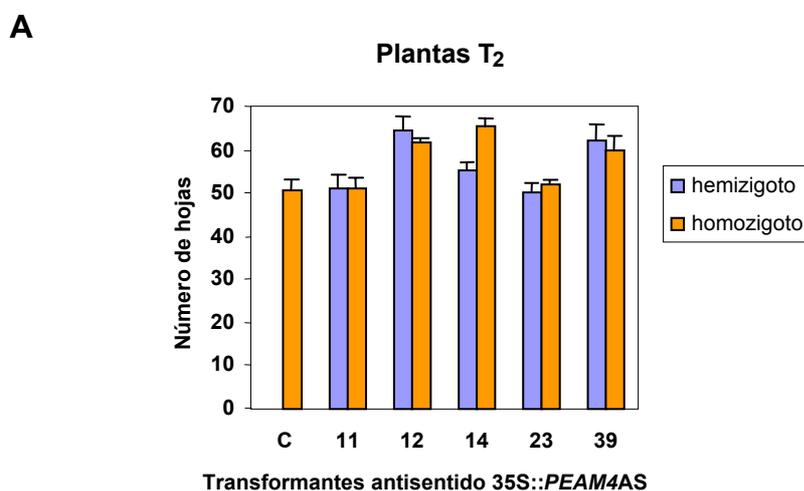
El análisis Northern mostró que la expresión del transgén *PEAM4* varía entre las distintas líneas transgénicas transformadas con la construcción antisentido 35S::*PEAM4AS*. Se observaron niveles muy altos de expresión en las líneas transgénicas T-14, T-15, intermedios en las líneas T-12, T-13 y T-22 y bajos en las líneas T-3, T-26 y T-39; no se detectó expresión de *PEAM4AS* en las líneas T-1, T-6, T-8, T-11, T-17, T-23 y T-25, así como en la línea control pBinJIT.

Para analizar el efecto de la expresión constitutiva del gen *PEAM4* en orientación antisentido sobre el tiempo de floración de *Nicotiana tabacum*, se contabilizó el número total de hojas producido por el tallo principal de plantas de la progenie T<sub>2</sub> de la línea control (pBinJIT) y de varias de las líneas transgénicas antisentido 35S::*PEAM4AS*, tal y como se había hecho para el análisis de las líneas transgénicas 35S::*PEAM4*; los conteos de número de hojas se llevaron a cabo, por tanto, sobre doce plantas T<sub>2</sub> resistentes a kanamicina de cada línea transgénica. Se seleccionaron ocho líneas transgénicas en las que se había detectado nivel de expresión del transgén mediante análisis Northern, tres de ellas con una única inserción del T-DNA (T-12, T-14 y T-39) y el resto con múltiples inserciones del T-DNA (T-3, T-13, T-15, T-22 y T-26). Como control adicional, también se realizaron conteos en dos

líneas en las que no se detectó expresión del transgén (T-11 y T-23) y que en el test de segregación se comportaban como si portaran el T-DNA insertado en un único *locus*.

El resultado de los conteos de número de hojas realizados en las plantas T<sub>2</sub> de las distintas líneas transgénicas 35S::*PEAM4AS* se muestra en la figura 48. Los resultados para las líneas con una única inserción del transgén se muestran en la figura 48A donde los valores representados se corresponden con la media del número total de hojas ± la desviación estándar, calculados a partir de muestras de ocho a diez plantas hemizigotas ó de dos a cuatro plantas homocigotas de cada una de las líneas transgénicas. En la figura 48B se muestra la distribución de plantas, en función del número total de hojas producido por las mismas, de la población T<sub>2</sub> de varias líneas transgénicas antisentido 35S::*PEAM4AS* que contenían más de una inserción del transgén.

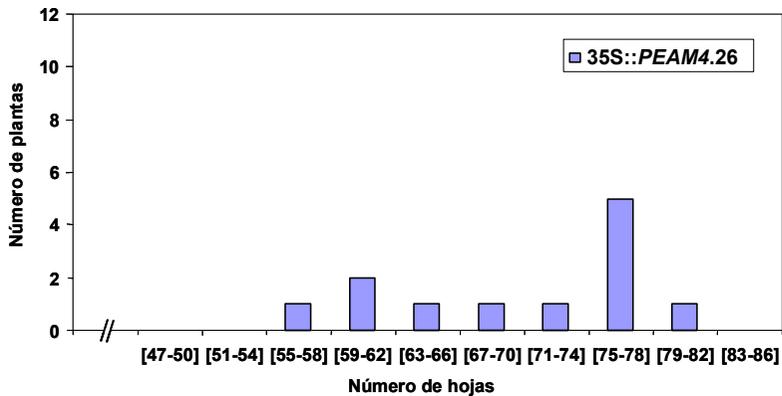
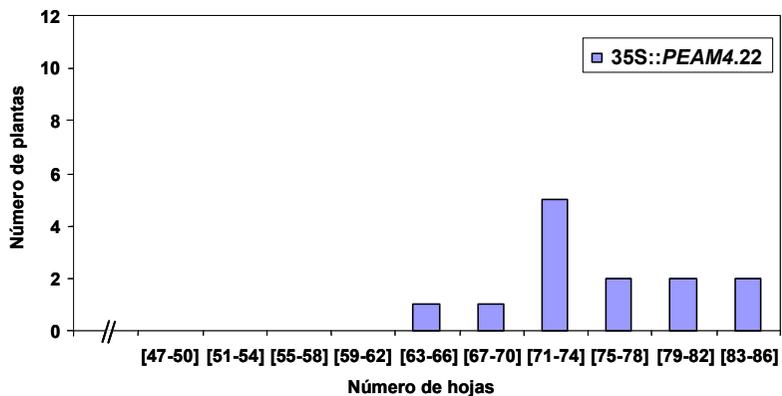
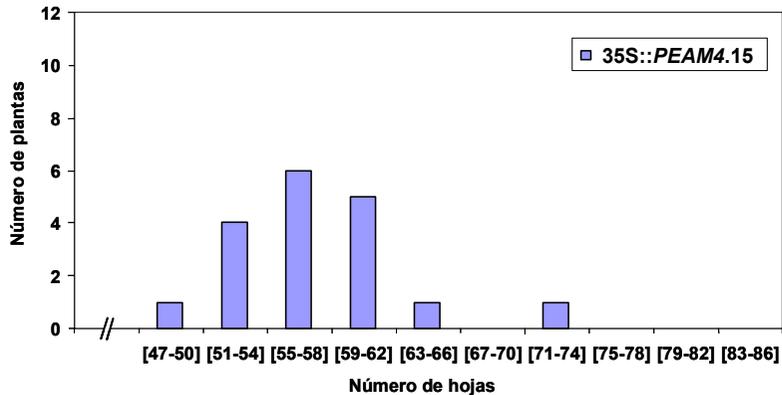
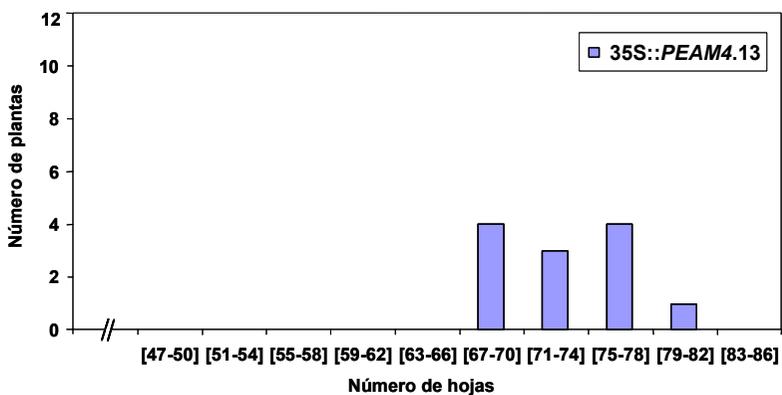
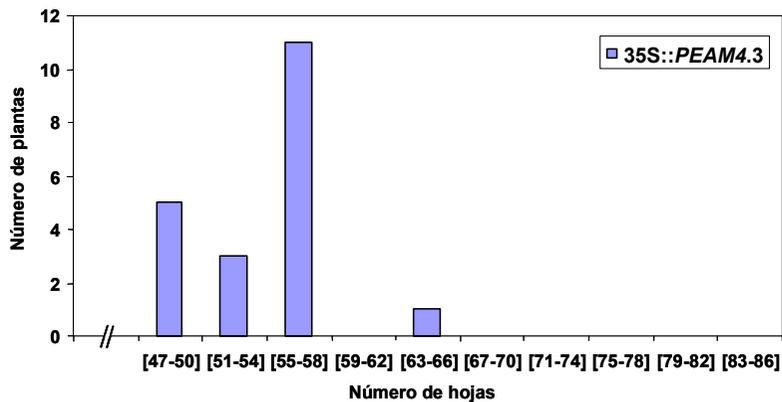
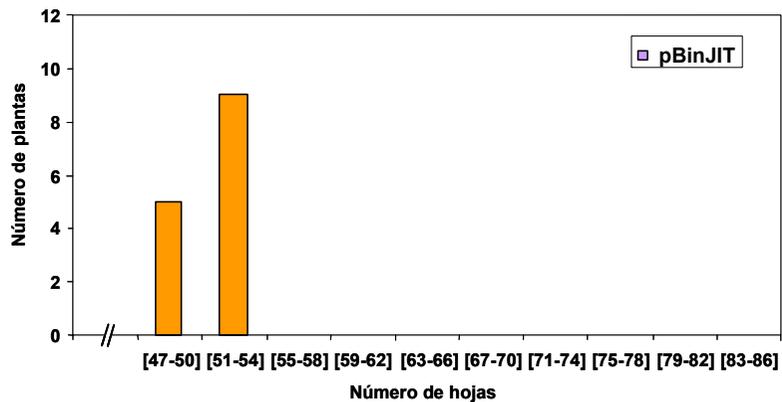
Tal y como se muestra en la figura 48A, se observó que las plantas homocigotas y hemizigotas de la población T<sub>2</sub> de las líneas con una única inserción en las que no se detectó expresión del transgén (T-11 y T-23) florecían tras producir un número total de hojas similar al producido por las plantas control, mientras que en el resto de líneas en las que sí se había detectado expresión del transgén (T-12, T-14 y T-39) las plantas pertenecientes a ambas categorías fenotípicas florecían tras producir un número superior de hojas que las plantas control. Se observó también que en las líneas T-12 y T-39 el retraso en el tiempo de



**Figura 48. Análisis cuantitativo del tiempo de floración de diferentes líneas de *Nicotiana tabacum* transformadas con la construcción antisentido 35S::*PEAM4AS*. (A) Número de hojas de plantas T<sub>2</sub> de varias líneas antisentido 35S::*PEAM4AS* con una inserción del T-DNA. Los valores representados se corresponden con la media del número total de hojas ± la desviación estándar calculada a partir de muestras de 8-10 plantas hemizigotas o de 2 a 4 plantas homocigotas de cada una de las líneas transgénicas. (B) Distribución de plantas T<sub>2</sub> de varias líneas antisentido 35S::*PEAM4AS* con más de una inserción del T-DNA respecto al número de hojas con que florecieron.**

Figura 48. (continuación)

**B**



floración mostrado por las plantas homo y hemizigotas con respecto a los controles fue muy similar, aunque en ambos casos éste fue ligeramente superior en las plantas hemizigotas; en contraste con estas observaciones, el retraso mostrado por las plantas homocigotas de la línea T-14 con respecto a las plantas control fue superior al mostrado por las hemizigotas de esta misma línea, y muy similar al mostrado por las plantas hemizigotas de las líneas T-12 y T-39.

Los resultados del análisis de las plantas T<sub>2</sub> de las líneas transgénicas antisentido 35S::*PEAM4AS* con más de una inserción del transgén (Figura 48B) mostraron que, mientras en la línea control todas las plantas analizadas florecieron tras producir entre 47-54 hojas, agrupándose, por tanto, exclusivamente en las dos primeras clases, la distribución de plantas de las distintas líneas antisentido 35S::*PEAM4AS* abarcaba, sin embargo, un intervalo más amplio. Entre las líneas transgénicas se podían distinguir claramente dos grupos: en el primer grupo se incluirían las líneas T-3 y la T-15; en ambas una pequeña fracción de las plantas T<sub>2</sub> se comportaban como los controles y florecían tras producir un número de hojas similar, mientras que el resto, la fracción más numerosa, florecían con un número de hojas superior al de las plantas control. En el segundo grupo, estarían incluidas las líneas T-13, T-22 y T-26; en ellas todas las plantas T<sub>2</sub> florecían con un mayor número de hojas que los controles y en algunos casos, como el de la línea T-22, aparecían plantas que florecían tras producir casi 30 hojas más que el control más tardío. Las flores de las líneas transgénicas antisentido 35S::*PEAM4AS* son normales e indistinguibles de las flores de las plantas control.

Por tanto, varias de las líneas transgénicas antisentido 35S::*PEAM4AS* analizadas en este trabajo (Figura 48A y B), con una o más inserciones del T-DNA, florecieron sensiblemente más tarde que los controles transformados sólo con el vector sin inserto.

## **2.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM4* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana***

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Columbia con la construcción 35S::*PEAM4* se generaron 30 transgénicas independientes resistentes a kanamicina. La mayor parte de las plantas transgénicas primarias no mostraban diferencias con respecto al fenotipo de las plantas control (transformadas con el vector sin inserto); sin embargo, se pudo identificar tres que presentaban un fenotipo alterado, mostrando un modesto adelanto del tiempo de floración, así como la conversión de algunas inflorescencias secundarias en flores.

Con el fin de determinar el número de *loci* en el que se había producido la inserción del T-DNA en las diferentes transgénicas, se analizó la segregación del transgén en la progenie de varias de las líneas transgénicas primarias 35S::*PEAM4* mediante el ensayo de resistencia a kanamicina. En la tabla 23 se muestran los resultados del análisis de segregación de ocho de las líneas transgénicas estudiadas en las que la inserción del gen *NPTII* se había producido en un único *locus*.

**Tabla 23. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis T<sub>2</sub> 35S::*PEAM4**.**

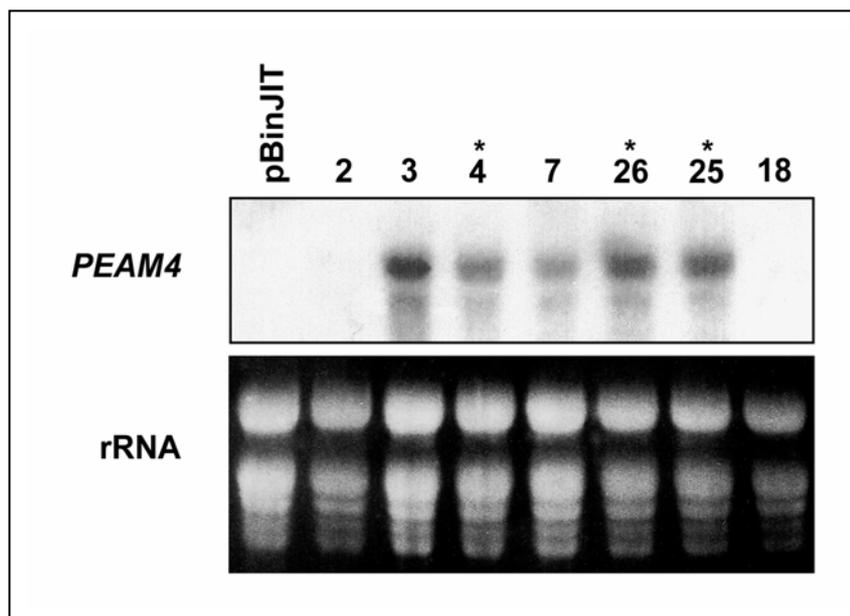
| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |     | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|-----|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | +                 | -   |              |                 |                |                            |           |
|         |                                     | (R)               | (S) |              |                 |                |                            |           |
| T-2     | 39                                  | 25                | 14  | 1'4/4        | 3:1             | 2'214          | 0'14                       | 1         |
| T-3     | 40                                  | 28                | 12  | 1'2/4        | 3:1             | 0'433          | 0'51                       | 1         |
| T-4*    | 42                                  | 31                | 11  | 1'1/4        | 3:1             | 0'032          | 0'86                       | 1         |
| T-7     | 42                                  | 29                | 13  | 1'2/4        | 3:1             | 0'667          | 0'41                       | 1         |
| T-13    | 40                                  | 27                | 13  | 1'3/4        | 3:1             | 1'033          | 0'31                       | 1         |
| T-18    | 41                                  | 28                | 13  | 1'3/4        | 3:1             | 0'837          | 0'36                       | 1         |
| T-25*   | 39                                  | 30                | 9   | 0'9/4        | 3:1             | 0'162          | 0'69                       | 1         |
| T-26*   | 40                                  | 26                | 11  | 1'1/4        | 3:1             | 1'900          | 0'17                       | 1         |
| Control | 41                                  | 0                 | 41  |              |                 |                |                            | 0         |

Las líneas que mostraban alteraciones fenotípicas se indican con un asterisco.

El nivel de expresión del transgén *PEAM4* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 49.

El análisis Northern mostró que la expresión del transgén *PEAM4* varía entre las distintas líneas transgénicas 35S::*PEAM4*. Se observaron niveles altos de expresión en la líneas transgénicas T-3, T-26 y T-25, intermedios en la línea T-4 y bajos en la línea T-7; no se detectó expresión ni en las líneas T-2 y T-18, ni en la línea control pBinJIT.

Estos resultados confirman que el transgén *PEAM4* se expresa constitutivamente en las tres líneas transgénicas 35S::*PEAM4* que presentaron alteraciones fenotípicas en la T<sub>1</sub>; sin embargo, algunas de las líneas donde no se detectó fenotipo alterado también mostraron expresión del transgén; las líneas donde no se detectó expresión del transgén no mostraron alteraciones fenotípicas.



**Figura 49. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM4* en plantas de *Arabidopsis thaliana* control y transformadas con la construcción 35S::*PEAM4*.** Línea control (pBinJIT) transformada con el vector sin inserto; líneas transgénicas 35S::*PEAM4*S (T-2 a T-26). En cada uno de los pocillos, se cargó 10  $\mu$ g de RNA total extraído de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación, se utilizó como sonda un fragmento *Xba*I de (767 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM4*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. El asterisco señala aquellas líneas que mostraron alteraciones fenotípicas.

Como se ha indicado anteriormente, entre las plantas transgénicas 35S::*PEAM4* de la población T<sub>1</sub>, solo se identificaron inicialmente tres líneas con fenotipo alterado con respecto al de las plantas control. Debido a la baja incidencia e intensidad de las alteraciones fenotípicas en la población T<sub>1</sub>, nos propusimos seleccionar líneas homocigotas a partir de las ocho plantas transgénicas 35S::*PEAM4* en las que se había visto que el T-DNA se hallaba insertado en un único *locus*, para ver si las alteraciones fenotípicas se incrementaban al hacerlo la dosis del transgén. Para determinar el efecto de la expresión ectópica de *PEAM4* sobre el fenotipo de las plantas de *Arabidopsis*, se analizaron plantas (T<sub>3</sub>) de cada una de las líneas homocigotas generadas.

### 2.2.1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *PEAM4* EN EL TIEMPO DE FLORACIÓN DE *Arabidopsis*

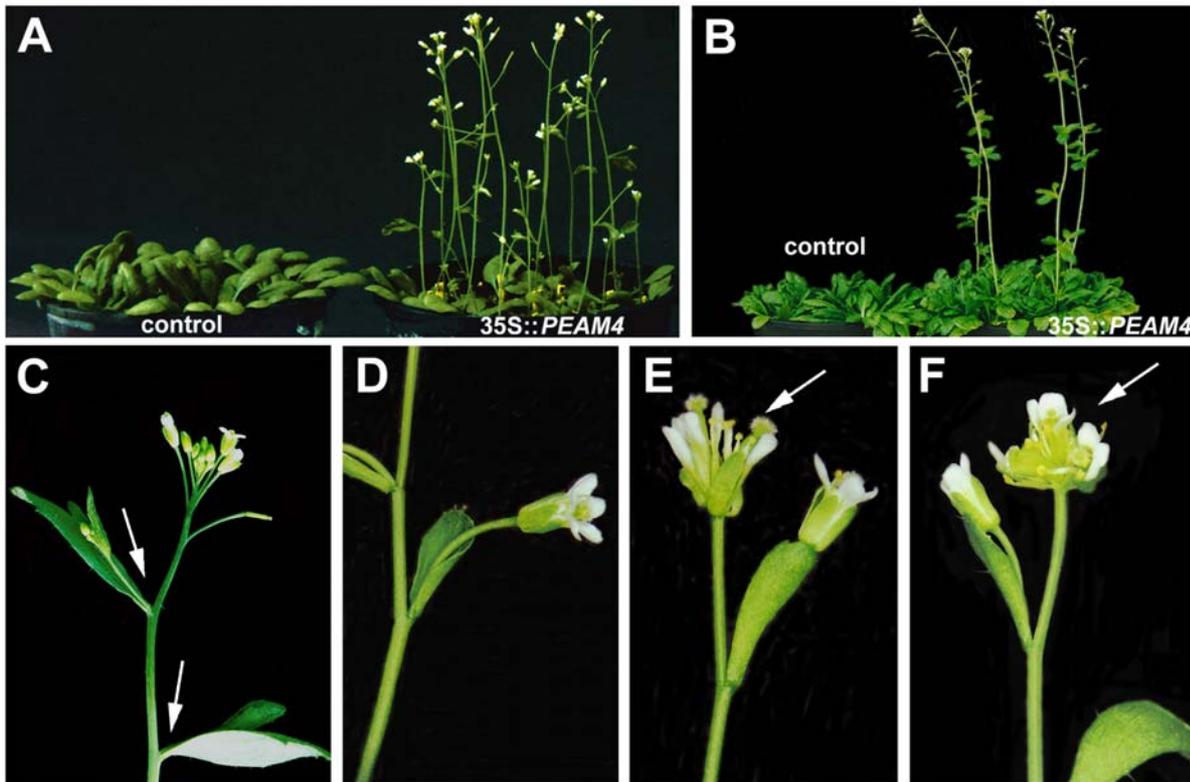
Se observó que las líneas transgénicas 35S::*PEAM4* T-4, T-25 y T-26, florecían tempranamente con respecto a los controles (transformados con el vector sin inserto) cuando se cultivaban bajo condiciones de día largo (16 h luz, 8 oscuridad, figura 50A) como

de día corto (8 h luz, 16 h oscuridad, figura 50B); el fenotipo de las otras cinco líneas homocigotas fue indistinguible de las plantas control.

Durante el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis thaliana* el meristemo apical del tallo da lugar a una roseta basal, como consecuencia de la producción reiterada de hojas en ausencia de elongación de entrenudos del tallo hasta el momento en el que se produce la inducción floral. Tras la inducción floral, poco después de la diferenciación de los primeros brotes florales en el ápice, se produce un incremento en la elongación de los entrenudos ("bolting") separándose las últimas hojas vegetativas formadas u hojas caulinares, de las hojas de roseta que permanecen en la base del tallo. Esto da lugar a la formación de una inflorescencia primaria de crecimiento indeterminado en la que, según la morfología de los nudos en la madurez, se distinguen dos fases: una fase temprana de inflorescencia ( $I_1$ ), caracterizada por la presencia de nudos que sostienen hojas caulinares cuyos meristemas axilares desarrollan tallos laterales de inflorescencia (coflorescencias), con patrón de crecimiento similar al de la inflorescencia principal, y una fase tardía de inflorescencia ( $I_2$ ), en la cual los nudos sostienen flores que no están sostenidas por hojas. Una vez formada la inflorescencia, los meristemas axilares de las hojas de roseta, pueden dar lugar a ramas laterales en las que se repite de nuevo la estructura de la inflorescencia principal y de las coflorescencias.

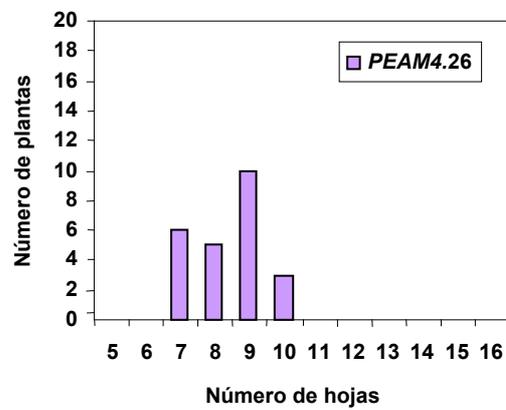
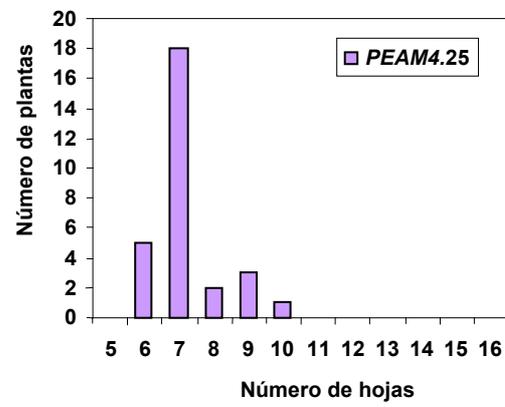
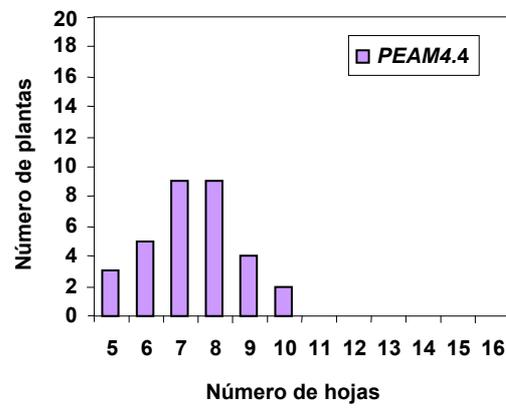
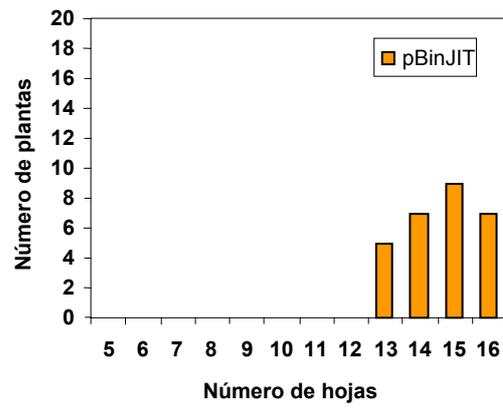
Se pudo estimar que, mientras que en las plantas control, bajo condiciones de día largo, la elongación del tallo de inflorescencia ocurre tras aproximadamente 4 semanas, en las plantas transgénicas 35S::PEAM4 esto ocurría después de unos 20 días. Bajo condiciones de día corto, la elongación del tallo se retrasa en los controles hasta aproximadamente unas 13-14 semanas después de la germinación, mientras que en las plantas transgénicas 35S::PEAM4 ocurre, aproximadamente, a las 9 semanas.

Con el fin de analizar el efecto de la expresión constitutiva de PEAM4 sobre el fenotipo de *Arabidopsis* se determinó el tiempo de floración de las distintas líneas transgénicas. En la figura 51 se representa la distribución de plantas de la población homocigota  $T_3$ , cultivadas bajo condiciones de LD, de las distintas líneas transgénicas, en función del número total de hojas producido; como se puede observar, mientras que las plantas control florecen tras producir entre unas 13-16 hojas, las plantas 35S::PEAM4 florecen antes, tras producir un número de hojas significativamente inferior que el control, que oscila entre 5-10, variando ligeramente entre las diferentes líneas transgénicas.



**Figura 50. Fenotipo de las plantas 35S::PEAM4 de *Arabidopsis*.** (A) Plantas homocigotas de una línea control (izquierda) y de la línea transgénica 35S::PEAM4.4 (derecha) de 25 días de edad cultivadas bajo condiciones de día largo. Nótese que mientras que las plantas transgénicas han florecido tras producir sólo unas pocas hojas, y ya han formado frutos, las plantas control continúan produciendo hojas de roseta y todavía no han florecido. (B) Plantas homocigotas de una línea control (izquierda) y de la línea transgénica 35S::PEAM4.4 (derecha) de 12 semanas de edad cultivadas bajo condiciones de día corto. (C) Estructura de la región apical del tallo principal de una planta control mostrando el ápice inflorescente, de crecimiento indeterminado, y tallos inflorescentes laterales que se desarrollan en las axilas de hojas caulinares (coflorescencias), cuyo patrón de crecimiento es similar al de la inflorescencia principal, señalados con flechas. (D) Detalle de una hoja caulinar curvada en el tallo principal de una planta 35S::PEAM4 sosteniendo, en lugar de una coflorescencia, una flor solitaria. Estas flores generalmente no muestran alteraciones morfológicas salvo, ocasionalmente, la formación de un pétalo extra, como se muestra aquí. (E) y (F) Estructura de la región apical del tallo principal de plantas homocigotas de las líneas 35S::PEAM4.4 y 35S::PEAM4.25, respectivamente, donde el ápice, se determina formando una flor terminal aberrante, señalada con flecha. Estas flores terminales muestran un considerable incremento del número de órganos florales con respecto a una flor control, número que varía entre las distintas plantas transgénicas. También se observan flores solitarias que se desarrollan en las axilas de hojas caulinares curvadas.

**Figura 51. Distribución de plantas homocigotas T<sub>3</sub> de varias líneas transgénicas 35S::PEAM4 cultivadas bajo condiciones de LD.** Los histogramas representan la distribución de plantas en cada población respecto al número de hojas con que florecieron.



Un resumen de los resultados de la cuantificación del tiempo de floración mediante los conteos del número de hojas realizados en las poblaciones homocigotas T<sub>3</sub> de las líneas de *Arabidopsis* 35S::PEAM4, cultivadas bajo condiciones de día largo y día corto, se muestra en las tablas 24 y 25, respectivamente. Como se muestra en las tablas, las líneas transgénicas que expresan constitutivamente el transgén PEAM4 florecen tempranamente tanto bajo condiciones de día largo como de día corto, tras producir un número de hojas significativamente inferior al de los controles cultivados bajo las mismas condiciones. Esta reducción del número de hojas de las líneas transgénicas afecta tanto a las hojas de roseta como a las caulinares, aunque el efecto es más drástico en la producción de hojas de roseta, con una reducción del 50-60% en día largo y del 40-50% en día corto, que en la producción de hojas caulinares donde la reducción oscila entre un 10-20% en día largo y un 10-30% en día corto. Esto indica que la expresión constitutiva de PEAM4 provoca un acortamiento de todas las fases de desarrollo de la plantas aunque su efecto es mayor sobre la fase de roseta.

### **2.2.2. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE PEAM4 SOBRE LA ARQUITECTURA DE *Arabidopsis***

Además del fenotipo evidente de adelanto de floración mostrado por las plantas 35S::PEAM4, éstas presentan también cambios en la arquitectura de la inflorescencia.

En una fracción de las plantas 35S::PEAM4 con floración temprana, la inflorescencia del tallo principal, que en una planta control presenta un crecimiento indeterminado (figura 50C), se determina prematuramente, tras producir algunas ramas laterales (coflorescencias) y flores, y da lugar al desarrollo de una flor terminal (Figura 50E y F; Tabla 24). La formación de flores terminales se produce con una frecuencia del 12'5% en la línea 35S::PEAM4.4, del 31% en la línea 35S::PEAM4.25 y no se observa en la línea 35S::PEAM4.26. Este mismo fenómeno también tiene lugar en algunas coflorescencias. Las flores terminales aparecen como una fusión de varias flores al final del tallo principal y, aunque su aspecto varía ligeramente entre las distintas líneas transgénicas analizadas, en general están formadas por dos o tres carpelos que ocupan el centro de la estructura, que tienden a curvarse ligeramente hacia afuera, un número variable de estambres, y rodeando a estos órganos se disponen los pétalos y sépalos, cuyo número tiende a reducirse, conservándose normalmente tres pétalos y tres sépalos por flor fusionada. Estas flores terminales son similares a las producidas por los mutantes *terminal flower1* o por las plantas 35S::AP1 (Mandel y Yanowfsky, 1995b; Shanon y Meeks-Wagner, 1991).

Tabla 24. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* en el fenotipo de *Arabidopsis* en plantas T<sub>3</sub> crecidas bajo condiciones de día largo (DL).

| Genotipo                          | n <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales | Flores terminales <sup>d</sup> | Flores axilares <sup>e</sup> | Hoja curvada R <sup>f</sup> | I <sup>g</sup> |
|-----------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|
| pBinJIT60 (control) <sup>h</sup>  | 28             | 11'8 ± 1'1                   | 2'8 ± 0'6                     | 14'6 ± 1'1    | 0                              | 0                            | 0                           | 0              |
| 35S:: <i>PEAM4.4</i> <sup>i</sup> | 32             | 5'2 ± 1'0                    | 2'2 ± 0'7                     | 7'4 ± 1'3     | 4                              | 14                           | 0                           | 10             |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i>             | 29             | 5 ± 0'8                      | 2'2 ± 0'4                     | 7'2 ± 1'0     | 9                              | 20                           | 0                           | 14             |
| 35S:: <i>PEAM4.26</i>             | 25             | 5'9 ± 0'7                    | 2'4 ± 0'5                     | 8'4 ± 1'0     | 0                              | 2                            | 1                           | 1              |

<sup>a</sup> n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> Número de plantas en las cuales el tallo principal acaba en una flor.

<sup>e</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en el tallo principal.

<sup>f</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la roseta (R).

<sup>g</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la inflorescencia (I).

<sup>h</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM4*.

<sup>i</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM4* numeradas 4, 25 y 26.

Tabla 25. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* en el fenotipo de *Arabidopsis* en plantas T<sub>3</sub> crecidas bajo condiciones de día corto (DC).

| Genotipo                         | n <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales |
|----------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|
| pBinJIT60 (control) <sup>d</sup> | 51             | 74'0 ± 6'0                   | 8'1 ± 1'0                     | 82 ± 6'3      |
| 35S:: <i>PEAM4.4e</i>            | 55             | 41'6 ± 8'6                   | 7'4 ± 1'8                     | 49 ± 9'7      |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i>            | 50             | 34'4 ± 9'6                   | 5'9 ± 1'7                     | 40'9 ± 11'0   |
| 35S:: <i>PEAM4.26</i>            | 42             | 46'4 ± 8'7                   | 6'7 ± 1'6                     | 53'2 ± 8'9    |

<sup>a</sup> n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM4*.

<sup>e</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM4* numeradas 4, 25 y 26.

Además, con bastante frecuencia se observa que en las plantas 35S::*PEAM4*, los meristemos laterales que se desarrollan en las axilas de las hojas caulinares, y que normalmente producirían tallos de inflorescencia, son sustituidos por flores solitarias, al igual que ocurre en las plantas 35S::*AP1* (Figura 50D, E y F; Tabla 24). Estas flores solitarias no muestran alteraciones morfológicas dramáticas, a excepción de que ocasionalmente presentan 5 pétalos (Figura 50D); al igual que las flores terminales, las flores axilares también son fértiles. El resto de flores de las líneas de floración temprana 35S::*PEAM4* de *Arabidopsis* son normales e indistinguibles de las flores de las plantas control.

Por tanto, la expresión constitutiva de *PEAM4* acelera la floración e induce la conversión de los meristemos inflorescentes del tallo en meristemos florales, reproduciendo el fenotipo causado por la expresión constitutiva de *AP1* (Mandel y Yanowfsky, 1995b).

En las plantas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM4* con floración temprana también se ha podido observar la presencia de hojas caulinares curvadas (enrolladas hacia el haz) (Figura 50D y E; Tabla 24), al igual que ocurre en las plantas 35S::*AP1* (Mandel y Yanowfsky, 1995b). La curvatura de las hojas caulinares se ha observado tanto en aquellas en cuya axila se desarrollan tallos laterales normales, como en las que sustentan flores solitarias, observándose más frecuentemente en éstas últimas. Ocasionalmente, se ha podido observar curvatura en alguna de las hojas de roseta de las plantas homocigotas de la línea 35S::*PEAM4.26* (Tabla 24)

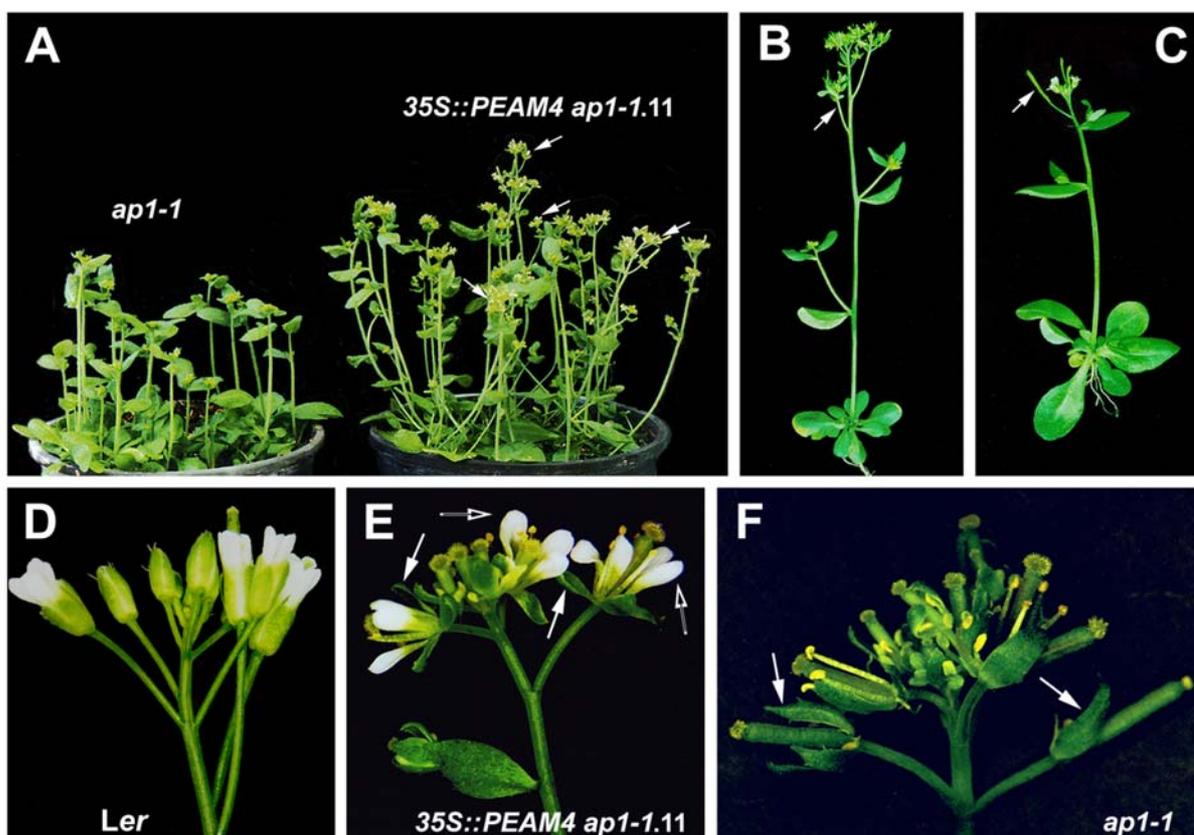
Aunque el fenotipo de las plantas 35S::*PEAM4* de *Arabidopsis* es similar al descrito para la expresión constitutiva de *AP1*, es bastante menos severo.

### **2.3. ESTUDIO FUNCIONAL DEL GEN *PEAM4* DE GUISANTE MEDIANTE LA COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DEL MUTANTE *ap1-1* DE *Arabidopsis thaliana***

Los datos de homología de secuencia y de patrón de expresión sugieren *PEAM4* es el homólogo funcional del gen *APETALA1* de *Arabidopsis*. Por ello otro abordaje experimental para el estudio de la función del gen *PEAM4* de guisante consistió en el intento de complementación de la mutación *ap1-1* de *Arabidopsis thaliana*.

En los mutantes fuertes *ap1-1*, en lugar de las flores basales de la inflorescencia se desarrollan inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas. En las posiciones más apicales estos mutantes desarrollan estructuras florales anormales. Estas flores exhiben una filotaxis verticilada como las flores normales aunque, debido a la incompleta inhibición de la formación de meristemos axilares, desarrollan flores secundarias ectópicas en las axilas de los órganos del primer verticilo, órganos que a su vez muestran transformación de sépalos a brácteas. Además, las flores del mutante *ap1-1* raramente producen pétalos (Bowman *et al.*, 1993; Irish y Sussex, 1990; Mandel *et al.*, 1992b; Schultz y Haughn, 1993).

Para ello, se transformaron plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Landsberg *erecta* homocigotas para la mutación fuerte *ap1-1*, con la construcción 35S::*PEAM4* (la misma que se utilizó para transformar plantas silvestres del ecotipo Columbia). Como resultado de la transformación se generaron 13 plantas independientes resistentes a kanamicina; seis de ellas mostraban alteraciones fenotípicas con respecto a las plantas control sin transformar. Estas plantas mostraban fenotipo de floración temprana, curvatura de las hojas, formación de flores terminales y axilares, y recuperación de pétalos (Figura 52).



**Figura 52. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* sobre el fenotipo del mutante *ap1-1* de *Arabidopsis thaliana*.** (A) Plantas homocigotas para la mutación fuerte *ap1-1* (izquierda) y plantas homocigotas de la línea transgénica 35S::*PEAM4 ap1-1.11* (derecha) cultivadas bajo condiciones de día largo; las líneas *ap1-1* que expresan constitutivamente *PEAM4* muestran adelanto de floración con respecto a las plantas *ap1-1*. Las flechas blancas señalan la presencia de pétalos en las flores de la línea 35S::*PEAM4 ap1-1.11*, ausentes en las plantas *ap1-1*. (B) Planta homocigota para la mutación fuerte *ap1-1*; la flecha señala la formación de una coflorescencia en la posición donde normalmente se producen flores en una planta silvestre. (C) Planta silvestre del ecotipo Landsberg *erecta*; la flecha señala la presencia de una flor (silicua) en la primera posición del tallo que sigue a la última hoja caulinar. (D) Ápice de la inflorescencia principal de una planta silvestre. (E) Ápice de la inflorescencia principal de una plantas homocigota de la línea 35S::*PEAM4 ap1-1.11*. Las flechas negras señalan la presencia de pétalos en el segundo verticilo de estas flores. Las flechas blancas señalan los órganos del primer verticilo con apariencia de sépalo. En la axila de una hoja caulinar se observa la presencia de una flor solitaria. (F) Ápice de la inflorescencia principal de una planta *ap1-1*. Las flechas blancas señalan los órganos florales con apariencia de bráctea en el primer verticilo. En el segundo verticilo no se detecta la presencia de ningún órgano.

## Resultados

Con el fin de determinar el número de *loci* en el que se había producido la inserción del T-DNA en las diferentes transgénicas, se analizó la segregación del transgén en las líneas 35S::*PEAM4 ap1-1* obtenidas (con y sin fenotipo alterado), mediante la siembra de semillas T<sub>2</sub> en medio con kanamicina. Los resultados del análisis de segregación se muestran en la tabla 26.

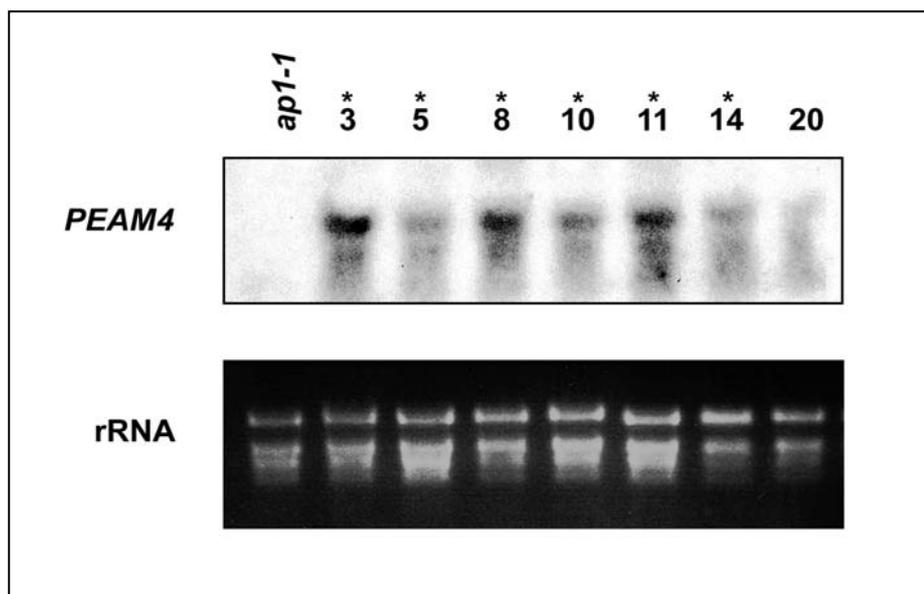
**Tabla 26. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis* T<sub>2</sub> 35S::*PEAM4 ap1-1*.**

| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |     |        | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|-----|--------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | +                 | -   |        |              |                 |                |                            |           |
|         |                                     | (R)               | (S) |        |              |                 |                |                            |           |
| T-1     | 23                                  | 19                | 4   | 0'7/4  | 3:1          | 0'971           | 0'32           | 1                          |           |
| T-2     | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-3*    | 25                                  | 17                | 8   | 1'3/4  | 3:1          | 0'520           | 0'47           | 1                          |           |
| T-5*    | 24                                  | 17                | 7   | 1'2/4  | 3:1          | 0'167           | 0'68           | 1                          |           |
| T-6     | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-8*    | 27                                  | 22                | 5   | 0'7/4  | 3:1          | 0'827           | 0'36           | 1                          |           |
| T-9     | 24                                  | 19                | 5   | 0'8/4  | 3:1          | 0'389           | 0'53           | 1                          |           |
| T-10*   | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-11*   | 27                                  | 19                | 8   | 1'2/4  | 3:1          | 0'235           | 0'63           | 1                          |           |
| T-14*   | 25                                  | 17                | 8   | 1'3/4  | 3:1          | 0'520           | 0'47           | 1                          |           |
| T-15    | 25                                  | 23                | 2   | 1'3/16 | 15:1         | 0'040           | 0'84           | 2                          |           |
| T-17    | 22                                  | 13                | 9   | 1'6/4  | 3:1          | 2'606           | 0'11           | 1                          |           |
| T-20    | 24                                  | 16                | 8   | 1'3/4  | 3:1          | 0'722           | 0'40           | 1                          |           |
|         | 26                                  | 0                 | 26  | 0      |              |                 |                | 0                          |           |
| Control |                                     |                   |     |        |              |                 |                |                            |           |

Las líneas que mostraban alteraciones fenotípicas se indican con un asterisco.

En todas las líneas transgénicas, excepto en la T-15, la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1 lo que indica la inserción del gen *NPTII* en un único locus. La segregación obtenida para la línea T-15 se ajusta a una inserción del transgén en dos *loci* diferentes.

El nivel de expresión del transgén *PEAM4* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 53.



**Figura 53. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM4* en plantas de la línea mutante *ap1-1* de *Arabidopsis thaliana* control y transformadas con la construcción *35S::PEAM4*.** Línea control *ap1-1* sin transformar; líneas transgénicas *35S::PEAM4 ap1-1* (T-3 a T-20). En cada una de los pocillos, se cargó 10  $\mu\text{g}$  de RNA total extraído de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación, se utilizó como sonda un fragmento *Xba*I de (767 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM4*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. El asterisco señala aquellas líneas que mostraron alteraciones fenotípicas.

El análisis Northern mostró que la expresión del transgén *PEAM4* varía entre las distintas líneas transgénicas *35S::PEAM4 ap1-1*. Se han observado niveles altos de expresión en la líneas transgénicas T-3, T-8 y T-11, intermedios en las líneas T-10 y T-14, bajo en la líneas T-5 y muy bajo, casi indetectable en la línea, T-20; no se detectó expresión de *PEAM4* en la línea control *ap1-1* sin transformar.

Estos resultados confirman, que el gen *PEAM4* se está expresando constitutivamente en las líneas transgénicas *35S::PEAM4 ap1-1* que presentan alteraciones fenotípicas; la línea T-20, donde apenas se detecta expresión del transgén, no mostró alteración fenotípica con respecto a las plantas control *ap1-1*.

Como se ha mencionado anteriormente, entre las plantas transgénicas *35S::PEAM4 ap1-1* se identificaron seis líneas que exhibían alteraciones fenotípicas con respecto a las plantas control. Para estudiar con más detalle el fenotipo de estas plantas, se seleccionaron plantas homocigotas de dos de estas líneas, la *35S::PEAM4 ap1-1.3* y la *35S::PEAM4 ap1-1.11* que son las que mostraron los fenotipos más acusados en la T<sub>1</sub>.

### 2.3.1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *PEAM4* EN EL TIEMPO DE FLORACIÓN DEL MUTANTE *ap1-1* DE *Arabidopsis*

Para cuantificar el efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* sobre el fenotipo del mutante *ap1-1* se determinó el tiempo de floración de las plantas homocigotas T<sub>3</sub> de estas dos líneas 35S::*PEAM4 ap1-1* así como, a efectos comparativos, de plantas *ap1-1* transformadas con la construcción 35S::*AP1*; para ello se contabilizó el número de hojas producido por el tallo principal de plantas crecidas bajo condiciones de día largo.

Un resumen de los resultados de la cuantificación del tiempo de floración se muestra en la tabla 27. Como se puede observar, mientras que la producción de hojas no está alterada en el mutante *ap1-1* con respecto a las plantas silvestres del ecotipo *Ler*, las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1* florecen temprano, tras producir un número total de hojas significativamente inferior que las plantas *ap1-1* crecidas bajo las mismas condiciones (Figura 52A; Tabla 27). Esta reducción del número total de hojas observada en las líneas transgénicas 35S::*PEAM4 ap1-1* es el reflejo de una reducción en la producción de hojas de roseta. Esta reducción oscila entre un 40-50% con respecto a los controles *ap1-1*; valores similares, en torno a un 40%, se encontraron para las plantas 35S::*AP1 ap1-1*. Sin embargo, curiosamente, tanto las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1* como las plantas 35S::*AP1 ap1-1* muestran un ligero aumento en la producción de hojas de inflorescencia con respecto a los controles *ap1-1* con valores que rondan el 20%. Estos resultados sugieren que la expresión constitutiva de *PEAM4* genera un acortamiento en la duración de la fase de roseta pero no de la fase de inflorescencia temprana, donde incluso se ha observado que se produce un cierto alargamiento.

### 2.3.2. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *PEAM4* SOBRE LA ARQUITECTURA DE LA INFLORESCENCIA DEL MUTANTE *ap1-1* DE *Arabidopsis*

Además del fenotipo de adelanto de floración mostrado por las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1*, éstas presentan también cambios en la estructura de la inflorescencia.

En el mutante *ap1-1* (Figuras 52B y 54A), aquellos meristemas que en una planta silvestre normalmente darían lugar a una flor individual producen una gama muy variada de estructuras ramificadas. Las estructuras ramificadas que podemos encontrar más frecuentemente en las posiciones basales de la inflorescencia se describen a continuación (Figura 54B y C). Las típicas flores de los mutantes *ap1-1* son estructuras ramificadas determinadas (Figura 54C, a) que se componen de una flor “primaria” central con flores adicionales, que surgen en las axilas de los órganos del primer verticilo de la flor primaria y

**Tabla 27. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* en el fenotipo del mutante *ap1-1* de *Arabidopsis*.**

| Genotipo                                | n <sup>a</sup> | Hojas de            | Hojas de                | Hojas     | Hoja curvada   |                |                  | Coflorescencias <sup>g</sup> | Flores                | Grado de ramificación |                     |                     | Flores                  | Pétalos                   |
|---|----------------|---------------------|-------------------------|-----------|----------------|----------------|------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|
|   |                | roseta <sup>b</sup> | caulinares <sup>c</sup> | totales   | R <sup>d</sup> | I <sup>e</sup> | R+I <sup>f</sup> |                              | Axilares <sup>h</sup> | Flor 1 <sup>i</sup>   | Flor 2 <sup>j</sup> | Flor 3 <sup>k</sup> | terminales <sup>l</sup> | (flores 1-5) <sup>m</sup> |
| <i>Ler</i>                              | 15             | 5'4 ± 0'5           | 2'2 ± 0'4               | 7'6 ± 0'6 | 0              | 0              | 0                | 2'2 ± 0'4                    | 0                     | 1                     | 1                   | 1                   | 0                       | 20 ± 0                    |
| <i>ap1-1</i>                            | 10             | 5'6 ± 0'5           | 2'2 ± 0'4               | 7'8 ± 0'7 | 0              | 0              | 0                | 7'1 ± 1'4                    | 0                     | 2'3 ± 0'5             | 2'2 ± 0'4           | 2 ± 0               | 0                       | 0                         |
| 35S:: <i>AP1 ap1-1</i>                  | 14             | 3'1 ± 0'5           | 2'6 ± 0'5               | 5'8 ± 0'4 | 0              | 1              | 13               | 0'8 ± 0'7                    | 13                    | 1'6 ± 0'9             | 1'6 ± 0'5           | 1'6 ± 0'5           | 5                       | 15 ± 4'9                  |
| 35S:: <i>PEAM4 ap1-1.3</i> <sup>n</sup> | 18             | 3'4 ± 0'5           | 2'6 ± 0'5               | 6'0 ± 0'5 | 0              | 7              | 11               | 2'3 ± 0'5                    | 4                     | 1'7 ± 0'4             | 1'9 ± 0'5           | 1'5 ± 0'5           | 6                       | 8'9 ± 2'6                 |
| 35S:: <i>PEAM4 ap1-1.11</i>             | 17             | 3 ± 0'3             | 2'6 ± 0'5               | 5'6 ± 0'5 | 0              | 11             | 6                | 2'5 ± 0'5                    | 2                     | 1'4 ± 0'5             | 1'6 ± 0'5           | 1'4 ± 0'5           | 9                       | 9'1 ± 2'6                 |

<sup>a</sup> n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la roseta (R).

<sup>e</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la inflorescencia (I).

<sup>f</sup> Número de plantas que presentan hoja curvada tanto en la roseta como en la inflorescencia (R + I).

<sup>g</sup> Estructuras inflorescentes que se desarrollan desde las axilas de las hojas de inflorescencia (Figura 54, posición I y II) o directamente del tallo principal (Figura 54).

<sup>h</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias (al menos una) sostenidas por una hoja de inflorescencia en el tallo principal.

<sup>i</sup> Grado de ramificación de la 1<sup>o</sup> estructura determinada que se observa después de la última coflorescencia<sup>g</sup>: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>j</sup> Grado de ramificación de la 2<sup>a</sup> estructura determinada que se observa después de la última coflorescencia<sup>g</sup>: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>k</sup> Grado de ramificación de la 3<sup>a</sup> estructura determinada que se observa después de la última coflorescencia<sup>g</sup>: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>l</sup> Número de plantas en las cuales el tallo principal acaba en una flor.

<sup>m</sup> Número de pétalos contados en las cinco primeras flores laterales del tallo inflorescente principal no sostenidas por hojas de inflorescencia.

<sup>n</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM4 ap1-1* numeradas como 3 y 11.

que dan lugar a una estructura denominada de 2º orden (Figura 54C, b). A su vez, estas flores secundarias pueden dar lugar también a la formación de flores en las axilas de los órganos de su primer verticilo y así sucesivamente formándose flores terciarias (de 3º orden; Figura 54C, c) e incluso cuaternarias. En conjunto se forma una estructura ramificada compleja, cuyo grado de ramificación, orden, viene especificado por el tipo de flores que forma. En este contexto una flor se define como la estructura similar a una flor que acaba en un gineceo. Por ejemplo, si una flor primaria tiene una estructura como una flor en la axila de cada uno de los órganos que ocupan el primer verticilo, el número de flores por pedicelo sería de cinco y la estructura resultante se define como de 2º orden.

A veces se pueden desarrollar inflorescencias ectópicas directamente de los pedicelos de estas “flores *ap1-1*”. Estas inflorescencias, que reciben el nombre de “inflorescencias pedicelares”, surgen por debajo de los órganos del primer verticilo de las flores primarias de las estructuras determinadas ramificadas (Figura 54B, a); ocasionalmente estas inflorescencias, que normalmente no se hayan sustentadas por ningún órgano, surgen de las axilas de unos órganos con apariencia de hojas caulinares.

El meristemo floral en sí mismo se comporta muchas veces como un típico meristemo de inflorescencia produciendo un número indeterminado de flores en filotaxis espiral. Este meristemo inflorescente se denomina de segundo orden (siendo de primer orden el meristemo inflorescente apical) y la inflorescencia que resulta se denomina de segundo orden (Figura 54B, b). A veces, sobre éstas también se producen meristemos inflorescentes de tercer orden y en consecuencia se generan inflorescencias de tercer orden (Figura 54B, c).

Las posiciones más apicales de la inflorescencia principal tienden a ser ocupadas por flores individuales *ap1-1* (que muestran defectos en la especificación del primer y segundo verticilo) sin ramificación (de 1º orden) y se representan en la figura 54C, a.

En el mutante *ap1-1* las coflorescencias que surgen de las axilas de las hojas caulinares (Figura 54A, I y II) se desarrollan reiterando el patrón de desarrollo de la inflorescencia principal.

Como se ha indicado previamente, la mutación *ap1-1* causa transformaciones parciales de las flores en inflorescencias. Con objeto de cuantificar el efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* sobre la arquitectura de la inflorescencia de las plantas *ap1-1*, se contabilizó el número total de estructuras inflorescentes (coflorescencias) presentes en la inflorescencia principal (en las posiciones basales), sostenidas o no por hojas caulinares, cuyas posiciones están señaladas en el esquema de la figura 54A con números romanos. Como estructuras inflorescentes no sostenidas por hojas caulinares, se consideraron las estructuras mostradas en la figura 54B (b y c), donde el meristemo floral se comporta como un

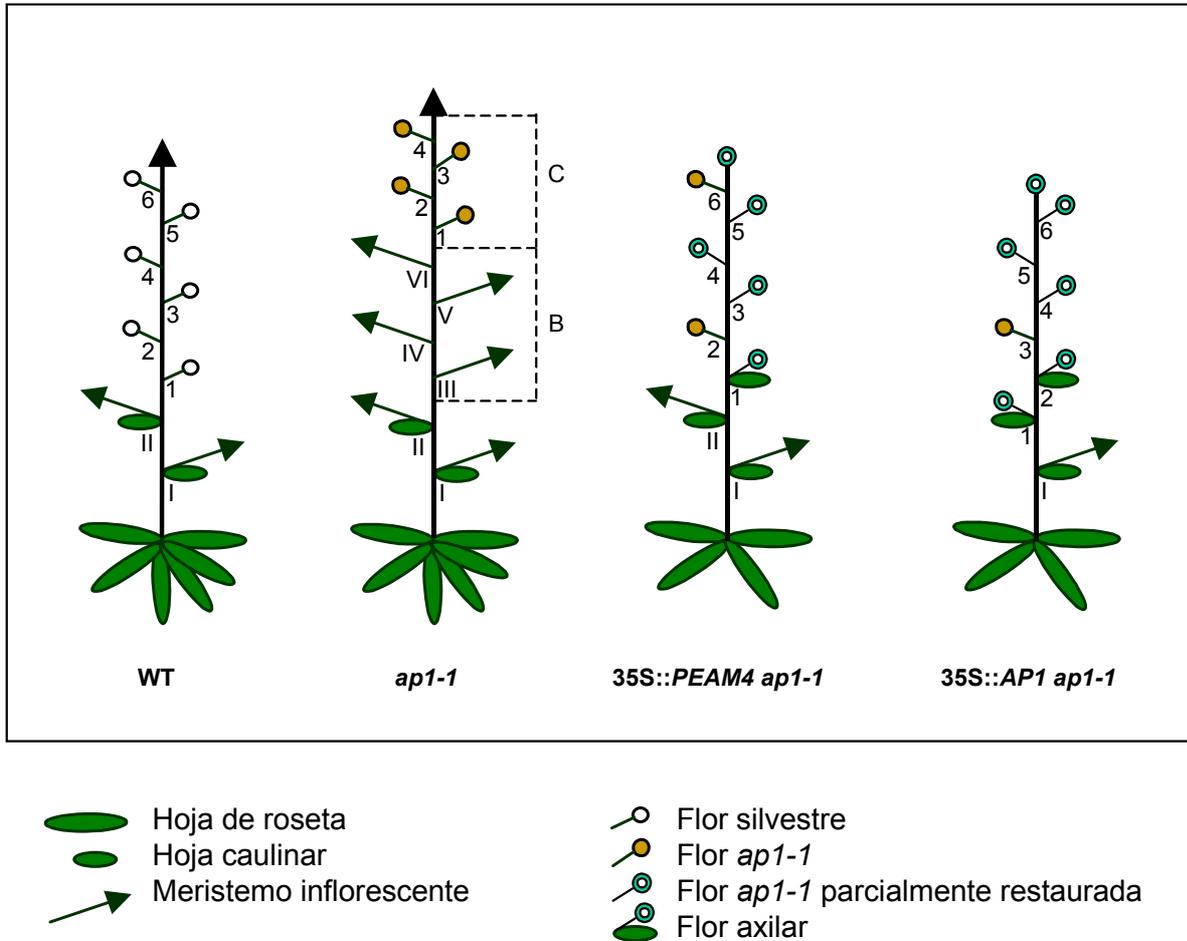
verdadero meristemo inflorescente indeterminado. También se incluyeron dentro de esta categoría de coflorescencias las estructuras determinadas que incluyen inflorescencias pedicelares de desarrollo indeterminado mostradas en la figura 54B (a). Los resultados de los conteos realizados sobre plantas cultivadas en día largo se resumen en la tabla 27 en la columna de coflorescencias. Las líneas 35S::*PEAM4 ap1-1.3* y 35S::*PEAM4 ap1-1.11* muestran una importante reducción del número de coflorescencias presentes en la inflorescencia principal, con respecto al mutante *ap1-1*. Esta reducción en el número total de coflorescencias es del orden de un 70% para la línea 35S::*PEAM4 ap1-1.3* y de un 60% para la línea 35S::*PEAM4 ap1-1.11* y se puede explicar en base a dos observaciones. En primer lugar, en estas dos líneas no se observó la presencia de estructuras inflorescentes de ninguno de los tipos descritos previamente que no se hallaran sostenidas por hojas caulinares (Figura 54A). En segundo lugar, en una fracción de plantas de cada una de las líneas, los meristemos que se desarrollan en las axilas de las hojas caulinares dieron lugar a flores solitarias, que, por tanto, no se contabilizan dentro de la categoría de coflorescencias (Figura 54A). Estas dos observaciones, nos permiten explicar que el número medio de coflorescencias sea inferior al valor medio de hojas caulinares. El descenso en el número total de coflorescencias, aunque de una manera más drástica, se observó también en la línea 35S::*AP1 ap1-1*, donde la reducción alcanzó un valor en torno al 90%, explicable también de la misma manera que para las líneas 35S::*PEAM4 ap1-1*; en 35S::*AP1 ap1-1* la frecuencia de flores solitarias sostenidas por hojas caulinares es más alta y por tanto la reducción en el valor del número de coflorescencias es mayor (Figura 54A; Tabla 27).

También se quiso determinar el efecto de la expresión constitutiva de *PEAM4* sobre el orden de ramificación de las estructuras determinadas tipo “flores *ap1-1*” (Figura 54C), que se desarrollan en la inflorescencia principal. Para ello, para cada una de las líneas analizadas, se calculó el orden medio de ramificación de la primera estructura determinada que se desarrolló después de la última coflorescencia (sostenida o no por hoja caulinar) y a la que se denominó “flor 1”; lo mismo para la segunda y tercera flor, a las que se denominó “flor 2” y “flor 3”. Estas posiciones vienen indicadas con números árabes en la figura 54A.

En general, se observó una reducción en el orden de ramificación de las estructuras determinadas que se desarrollan en las líneas 35S::*PEAM4 ap1-1* en las tres posiciones analizadas con respecto al control *ap1-1*. Mientras que en las plantas *ap1-1* el orden medio de ramificación de las “flores” 1-3 oscila entre 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> orden, en las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1* oscila entre 1<sup>er</sup>-2<sup>o</sup> orden. Esta reducción también se observó en la línea 35S::*AP1 ap1-1*, que muestra valores muy similares a los de las plantas *ap1-1* que expresan constitutivamente *PEAM4*.

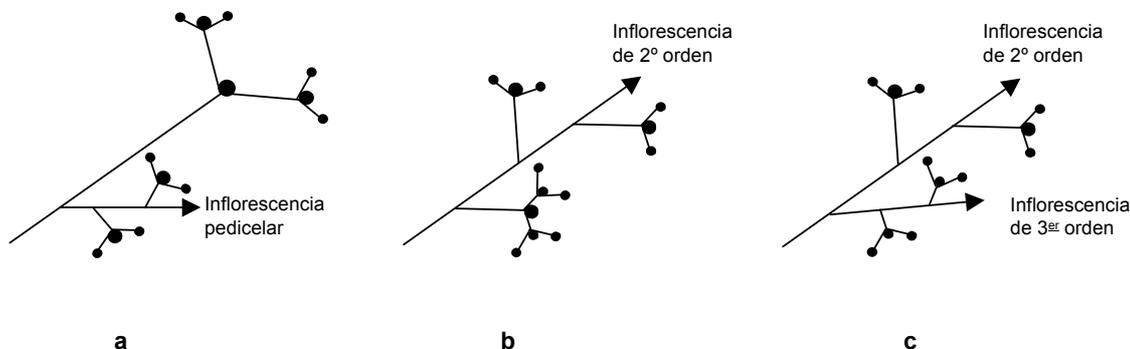
**Figura 54. Comparación de las estructuras inflorescentes y florales presentes en las posiciones basales de plantas de genotipo silvestre, del mutante *ap1-1*, y del mutante *ap1-1* expresando constitutivamente *PEAM4* o *AP1*.**

(A) Representación esquemática de la arquitectura de una planta silvestre, del mutante *ap1-1*, de *35S::PEAM4 ap1-1* y de *35S::AP1 ap1-1*.



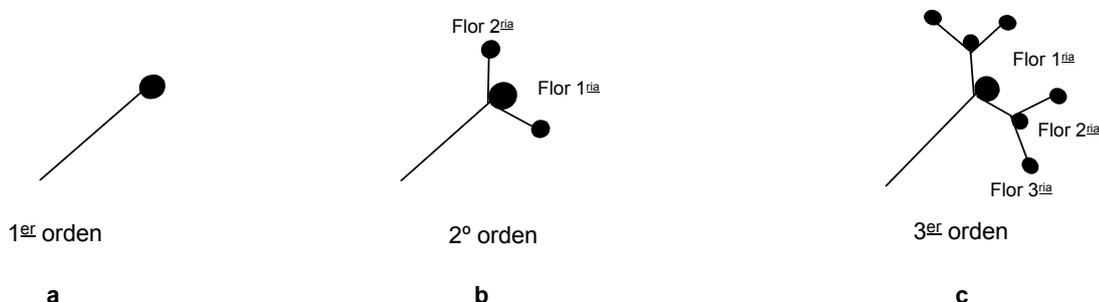
Los números romanos marcan las posiciones de la inflorescencia principal que se hallan ocupadas por coflorescencias, sustentadas o no por hojas caulinares. Los números árabes señalan las posiciones de la inflorescencia principal que se hallan ocupadas por estructuras florales. Las inflorescencias que surgen de las axilas de las hojas caulinares tienen un patrón de desarrollo similar al de la inflorescencia principal. La línea discontinua señala las posiciones en el mutante *ap1-1* en las que se desarrollan estructuras inflorescentes no sostenidas por hojas caulinares, cuyos tipos se muestran en el panel B, o flores modificadas, cuyos tipos se muestran en C.

(B) Representación de los diferentes tipos de coflorescencias no sostenidas por hojas caulinares que aparecen en el tallo principal del mutante *ap1-1* (posiciones III, IV, V...).



(a) Inflorescencia pedicelar que se desarrolla en una estructura ramificada determinada. (b) Inflorescencia de segundo orden (siendo de primer orden la inflorescencia principal), una estructura que normalmente sería un meristemo floral se comporta como un meristemo inflorescente. (c) Inflorescencia de segundo orden con una inflorescencia de tercer orden.

(C) Tipos de "flores *ap1-1*" (estructuras ramificadas determinadas), ordenadas en función del grado de ramificación que muestran.



(a) Flor *ap1-1* de 1<sup>er</sup> orden: flor sin ramificación pero con los defectos específicos típicos de las flores *ap1-1* en la especificación de sépalos y pétalos. (b) Flor *ap1-1* de 2<sup>o</sup> orden: flor primaria con flores secundarias desarrolladas en las axilas de los órganos de su primer verticilo. (c) Las flores secundarias desarrollan flores terciarias en las axilas de los órganos de su primer verticilo.

En una fracción de las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1* analizadas el meristemo de inflorescencia del tallo principal, que en una planta control *ap1-1* presentan un crecimiento indeterminado, se determina prematuramente y tras producir algunas coflorescencias y "flores", da lugar a una flor terminal (Tabla 27). Este mismo fenómeno de determinación del meristemo apical del tallo se ha observado también en la línea 35S::*AP1 ap1-1*, donde la

frecuencia de aparición de estas estructuras terminales es ligeramente superior que en las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1*. Las flores terminales de estas plantas suelen consistir en una estructura carpeloide.

Tal y como se mencionó anteriormente, se observó que en las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1* ocasionalmente los meristemas laterales que se desarrollan en las axilas de las hojas caulinares, que normalmente en las plantas *ap1-1* producirían coflorescencias, son reemplazados por flores solitarias (Figuras 52E y 54A; Tabla 27). Estas flores axilares se presentan como flores individuales sin ramificación, flor de 1<sup>er</sup> orden (Figura 54C, a), o como las típicas estructuras determinadas ramificadas “flores *ap1-1*” con grado de ramificación de 2<sup>o</sup> orden (Figura 54C, b). En la línea 35S::*AP1 ap1-1*, también se han observado este tipo de estructuras, y la frecuencia de plantas en las que aparecen se incrementa considerablemente; en esta línea es además muy frecuente la aparición de varias de estas flores en cada planta, en concordancia con la drástica reducción en el número de coflorescencias (Tabla 27).

Otra de las características fenotípicas mostradas por las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1* es la curvatura (hacia el haz) en alguna de sus hojas (Tabla 27). Este fenotipo se ha observado en todas las líneas analizadas en este trabajo, si bien algunas plantas sólo muestran curvatura en las hojas caulinares, mientras que en otras se ha identificado la presencia simultánea de hojas curvadas de roseta y de inflorescencia en la misma planta. Entre las hojas caulinares, la curvatura se ha observado tanto en aquellas en cuya axila se desarrollan coflorescencias, como en las que sostienen flores solitarias, siendo más frecuentes en estas últimas.

### **2.3.3. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *PEAM4* SOBRE EL FENOTIPO FLORAL DEL MUTANTE *ap1-1* DE *Arabidopsis***

Otro de los efectos de la mutación *ap1-1*, es sobre la especificación de los órganos florales, afectando al desarrollo de los sépalos y de los pétalos. En las flores *ap1-1* el segundo verticilo está ausente y los órganos que aparecen en el primer verticilo tienen unas características que lo hacen más similares a brácteas que a sépalos. En algunas de las flores presentes en la plantas de las líneas 35S::*PEAM4 ap1-1* el verticilo de sépalos se hallaba parcial o completamente restaurado (Figuras 52E y 54A). Con el objeto de cuantificar el efecto de la expresión ectópica de *PEAM4* en el rescate del segundo verticilo de las plantas *ap1-1*, se contabilizó el número de pétalos producidos en las cinco primeras flores de la inflorescencia principal no sostenidas por hoja caulinar. Mientras que en las plantas *ap1-1* no se detectaron pétalos en ninguna de las flores de las posiciones

analizadas, éstos se observaron con relativa frecuencia entre las plantas homocigotas de las líneas 35S::*PEAM4 ap1-1.3* y 35S::*PEAM4 ap1-1.11* (Tabla 27). En estas plantas se podían encontrar flores que habían recuperado un número variable de pétalos, que podía oscilar desde solamente uno, hasta flores completamente restauradas mostrando cuatro pétalos normales; las flores parcialmente rescatadas eran, sin embargo, más frecuentes. Aunque la recuperación de órganos del segundo verticilo fue evidente, tal como lo reflejan los resultados del análisis cuantitativo, esta recuperación era menor que la observada en las plantas 35S::*AP1 ap1-1*.

Aunque nosotros no observamos la presencia de pétalos en ninguna de las flores del mutante *ap1-1* analizadas, tal y como ya se ha descrito previamente para este mutante (Bowman *et al.*, 1993), en posiciones muy apicales del tallo de inflorescencia ocasionalmente aparece alguna flor con algún pétalo.

Se observó también que en las flores 35S::*PEAM4 ap1-1* que exhiben un mayor grado de recuperación de pétalos, la apariencia de los órganos del primer verticilo es más parecida a verdaderos sépalos que a la de los órganos bracteoides normalmente presentes en posiciones equivalentes de las flores *ap1-1* (Figura 52E y F). Mientras que en las flores *ap1-1* los órganos del primer verticilo presentan una morfología alargada y puntiaguda, intermedia entre sépalo y hoja, con estípulas en los márgenes laterales y sin un peciolo definido, los órganos del primer verticilo de las flores restauradas de las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1*, son más cortos, con forma cóncava, donde la región distal tiende a ser redondeada en lugar de puntiaguda y no presentan estípulas, características que en conjunto recuerdan más a un sépalo que a la “bráctea” típica del primer verticilo de las “flores *ap1-1*”.



### 3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM6* MEDIANTE SU EXPRESIÓN CONSTITUTIVA EN SISTEMAS TRANSGÉNICOS HETERÓLOGOS

Estudios previos a este trabajo llevados a cabo en nuestro laboratorio (Ferrándiz, 1996), mostraron que *PEAM6* (*Pea MADS 6*) es un gen de la familia MADS de guisante que presenta homología de secuencia con los genes *SEPALLATA1* (*SEP1*) y *SEPALLATA2* (*SEP2*) de *Arabidopsis* (previamente denominados *AGL2* y *AGL4*, Ma *et al.*, 1991). Varias evidencias experimentales sugieren una posible correlación del gen *PEAM6* con la mutación recesiva *vegetative1* (*veg1*; Gottschalk, 1979; Reid y Murfet, 1984); las plantas homocigotas para dicha mutación nunca florecen, bajo ninguna de las condiciones testadas, y en ellas todas las inflorescencias laterales se hallan reemplazadas por ramas vegetativas. *PEAM6* se localiza al final del cromosoma 5, estrechamente ligado al gen *VEG1* y, además, *PEAM6* está delecionado del genoma del mutante *veg1*. El estudio de expresión de *PEAM6* (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001) mostró que *PEAM6* es específico de meristemos florales, no detectándose expresión del mismo en órganos vegetativos ni en meristemos inflorescentes. Su mensajero se detecta uniformemente en los meristemos florales desde el comienzo de su formación y posteriormente su expresión se detecta de manera uniforme en todos los órganos florales en desarrollo. La expresión de *PEAM6* disminuye gradualmente en los primordios de sépalos a partir del estadio 4 y en flores maduras su expresión se detecta en pétalos, filamentos de estambres y carpelo, acumulándose principalmente en los óvulos.

La correlación entre la mutación *veg1* y el gen *PEAM6*, así como la expresión específica y temprana de este gen en los meristemos florales, resulta coherente con la hipótesis de un papel de este gen en la iniciación floral de guisante. Para testar esta hipótesis, en este trabajo se ha utilizado la expresión de *PEAM6* en sistemas transgénicos heterólogos (*Arabidopsis* y tabaco) como herramienta para el estudio de su función.

Para ello, un cDNA de *PEAM6* de 1162 pb, que contiene toda la región codificante, se clonó como una fusión transcripcional al promotor 2x35S CaMV (Benfey *et al.*, 1990) en el vector binario de expresión en plantas pBinJIT60.

### 3.1 ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM6* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*

#### 3.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis*, ECOTIPO Columbia, 35S::*PEAM6*

Como resultado de la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Columbia (Col) con la construcción 35S::*PEAM6* se obtuvieron 49 plantas transgénicas independientes resistentes a kanamicina; siete de ellas mostraron un fenotipo alterado, con adelanto del tiempo de floración y conversión de algunas inflorescencias en flores, mientras que el resto no mostraron diferencias con respecto al fenotipo de las plantas control.

Con el fin de determinar el número de *loci* en el que se había producido la inserción del T-DNA se llevó a cabo un análisis de segregación de varias de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T<sub>2</sub> en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y de las distintas plantas transgénicas. Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 28.

**Tabla 28. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ecotipo Col, T<sub>2</sub> 35S::*PEAM6*.**

| Línea | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |       | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|-------|-------------------------------------|-------------------|-------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|       |                                     | + (R)             | - (S) |              |                 |                |                            |           |
| T-1   | 25                                  | 19                | 6     | 1'0/4        | 3:1             | 0'093          | 0'76                       | 1         |
| T-3   | 24                                  | 19                | 5     | 0'8/4        | 3:1             | 0'389          | 0'53                       | 1         |
| T-4   | 24                                  | 18                | 6     | 1'0/4        | 3:1             | 0'056          | 0'81                       | 1         |
| T-6   | 26                                  | 19                | 7     | 1'1/4        | 3:1             | 0'051          | 0'82                       | 1         |
| T-7*  | 17                                  | 16                | 1     | 0'9/16       | 15:1            | 0'337          | 0'56                       | 2         |
| T-8   | 24                                  | 17                | 7     | 1'2/4        | 3:1             | 0'167          | 0'68                       | 1         |
| T-9   | 28                                  | 28                | 0     |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-10* | 42                                  | 31                | 11    | 1'1/4        | 3:1             | 0'032          | 0'86                       | 1         |
| T-12  | 25                                  | 24                | 1     | 0'6/16       | 15:1            | 0'761          | 0'38                       | 2         |
| T-13  | 25                                  | 19                | 6     | 1'0/4        | 3:1             | 0'093          | 0'76                       | 1         |
| T-15  | 20                                  | 20                | 0     |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-17  | 24                                  | 24                | 0     |              |                 |                |                            | ≥2        |
| T-18* | 24                                  | 23                | 1     | 0'7/16       | 15:1            | 0'667          | 0'41                       | 2         |

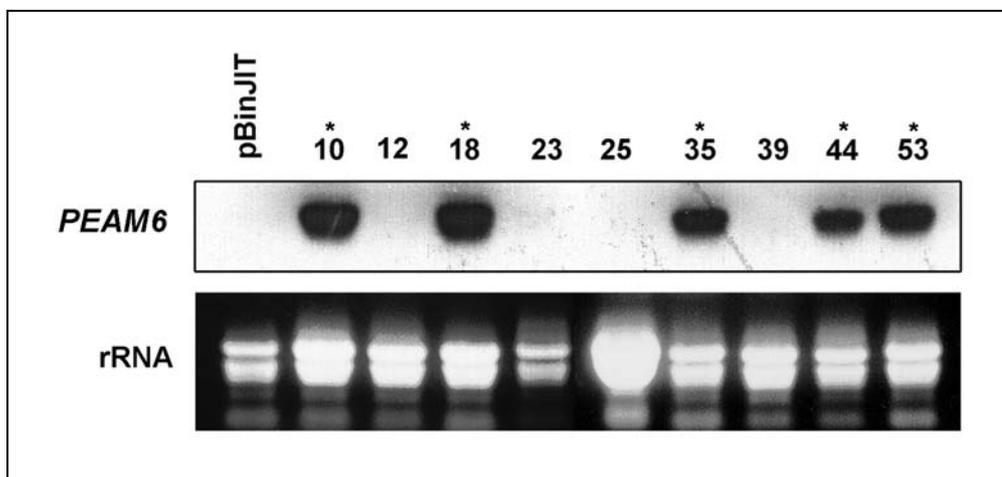
**Tabla 28 (continuación). Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ecotipo Col, T<sub>2</sub> 35S::PEAM6.**

| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |     |        | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|-----|--------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | +                 | -   |        |              |                 |                |                            |           |
|         |                                     | (R)               | (S) |        |              |                 |                |                            |           |
| T-20    | 41                                  | 29                | 12  | 1'2/4  | 3:1          | 0'317           | 0'57           | 1                          |           |
| T-22    | 41                                  | 28                | 13  | 1'3/4  | 3:1          | 0'837           | 0'36           | 1                          |           |
| T-24    | 24                                  | 16                | 8   | 1'3/4  | 3:1          | 0'722           | 0'40           | 1                          |           |
| T-25    | 23                                  | 18                | 5   | 0'9/4  | 3:1          | 0'154           | 0'69           | 1                          |           |
| T-26    | 26                                  | 20                | 6   | 0'9/4  | 3:1          | 0'167           | 0'68           | 1                          |           |
| T-27    | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-28    | 25                                  | 16                | 9   | 1'4/4  | 3:1          | 1'373           | 0'24           | 1                          |           |
| T-33    | 25                                  | 19                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'093           | 0'76           | 1                          |           |
| T-35*   | 40                                  | 29                | 11  | 1'1/4  | 3:1          | 0'100           | 0'75           | 1                          |           |
| T-36    | 25                                  | 24                | 1   | 0'6/16 | 15:1         | 0'767           | 0'38           | 2                          |           |
| T-37    | 28                                  | 28                | 0   |        |              |                 |                | ≥2                         |           |
| T-39    | 24                                  | 19                | 5   | 0'8/4  | 3:1          | 0'389           | 0'53           | 1                          |           |
| T-42    | 23                                  | 18                | 5   | 0'9/4  | 3:1          | 0'275           | 0'60           | 1                          |           |
| T-43    | 27                                  | 19                | 8   | 1'2/4  | 3:1          | 0'235           | 0'63           | 1                          |           |
| T-44*   | 42                                  | 30                | 12  | 1'1/4  | 3:1          | 0'222           | 0'64           | 1                          |           |
| T-45    | 25                                  | 18                | 7   | 1'1/4  | 3:1          | 0'101           | 0'75           | 1                          |           |
| T-47    | 26                                  | 21                | 5   | 0'8/4  | 3:1          | 0'667           | 0'41           | 1                          |           |
| T-48    | 24                                  | 19                | 5   | 0'8/4  | 3:1          | 0'389           | 0'53           | 1                          |           |
| T-49    | 41                                  | 28                | 13  | 1'3/4  | 3:1          | 0'837           | 0'36           | 1                          |           |
| T-50    | 24                                  | 18                | 6   | 1'0/4  | 3:1          | 0'056           | 0'81           | 1                          |           |
| T-52    | 41                                  | 28                | 13  | 1'3/4  | 3:1          | 0'837           | 0'36           | 1                          |           |
| T-53*   | 40                                  | 29                | 11  | 1'1/4  | 3:1          | 0'100           | 0'75           | 1                          |           |
| Control | 24                                  | 0                 | 24  |        |              |                 |                | 0                          |           |

Las líneas que mostraban alteraciones fenotípicas se indican con un asterisco.

La segregación obtenida en la mayor parte de las líneas se ajusta a una relación 3:1 (resistentes:sensibles), que se corresponde con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. Para las líneas T-7, T-12, T-18 y T-36 los datos de segregación (15:1) sugieren que se han producido inserciones del transgén en dos *loci* distintos. Para las líneas T-9, T-15, T-17, T-37 los datos de segregación sugieren que se han producido inserciones del transgén en dos o más *loci* distintos.

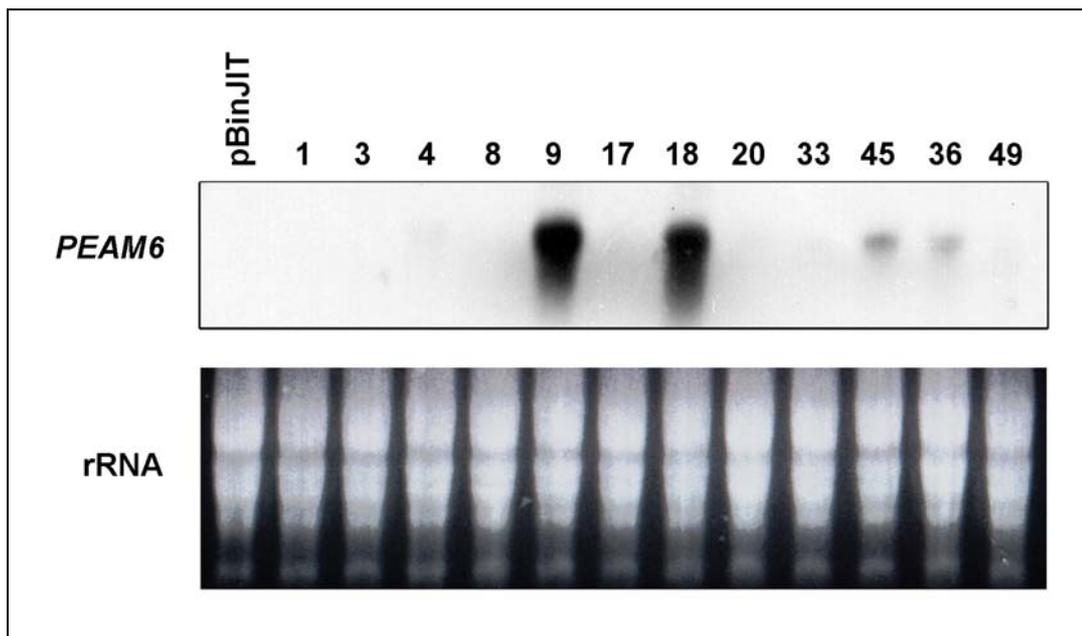
Con objeto de conocer los niveles de expresión del transgén *PEAM6* en las distintas líneas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM6*, se seleccionaron varias de estas líneas, con y sin alteraciones fenotípicas, y se realizó un análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 55.



**Figura 55. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM6* en plantas de *Arabidopsis*, del ecotipo Col, control y transformadas con la construcción 35S::*PEAM6*.** Línea control pBinJIT transformada con el vector sin inserto; líneas transgénicas 35S::*PEAM6* (T-10 a T-53). En cada uno de los pocillos se cargó 12 µg de RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *XhoI-EcoRI* (346 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM6*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. El asterisco señala las líneas que presentan alteraciones fenotípicas.

El análisis Northern mostró que *PEAM6* se expresaba en todas las líneas transgénicas 35S::*PEAM6* con fenotipo alterado, de manera variable, aunque a un nivel relativamente alto en todos los casos. Las líneas donde no se detectó expresión del transgén no mostraban alteraciones fenotípicas.

Debido a la escasa frecuencia observada de plantas con fenotipo alterado entre las transgénicas T<sub>1</sub> 35S::*PEAM6* Col (sólo siete de la 49 plantas transgénicas independientes), se estudió el nivel de expresión del transgén *PEAM6* mediante análisis Northern en otras once líneas transgénicas que mostraban fenotipo silvestre para comprobar si la ausencia de alteraciones fenotípicas en estas plantas se correlacionaba con la no expresión del transgén en estas líneas. Como control positivo de la hibridación se usó la línea T-18, que mostró una alta expresión del transgén en el análisis Northern mostrado en la figura 55. El resultado de este experimento se muestra en la figura 56.

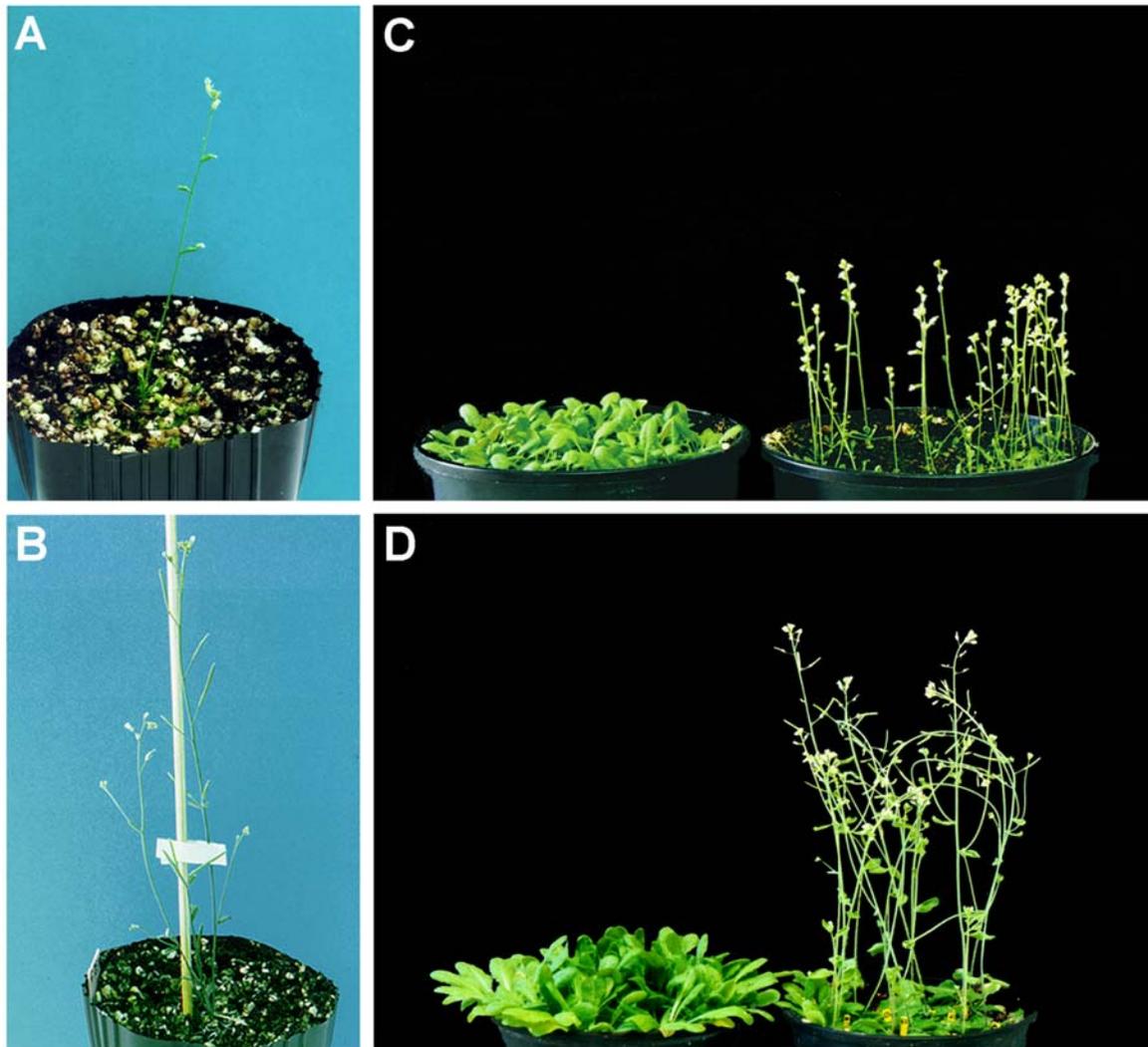


**Figura 56. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM6* en plantas de T<sub>2</sub> 35S::*PEAM6* Col de fenotipo silvestre.** Línea control pBinJIT transformada con el vector sin inserto; línea transgénica 35S::*PEAM6* de fenotipo alterado (T-18); líneas transgénicas 35S::*PEAM6* de fenotipo silvestre (T-1 a T-49). En cada uno de los pocillos se cargó 12 µg de RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *XhoI-EcoRI* (346 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM6*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico.

El análisis Northern mostró que el gen *PEAM6* se expresaba constitutivamente sólo en cuatro de las once líneas de fenotipo silvestre analizadas; además, excepto en la línea T-9, que presentaba un alto nivel de expresión del transgén, comparable al de la línea con fenotipo alterado T-18, el nivel de expresión del transgén era notablemente inferior al mostrado por las líneas con alteraciones fenotípicas.

### 3.1.1.1. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* en el tiempo de floración de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Col

Como se comentó anteriormente, sólo siete de las 49 plantas transgénicas primarias 35S::*PEAM6* mostraron un fenotipo distinto al silvestre; estas plantas mostraron un claro fenotipo de adelanto del tiempo de floración (Figura 57). Nosotros llevamos a cabo la caracterización fenotípica de cuatro de estas líneas 35S::*PEAM6*, T-10, T-35, T-44 y T-53, en las que el transgén se había insertado en un único *locus*. Las líneas T-7 y la T-40, que mostraron los fenotipos más extremos, no fueron incluidas en este trabajo de caracterización detallada ya que en la línea T-7 el transgén se había insertado en dos *loci* diferentes, y de la línea 40, extremadamente temprana, apenas se recuperaron semillas.



**Figura 57. Adelanto de floración en las plantas de *Arabidopsis*, ecotipo Col, transformadas con la construcción 35S::*PEAM6*.** (A) Planta T<sub>1</sub> 35S::*PEAM6.40*, con fenotipo extremo de adelanto de floración y conversión del meristemo apical de la inflorescencia principal y de algunas coflorescencias en flores. (B) Planta T<sub>1</sub> 35S::*PEAM6.7* de fenotipo muy severo de adelanto de floración y conversión del meristemo apical de la inflorescencia principal y de algunas coflorescencias en flores. Las ramas secundarias siguen un patrón de crecimiento similar al de la inflorescencia principal. (C) Plantas homocigotas de la línea control pBinJIT y de la línea transgénica 35S::*PEAM6.35*, de 21 días de edad, cultivadas bajo condiciones de día largo. Mientras que las plantas transgénicas han florecido tras producir entre 6-8 hojas, las plantas control continúan produciendo hojas de roseta y todavía no han florecido. (D) Plantas homocigotas de la línea control pBinJIT y de la línea transgénica 35S::*PEAM6.35*, de 6 semanas de edad cultivadas bajo condiciones de día corto.

Para determinar el efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* sobre el fenotipo de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Col, se sembró la progenie (T<sub>3</sub>) de plantas hemizigotas de cada una de estas líneas. Se estimó el tiempo de floración mediante el conteo del número de hojas producido por el tallo principal de plantas cultivadas en día largo. Posteriormente, el genotipo de cada planta respecto al transgén se determinó analizando la segregación de la resistencia a kanamicina en sus respectivas progenies. En la figura 58 se

muestra la distribución de plantas de las distintas líneas transgénicas, homocigotas y hemizigotas, en función del número de hojas producido.

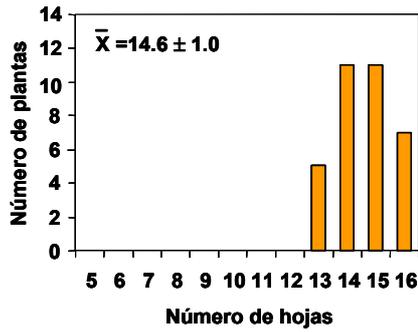
Mientras que las plantas control florecieron tras producir entre 13-16 hojas, las plantas homocigotas y hemizigotas de las líneas T-35 y T-53 lo hicieron tras producir un número inferior de hojas que los controles, siendo éste menor en las plantas homocigotas que en las hemizigotas. En las líneas T-10 y T-44 las plantas hemizigotas florecieron también con un número inferior de hojas que los controles, mostrando además un mayor adelanto de floración que el mostrado por las plantas hemizigotas de las líneas T-35 y T-53; sin embargo, a diferencia de las líneas anteriores, las plantas homocigotas T-10 y T-44 florecieron con un número de hojas significativamente superior al de sus correspondientes hemizigotas y próximo al de las plantas control, aunque todavía mostraron un ligero adelanto de la floración.

Los datos de tiempo de floración de las líneas T-10 y T-44 en el experimento anterior indicaron fenómenos de silenciamiento génico en las transgénicas 35S::PEAM6. Por esta razón, el análisis del efecto de la expresión constitutiva de PEAM6 se extendió también a la progenie T<sub>4</sub> de plantas hemizigotas de las líneas T-10 y T-44, así como de plantas homocigotas de las líneas T-35 y T-53; el estudio se llevó a cabo tanto bajo condiciones de día largo como de día corto. Un resumen de la caracterización fenotípica de estas plantas se muestra en las tablas 29 y 30, respectivamente.

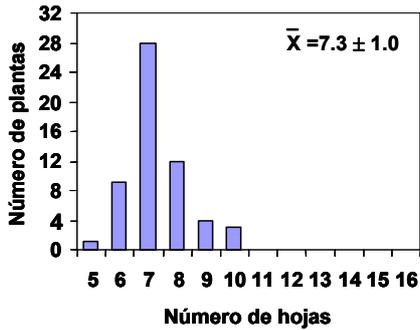
Se observó que en la generación T<sub>4</sub> las plantas homocigotas de las líneas T-35 y T-53 y las hemizigotas de la T-10 y T-44 florecían tempranamente, tanto bajo condiciones de día largo como de día corto, tras producir un número inferior de hojas que los controles (Figura 57C y D; Tablas 29 y 30).

Mientras que, bajo condiciones de día largo, el adelanto mostrado por las plantas homocigotas de las líneas de fenotipo severo T-53 y T-35 se mantuvo constante en las generaciones T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, en las líneas T-10 y T-44 se observó un ligero incremento en el número de hojas en las plantas de la población T<sub>4</sub> con respecto a la población T<sub>3</sub>, tanto en las plantas homocigotas como hemizigotas de estas dos líneas, de manera que, en la generación T<sub>4</sub> las plantas homocigotas se comportaban prácticamente como los controles, principalmente la línea 44 (Figura 58; Tabla 29).

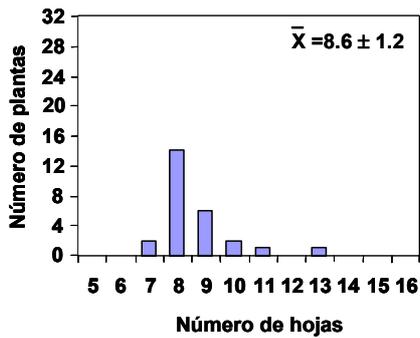
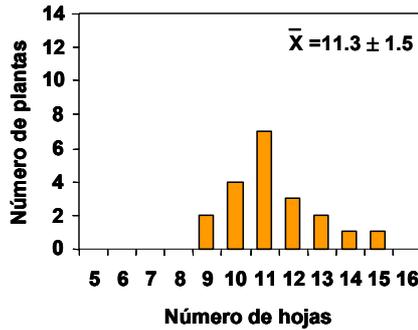
Aunque en este trabajo no hemos llevado a cabo un estudio detallado del tiempo de floración medido como el tiempo que tarda en elongar el tallo principal o en abrirse la primera flor, se pudo estimar que, mientras que las plantas control florecen aproximadamente a las cuatro semanas desde su siembra en tierra bajo condiciones de día largo, las plantas homocigotas de la línea 35S::PEAM6.35 que mostraron el mayor adelanto florecieron después de tan solo 16 días (Figura 57C). Bajo condiciones de día corto la



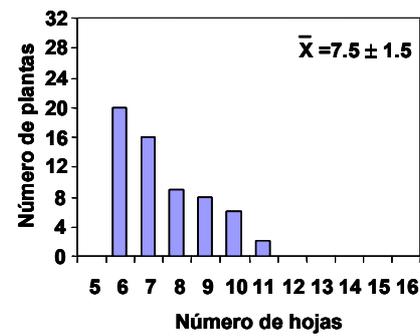
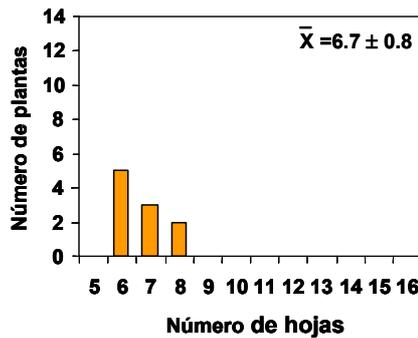
pBinJIT



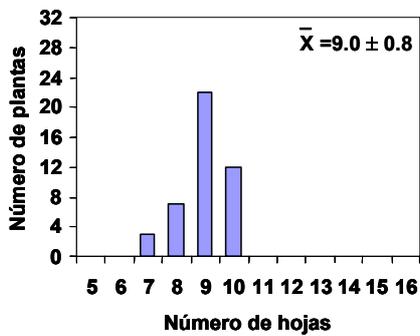
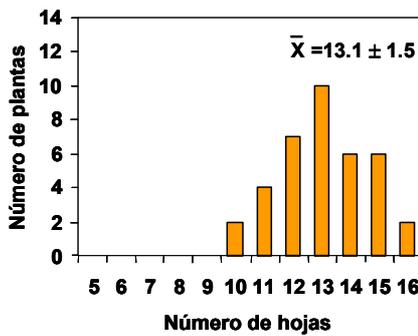
35S::PEAM6.10



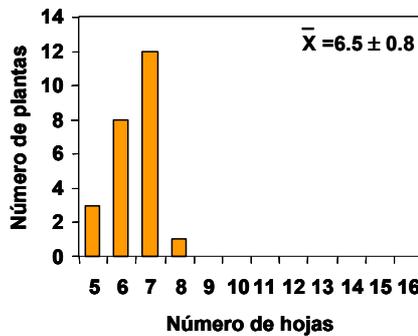
35S::PEAM6.35



35S::PEAM6.44



35S::PEAM6.53



floración se produce en los controles aproximadamente unas 12-13 semanas después de su siembra, mientras que las plantas 35S::*PEAM6.35* florecen a las 4-5 semanas (Figura 57D).

La reducción en el número de hojas con respecto al de las plantas control observado entre las líneas 35S::*PEAM6* es menor en día largo que en día corto en todas las líneas analizadas; así, por ejemplo, en la línea T-53, la reducción del número de hojas con respecto a los controles es del 50% en día largo y del 80% en día corto. Se pudo observar también que en día largo el adelanto en el tiempo de floración se debe principalmente a la reducción en el número de hojas de roseta mientras que en día corto parece ser el resultado de una reducción conjunta en el número de hojas de roseta y de las caulinares.

### 3.1.1.2. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* sobre la arquitectura de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Col

Además del fenotipo de adelanto de floración mostrado por las líneas 35S::*PEAM6*, éstas también mostraron cambios en la arquitectura de la inflorescencia. En una fracción de las plantas 35S::*PEAM6* con floración temprana, el meristemo apical del tallo, que normalmente se comporta todo el tiempo como un meristemo inflorescente, siguiendo un patrón de crecimiento indeterminado (Figura 59A y C), se determina prematuramente, transformándose en un meristemo floral y dando lugar a la formación de una flor terminal (Figura 59D, H y I; Tablas 29 y 30). En las líneas de fenotipo más severo sólo se producen 1 ó 2 flores no sostenidas por hoja caulinar antes de la formación de la estructura terminal (Figura 59D). La formación de flores terminales por el tallo principal, en plantas cultivadas bajo condiciones de día largo, se produjo con una frecuencia relativamente alta entre las líneas transgénicas 35S::*PEAM6*, siendo del 33% para la línea 35S::*PEAM6.10*, del 81% en la línea 35S::*PEAM6.35*, del 70% en la línea 35S::*PEAM6.53*, y nula en la línea 35S::*PEAM6.44* (Tabla 29). No se han observado flores terminales en plantas crecidas bajo condiciones de día corto de ninguna de las líneas analizadas (Tabla 30). Ocasionalmente, en las plantas de fenotipo más severo, cultivadas bajo condiciones de día largo, se ha podido observar la presencia de flores terminales en algunas de las coflorescencias así como en algunas inflorescencias secundarias.

---

**Figura 58. Distribución de plantas T<sub>3</sub> de varias líneas transgénicas 35S::*PEAM6*, homocigotas y hemizigotas, cultivadas bajo condiciones de día largo, en función del número de hojas.** En la parte izquierda, en color azul, y en la derecha, en color naranja, se muestran, respectivamente, las distribuciones de plantas hemizigotas y homocigotas de las distintas líneas control y transformadas con la construcción 35S::*PEAM6*. En cada gráfica se indica el número medio de hojas para cada población.



**Tabla 29. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* en el fenotipo de *Arabidopsis*, ecotipo Columbia, en plantas T<sub>4</sub> crecidas bajo condiciones de día largo (DL).**

| Línea                               | Genotipo | n <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales | Flores terminales <sup>d</sup> | Flores axilares <sup>e</sup> | Flores axilares <sup>f</sup> | Hoja curvada R <sup>g</sup> | I <sup>h</sup> | R+I <sup>i</sup> |
|-------------------------------------|----------|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|
| pBinJIT60 (control) <sup>j</sup>    | Hm       | 26             | 11'7 ± 1'1                   | 2'6 ± 0'5                     | 14'3 ± 1'1    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .10 <sup>k</sup> | Hz       | 40             | 6'3 ± 1'4                    | 2'7 ± 0'5                     | 8'9 ± 1'4     | 13                             | 3                            | 30                           | 0                           | 14             | 10               |
|                                     | Hm       | 17             | 11'2 ± 2'2                   | 2'4 ± 0'5                     | 13'6 ± 2'3    | 0                              | 0                            | 0                            | 2                           | 2              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .35              | Hm       | 72             | 3'9 ± 0'7                    | 2'9 ± 0'6                     | 6'8 ± 0'9     | 58                             | 66                           | 20                           | 8                           | 1              | 60               |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .44              | Hz       | 23             | 6'0 ± 0'8                    | 2'1 ± 0'5                     | 8'1 ± 0'9     | 0                              | 7                            | 17                           | 2                           | 15             | 4                |
|                                     | Hm       | 8              | 11'8 ± 1'4                   | 2'6 ± 0'5                     | 14'4 ± 1'8    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .53              | Hm       | 104            | 4'0 ± 0'7                    | 2'5 ± 0'5                     | 6'5 ± 0'7     | 72                             | 76                           | 14                           | 8                           | 1              | 95               |

<sup>a</sup> n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> Número de plantas en las cuales el tallo principal acaba en una flor.

<sup>e</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en el tallo principal.

<sup>f</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en coflorescencias.

<sup>g</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la roseta (R).

<sup>h</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la inflorescencia (I).

<sup>i</sup> Número de plantas que presentan hoja curvada tanto en la roseta como en la inflorescencia (R + I).

<sup>j</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM6*.

<sup>k</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM6* numeradas 10, 35, 44 y 53.

**Tabla 30. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* en el fenotipo de *Arabidopsis*, ecotipo Columbia, en plantas T<sub>4</sub> crecidas bajo condiciones de día corto (DC).**

| Línea                               | Genotipo | n <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales | Flores terminales <sup>d</sup> | Flores axilares <sup>e</sup> | Flores axilares <sup>f</sup> | Hoja curvada R <sup>g</sup> | I <sup>h</sup> | R+I <sup>i</sup> |
|-------------------------------------|----------|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|
| pBinJIT60 (control) <sup>j</sup>    | Hm       | 28             | 75'6 ± 6'0                   | 8'8 ± 1'7                     | 84'7 ± 6'9    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .10 <sup>k</sup> | Hz       | 61             | 12'6 ± 3'3                   | 3'5 ± 1'3                     | 16'1 ± 3'5    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
|                                     | Hm       | 20             | 79'3 ± 5'1                   | 8'4 ± 1'4                     | 87'6 ± 5'4    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .35              | Hm       | 30             | 8'1 ± 1'5                    | 4'3 ± 0'8                     | 12'5 ± 2'1    | 0                              | 3                            | 20                           | 1                           | 0              | 23               |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .44              | Hz       | 41             | 13'0 ± 4'4                   | 3'5 ± 1'4                     | 17'0 ± 4'9    | 0                              | 0                            | 7                            | 0                           | 0              | 7                |
|                                     | Hm       | 14             | 75'4 ± 5'6                   | 6'9 ± 1'2                     | 82'5 ± 5'3    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6</i> .53              | Hm       | 48             | 10'3 ± 1'6                   | 4'7 ± 0'9                     | 15'0 ± 2'2    | 0                              | 2                            | 8                            | 0                           | 15             | 13               |

<sup>a</sup> n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> Número de plantas en las cuales el tallo principal acaba en una flor.

<sup>e</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en el tallo principal.

<sup>f</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en coflorescencias.

<sup>g</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la roseta (R).

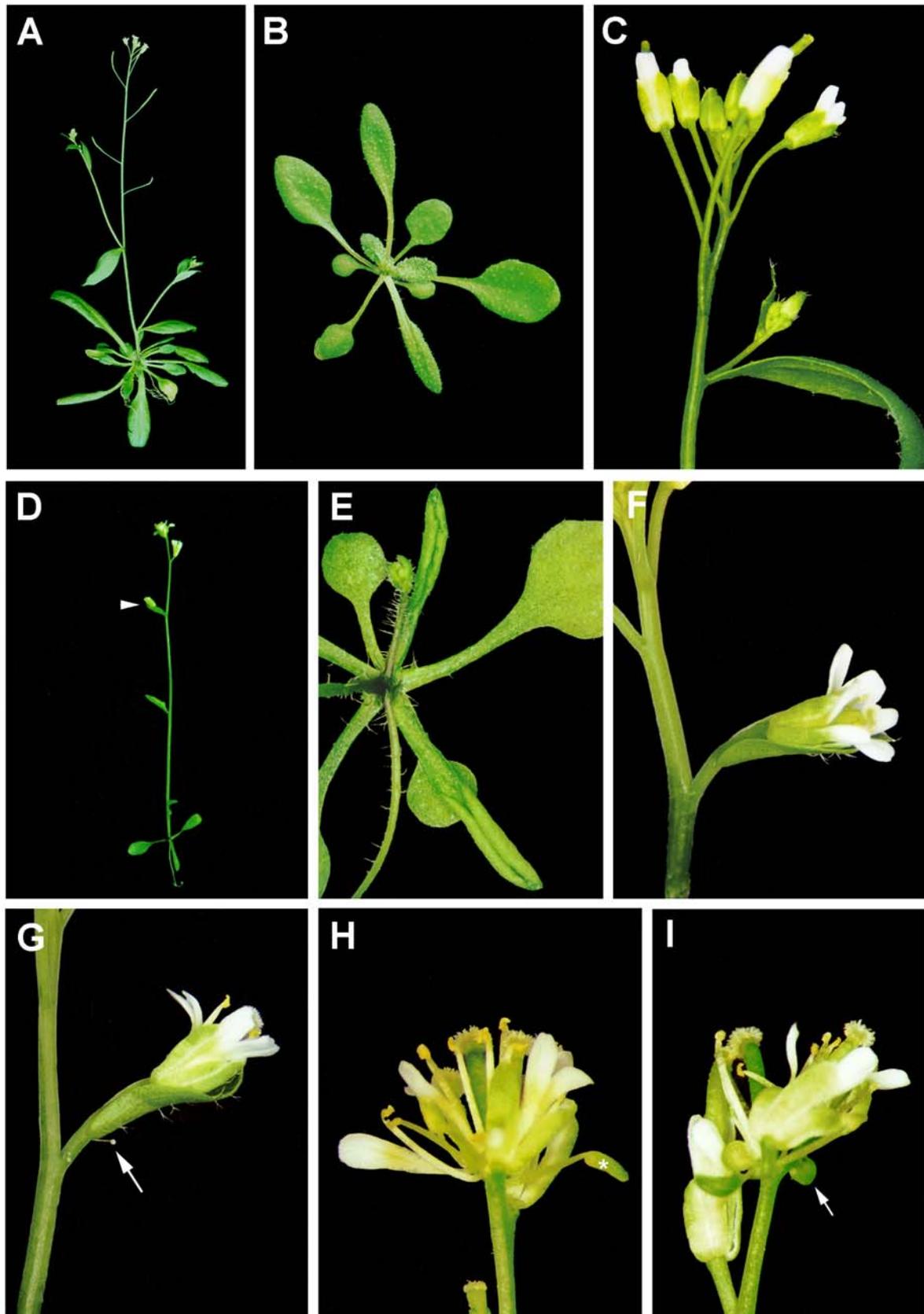
<sup>h</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la inflorescencia (I).

<sup>i</sup> Número de plantas que presentan hoja curvada tanto en la roseta como en la inflorescencia (R + I).

<sup>j</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM6*.

<sup>k</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM6* numeradas 10, 35, 44 y 53.





La apariencia de las estructuras terminales varía entre las plantas 35S::PEAM6. Frecuentemente, estas estructuras están poco alteradas y aparecen simplemente como una fusión de varias flores al final del tallo principal; en estas flores poco alteradas se observa una reducción generalizada del número de órganos florales, que no muestran alteraciones morfológicas, y, en general, están formadas por dos o tres carpelos ocupando el centro de la flor, un número variable de estambres y rodeando a estos últimos se disponen los sépalos y pétalos (Figura 59H).

Una cierta fracción de las flores terminales 35S::PEAM6 mostraban, sin embargo, alteraciones más dramáticas, consistentes en la presencia de órganos florales malformados y con cambios en su identidad (Figuras 59I y 60). El fenotipo de estas flores terminales más alteradas se analizó con detalle mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 60), lo que permitió observar que las transformaciones homeóticas afectaban al primero, segundo y tercer verticilo. En estas flores, al igual que en las menos alteradas, se produce la pérdida de la disposición verticilada de los distintos órganos florales.

Los órganos del primer verticilo frecuentemente aparecen parcialmente fusionados (Figura 60D) y muestran características propias de carpelo, tales como la formación de papilas estigmáticas, en sus márgenes y en su zona distal, y la diferenciación de óvulos, también en sus márgenes (Figura 60C). En los órganos del segundo verticilo de estas flores

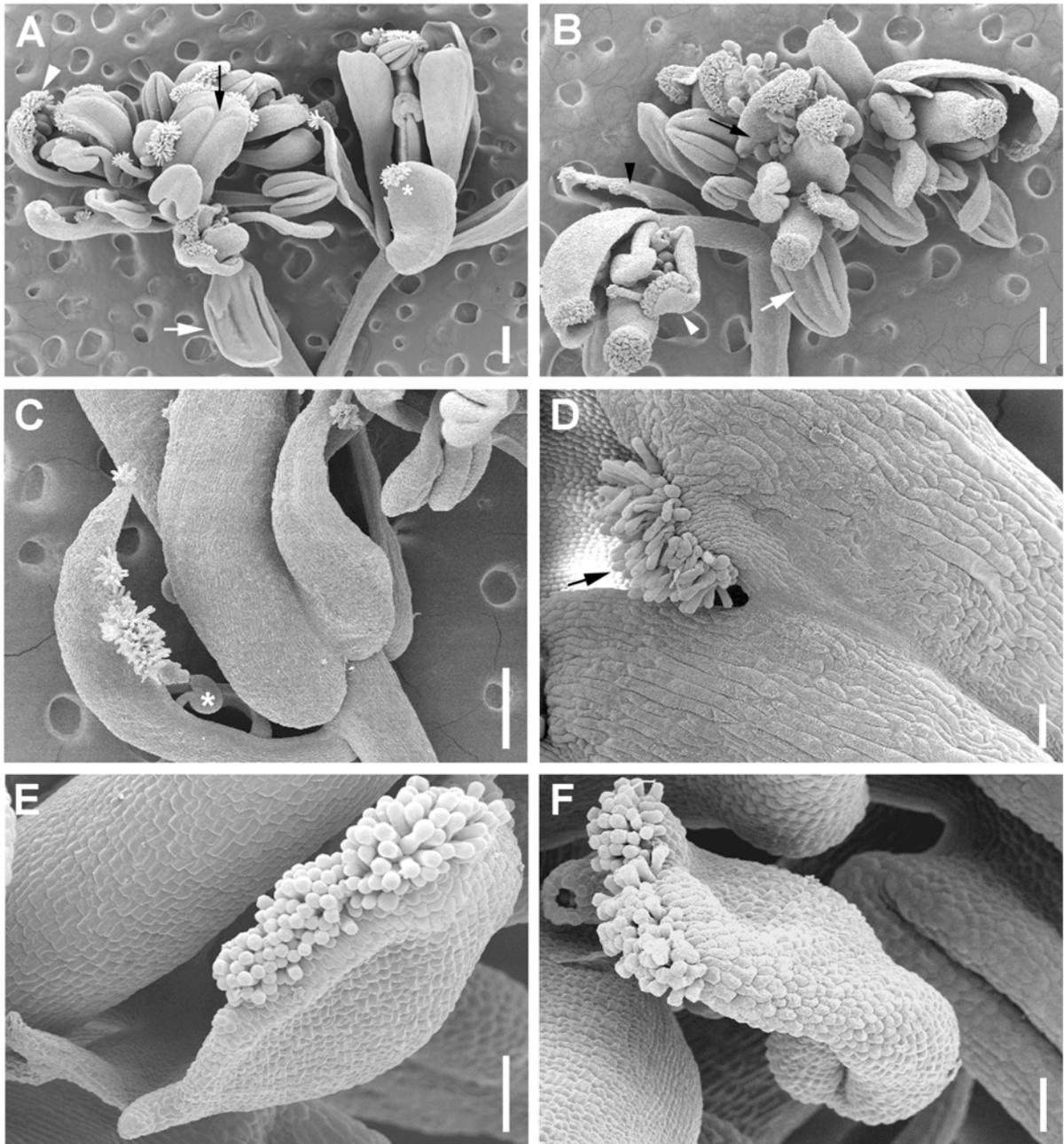
---

**Figura 59. Fenotipo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ecotipo Col, transformadas con la construcción 35S::PEAM6. (A)** Planta de la línea control. **(B)** Roseta de una planta control. **(C)** Estructura de la región apical del tallo de una planta control mostrando el ápice inflorescente de crecimiento indeterminado y un tallo inflorescente lateral (coflorescencia) que se desarrolla en la axila de una hoja caulinar. **(D)** Planta de la línea 35S::PEAM6.35 mostrando la determinación del meristemo apical y la formación de una flor axilar (punta de flecha). **(E)** Roseta de una planta 35S::PEAM6.35 mostrando curvatura hacia el haz en dos de sus hojas. **(F)** Detalle de una hoja caulinar curvada, sustentando una flor solitaria en el tallo principal de una planta 35S::PEAM6.53. Se aprecia la formación de dos pétalos extra en esta flor. **(G)** Detalle de una hoja caulinar curvada, sustentando una flor solitaria en el tallo principal de una planta 35S::PEAM6.10. Se aprecia la formación de un pétalo extra en esta flor. La flecha indica la presencia de un órgano filiforme de carácter carpeloide. **(H)** Estructura terminal poco alterada, de una planta 35S::PEAM6.10; en este caso, la estructura terminal se compone de tres carpelos y un número reducido de órganos florales; el asterisco señala un estambre cuya antera, alargada, presenta características carpeloides. **(I)** Estructura terminal producida por una planta 35S::PEAM6.53; en este caso, en la estructura terminal se distinguen dos carpelos y un número reducido de estambres, pétalos y sépalos, éstos últimos se hallan ligeramente curvados y fusionados entre sí; en la base de esta estructura terminal se distinguen dos estructuras carpeloides que se encuentran enrolladas sobre sí mismas (flecha).

se han observado dos tipos de transformaciones homeóticas. La más frecuente es la transformación parcial de los pétalos hacia tejido de estambre, que se detecta por la presencia de plegamientos en la zona distal, que recuerdan el desarrollo parcial de los lóculos de una antera, así como por el estrechamiento de estos órganos en su base (Figura 60A y B), aunque esto último sólo se observa en los órganos más transformados. Ocasionalmente, algunos pétalos desarrollan papilas estigmáticas en la zona distal (Figura 60B y E). En el tercer verticilo, las anteras modificadas se muestran como estructuras alargadas, en cuya zona distal se diferencian papilas estigmáticas (Figuras 59H y 60F); los filamentos no parecen sufrir alteraciones. Los carpelos aparecen generalmente en el centro de la estructura terminal mostrándose con frecuencia como órganos hipertrofiados, probablemente como resultado de la fusión de varios de ellos, que se curvan hacia la base y que ocupan gran parte de la estructura, (Figura 60A); a veces estos órganos aparecen completamente abiertos, mostrando los óvulos a lo largo de su superficie (Figura 60B).

---

**Figura 60. Fenotipos de estructuras terminales de plantas transgénicas de *Arabidopsis* 35S::PEAM6, ecotipo Col, observados mediante microscopía electrónica de barrido. (A)** Estructura terminal producida por una planta 35S::PEAM6.35 mostrando diferentes alteraciones homeóticas en sus órganos florales; se puede distinguir la formación de un carpelo hipertrofiado ocupando el centro de la flor (flecha negra); los sépalos presentan papilas estigmáticas en sus márgenes y en la zona distal (punta de flecha); los pétalos muestran transformación parcial a estambre puesta de manifiesto por la diferenciación de unos pliegues en la zona superior y que recuerdan el desarrollo parcial de los lóculos de una antera (flecha blanca). La última flor producida antes de la estructura terminal también muestra alteraciones homeóticas en el primer verticilo, con la formación de papilas estigmáticas en su zona distal (asterisco). **(B)** Estructura terminal producida por una planta 35S::PEAM6.53 mostrando diferentes alteraciones homeóticas en sus órganos florales; en este caso, en el centro de la estructura se distinguen dos carpelos completamente abiertos y mostrando los óvulos (flecha negra). Se aprecia la formación de papilas estigmáticas en los sépalos. La flecha blanca señala un pétalo parcialmente transformado en estambre. La última flor producida antes de la estructura terminal también muestra alteraciones homeóticas en el primer y segundo verticilo, con la formación de papilas estigmáticas en la zona distal de estos órganos; la punta de flecha blanca señala las papilas estigmáticas en el pétalo. Esta última flor se halla sustentada por una hoja caulinar que presenta papilas estigmáticas en sus márgenes (punta de flecha negra). **(C)** Sépalo de una flor, previa a la estructura terminal, de una planta 35S::PEAM6.53 mostrando la diferenciación de papilas estigmáticas en la zona distal y en sus márgenes. El asterisco señala la presencia de óvulos en el margen de este órgano. **(D)** Detalle de la zona de unión de dos sépalos en el primer verticilo de la estructura terminal de una planta 35S::PEAM6.53. La flecha señala la formación de papilas estigmáticas en esta zona. **(E)** Detalle de las papilas estigmáticas desarrolladas en la zona distal de un pétalo de una flor terminal de una planta 35S::PEAM6.35. **(F)** Antera de una flor terminal 35S::PEAM6.53 parcialmente transformada, mostrando la diferenciación de papilas estigmáticas en su zona distal. Las barras verticales representan: 250  $\mu$ m en A, B y C y 50  $\mu$ m en D, E y F.



También se han podido observar transformaciones homeóticas en la última flor formada antes de la estructura terminal. En estas flores las alteraciones afectan principalmente a los verticilos uno y dos; en ambos casos las transformaciones son hacia tejido carpeloide y consisten en la presencia de papilas estigmáticas (Figura 60A y B). Con frecuencia, estas flores aparecen sustentadas por una hoja caulinar que presenta el mismo tipo de alteraciones y en la que se pueden apreciar la formación de papilas estigmáticas en sus márgenes y zona distal (Figura 60B). También se ha observado la formación de estructuras filiformes de naturaleza carpeloide en la zona de unión de la hoja caulinar al pedúnculo floral (Figura 59G), o de éste al tallo principal.

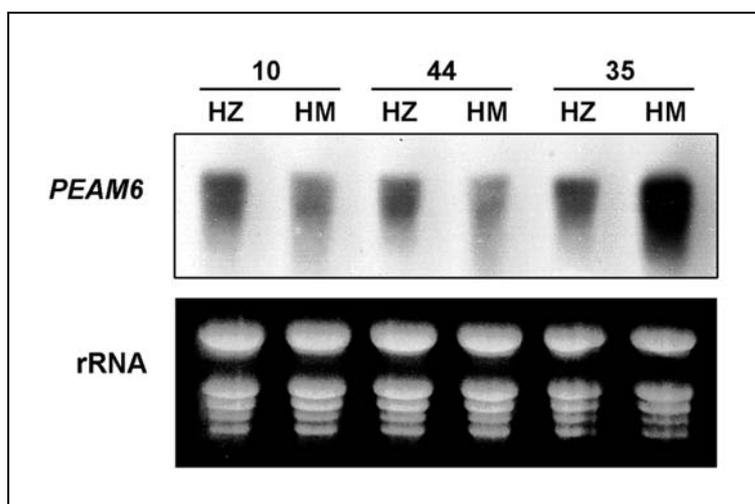
En las plantas 35S::*PEAM6* se ha observado que algunos de los meristemos laterales que se desarrollan en las axilas de las hojas caulinares, que normalmente producen tallos de inflorescencia (Figura 59A y C), dan lugar a flores solitarias (Figura 59D, F y G). Estas flores no muestran alteraciones homeóticas, aunque se ha observado que un gran número de ellas ve incrementado el número de órganos del segundo verticilo desde cuatro a cinco o seis. En ocasiones se ha podido observar la presencia de estructuras carpeloides que surgen del pedúnculo que sostiene estas flores axilares, generalmente en la zona de unión con la hoja caulinar (Figura 59G). En las plantas de fenotipo más severo (T-53 y T-35) la formación de flores axilares se ha observado en inflorescencias principales y en coflorescencias tanto de plantas cultivadas bajo condiciones de día largo como de día corto (Tablas 29 y 30). No obstante, en día corto se ha observado una fuerte reducción en el número de plantas que producen flores axilares en la inflorescencia principal, pasando del 92% en día largo a solo el 10% en día corto en la línea T-35 y del 73% al 4 % en la línea T-53. En las plantas hemizigotas de la línea T-44, de fenotipo más atenuado que las T-35 y la T-53, bajo condiciones de día corto sólo se observó la formación de flores axilares en las coflorescencias y en la línea T-10 no se observó ninguna en esas condiciones. Salvo las flores que constituyen la estructura terminal, la flor previa a la terminal y las flores axilares el resto de flores de las plantas 35S::*PEAM6* no muestran diferencias con respecto a las flores de las plantas control.

En las plantas 35S::*PEAM6* también se ha observado la presencia de algunas hojas caulinares (Figura 59F y G; Tablas 29 y 30) y de roseta (Figura 59E; Tabla 30) curvadas hacia el haz. Aunque en las plantas de fenotipo más severo la curvatura de las hojas se ha observado tanto en plantas cultivadas bajo condiciones de día corto como de día largo, este fenómeno es más frecuente en esta última condición. En hojas caulinares la curvatura se ha observado tanto en aquellas en cuya axila se desarrollan tallos laterales como en las que sostienen flores solitarias, siendo más frecuente en estas últimas. La presencia simultánea de hojas curvadas de roseta y caulinares en la misma planta fue más frecuente en las líneas que mostraron los fenotipos más severos (T-53 y T-35) y bajo condiciones de día largo (Tablas 29 y 30).

### **3.1.1.3. Caracterización molecular de la atenuación del fenotipo 35S::*PEAM6* en las líneas homocigotas T-10 y T-44**

Para analizar la causa de la atenuación o pérdida del fenotipo en homocigosis en las líneas T-10 y T-44, se estudió el nivel del RNA del transgén, mediante análisis Northern, en plantas homocigotas y hemizigotas T<sub>3</sub> de estas dos líneas y de la línea T-35, en la que las plantas

homocigotas mostraban un fenotipo más severo que el de las hemizigotas. El resultado de este experimento se muestra en la figura 61. Para cada genotipo, el RNA se aisló de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes recolectadas de una población de unas 120 plántulas T<sub>3</sub> descendientes de una planta T<sub>2</sub> homocigota o hemizigota para el transgén, según el caso, tras 25 días desde su siembra bajo condiciones de día corto.



**Figura 61. Análisis Northern de los niveles del transcrito *PEAM6* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ecotipo Col, homocigotas y hemizigotas 35S::*PEAM6*.** HZ: progenie T<sub>3</sub> de una planta T<sub>2</sub> hemizigota; HM: progenie T<sub>3</sub> de una planta T<sub>2</sub> homocigota. líneas transgénicas 35S::*PEAM6* (T-10, T-35 y T-44). En cada uno de los pocillos se cargó 10 µg del RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes de una población T<sub>3</sub>. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *XhoI-EcoRI* (346 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM6*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico.

El análisis Northern mostró que el gen *PEAM6* se estaba expresando en la progenie de las plantas homocigotas y hemizigotas de cada una de las líneas. Se observó que la línea T-10, que fue la línea que en hemizigosis mostró el fenotipo más severo (Figura 58), también era la que mostraba el mayor nivel del RNA de *PEAM6* en la progenie de una planta hemizigota. Además, mientras que en la línea T-35 el nivel de RNA de *PEAM6* en la progenie homocigota era mayor que en la progenie de la planta hemizigota, en las líneas T-10 y T-44 se observó una disminución del RNA de *PEAM6* en la progenie homocigota con respecto al observado en la de las hemizigotas. Este resultado muestra, por tanto, una correlación positiva entre el nivel del transcrito y la intensidad del fenotipo en las distintas líneas 35S::*PEAM6*; la disminución observada en el nivel de RNA de *PEAM6* en homocigosis en las líneas T-10 y T-44 podría explicar, por tanto, la atenuación del fenotipo de adelanto de floración que se observa en las plantas homocigotas de estas líneas.

### 3.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis*, ECOTIPO Landsberg *erecta*, 35S::PEAM6

En este trabajo también se ha llevado a cabo la transformación de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Landsberg *erecta* (Ler) con la construcción 35S::PEAM6. Como resultado de esta transformación se obtuvieron 19 plantas transgénicas independientes resistentes a kanamicina; nueve de ellas mostraron un fenotipo alterado similar al observado en las plantas T<sub>1</sub> 35S::PEAM6 del ecotipo Col, con adelanto del tiempo de floración y conversión de algunas de las inflorescencias en flores, si bien estas alteraciones fenotípicas eran generalmente más severas que las observadas para el ecotipo Col. El resto de plantas no mostró diferencias con respecto al fenotipo de las plantas control.

Con el fin de determinar el número de *loci* en el que se había producido la inserción del T-DNA se llevó a cabo un análisis de segregación de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T<sub>2</sub> en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y de plantas transgénicas. Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 31.

**Tabla 31. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ecotipo Ler, T<sub>2</sub> 35S::PEAM6.**

| Línea | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |      | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|-------|-------------------------------------|-------------------|------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|       |                                     | +(R)              | -(S) |              |                 |                |                            |           |
| T-1*  | 36                                  | 29                | 7    | 0'8/4        | 3:1             | 0'778          | 0'38                       | 1         |
| T-2   | 40                                  | 30                | 10   | 1'0/4        | 3:1             | 0'033          | 0'86                       | 1         |
| T-3*  | 36                                  | 25                | 11   | 1'2/4        | 3:1             | 0'481          | 0'49                       | 1         |
| T-4*  | 41                                  | 31                | 10   | 1'0/4        | 3:1             | 0'057          | 0'81                       | 1         |
| T-5   | 42                                  | 33                | 9    | 0'9/4        | 3:1             | 0'413          | 0'52                       | 1         |
| T-6*  | 41                                  | 27                | 14   | 1'4/4        | 3:1             | 1'618          | 0'20                       | 1         |
| T-8   | 41                                  | 32                | 9    | 0'9/4        | 3:1             | 0'317          | 0'57                       | 1         |
| T-10  | 40                                  | 27                | 13   | 1'3/4        | 3:1             | 1'033          | 0'31                       | 1         |
| T-11* | 42                                  | 29                | 13   | 1'2/4        | 3:1             | 0'667          | 0'41                       | 1         |
| T-12  | 40                                  | 31                | 9    | 0'9/4        | 3:1             | 0'233          | 0'63                       | 1         |
| T-14  | 39                                  | 27                | 12   | 1'2/4        | 3:1             | 0'573          | 0'45                       | 1         |
| T-15  | 40                                  | 38                | 2    | 0'8/16       | 1:15            | 0'400          | 0'53                       | 2         |
| T-17* | 34                                  | 21                | 13   | 1'5/4        | 3:1             | 0'863          | 0'35                       | 1         |

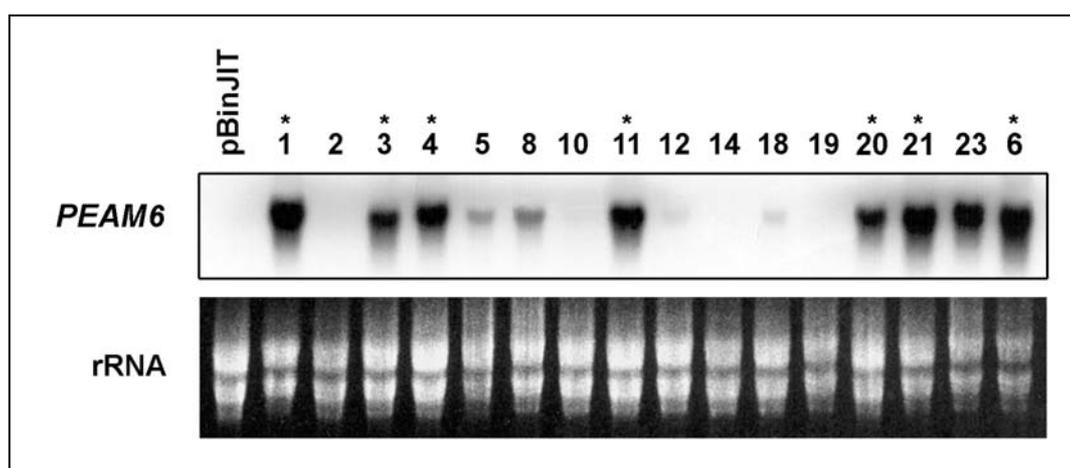
**Tabla 31 (continuación). Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ecotipo Ler, T<sub>2</sub> 35S::PEAM6.**

| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |       | Relación S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|-------|--------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | + (R)             | - (S) |              |                 |                |                            |           |
| T-18    | 40                                  | 29                | 11    | 1'1/4        | 3:1             | 0'100          | 0'75                       | 1         |
| T-19    | 39                                  | 27                | 12    | 1'2/4        | 3:1             | 0'573          | 0'45                       | 1         |
| T-20*   | 41                                  | 31                | 10    | 1'0/4        | 3:1             | 0'057          | 0'81                       | 1         |
| T-21*   | 41                                  | 31                | 10    | 1'0/4        | 3:1             | 0'057          | 0'81                       | 1         |
| T-23*   | 40                                  | 28                | 12    | 1'2/4        | 3:1             | 0'433          | 0'51                       | 1         |
| T-25    | 41                                  | 29                | 12    | 1'2/4        | 3:1             | 0'317          | 0'57                       | 1         |
| Control | 40                                  | 0                 | 40    |              |                 |                |                            | 0         |

Las líneas que mostraban alteraciones fenotípicas se indican con un asterisco.

En todas las líneas transgénicas la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1 (resistentes:sensibles), que se corresponde con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*, excepto la línea T-15, cuyos datos de segregación se ajustan a una relación 15:1, que indica la inserción del transgén en dos *loci* distintos.

El nivel de expresión del transgén *PEAM6* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 62.



**Figura 62. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM6* en plantas de *Arabidopsis*, del ecotipo Landsberg erecta, control y transformadas con la construcción 35S::PEAM6.** Línea control pBinJIT transformada con el vector sin inserto; líneas transgénicas 35S::PEAM6 (T-1 a T-23). En cada uno de los pocillos se cargó 12 µg de RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *XhoI-EcoRI* (346 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM6*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. El asterisco señala las líneas que presentan alteraciones fenotípicas.

En general se observa una correlación entre el nivel de expresión del transgén *PEAM6* y la presencia del fenotipo alterado, de forma que las líneas que presentan alteraciones fenotípicas tienen un mayor nivel de expresión del gen.

### **3.1.2.1. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* en el tiempo de floración de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo *Ler***

Como se comentó anteriormente, nueve de las líneas transgénicas primarias mostraron un fenotipo distinto al silvestre. Nosotros hemos llevado a cabo la caracterización fenotípica de cinco de estas líneas que mostraron los fenotipos más acentuados y en las que el transgén se había insertado en un único *locus*.

Para determinar el efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* sobre el fenotipo de *Arabidopsis*, ecotipo *Ler*, se sembró la progenie ( $T_3$ ) de plantas homocigotas de cada una de las líneas. Se determinó el tiempo de floración en las distintas líneas transgénicas mediante el conteo del número de hojas producido por el tallo principal de plantas cultivadas bajo condiciones de día largo. Un resumen de los resultados de esta cuantificación se muestra en la tabla 32.

Mientras que las plantas control florecían tras producir entre 7-9 hojas, las plantas homocigotas de las distintas líneas transgénicas florecían tempranamente, tras producir un menor número de hojas que los controles y que oscilaba entre 4-6 hojas (Figura 63A; Tabla 32). Las plantas 35S::*PEAM6* más adelantadas florecieron tan solo 15 días después de su siembra en tierra, mientras que los controles lo hicieron tras unos 23 días.

La reducción del número de hojas con respecto a las plantas control, observada en las plantas 35S::*PEAM6* del ecotipo *Ler* cultivadas bajo condiciones de día largo es de aproximadamente el 45%. Esta reducción se debe, principalmente, a una menor producción de hojas de roseta, aunque en algunas de las líneas también se ha observado una ligera reducción en la producción de hojas de inflorescencia con respecto a la de las plantas control.

### **3.1.2.2. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* sobre la arquitectura de plantas de *Arabidopsis* del ecotipo *Ler***

Tal y cómo se observó en la plantas 35S::*PEAM6* del ecotipo *Col*, las plantas 35S::*PEAM6* del ecotipo *Ler*, presentan, además del fenotipo de adelanto de floración, alteraciones en la arquitectura de la inflorescencia. Se ha observado en estas plantas la determinación del meristemo apical en una estructura terminal después de producir un número relativamente

**Tabla 32. Efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* en el fenotipo de plantas de *Arabidopsis*, ecotipo *Landsberg erecta*, T<sub>3</sub> crecidas bajo condiciones de día largo (DL).**

| Línea                             | <i>n</i> <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales | Flores terminales <sup>d</sup> | Flores axilares <sup>e</sup> | Flores axilares <sup>f</sup> | Hoja curvada R <sup>g</sup> | I <sup>h</sup> | R+I <sup>i</sup> |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|
| pBinJIT60 (control) <sup>j</sup>  | 30                    | 5'9 ± 0'4                    | 2'4 ± 0'5                     | 8'4 ± 0'6     | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6.1</i> <sup>k</sup> | 18                    | 2'8 ± 0'4                    | 1'9 ± 0'6                     | 4'7 ± 0'6     | 18                             | 18                           | 0                            | 0                           | 0              | 18               |
| 35S:: <i>PEAM6.3</i>              | 13                    | 2'8 ± 0'4                    | 2'3 ± 0'5                     | 5'1 ± 0'5     | 12                             | 12                           | 2                            | 0                           | 0              | 3                |
| 35S:: <i>PEAM6.4</i>              | 19                    | 2'6 ± 0'6                    | 2'0 ± 0'7                     | 4'6 ± 0'7     | 18                             | 18                           | 4                            | 0                           | 0              | 19               |
| 35S:: <i>PEAM6.11</i>             | 15                    | 3'1 ± 0'7                    | 1'9 ± 0'4                     | 5'0 ± 0'7     | 6                              | 13                           | 4                            | 2                           | 0              | 13               |
| 35S:: <i>PEAM6.21</i>             | 15                    | 2'8 ± 0'5                    | 2'3 ± 0'6                     | 5'1 ± 0'7     | 14                             | 15                           | 5                            | 0                           | 0              | 15               |

<sup>a</sup> n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> Número de plantas en las cuales el tallo principal acaba en una flor.

<sup>e</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en el tallo principal.

<sup>f</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en coflorescencias.

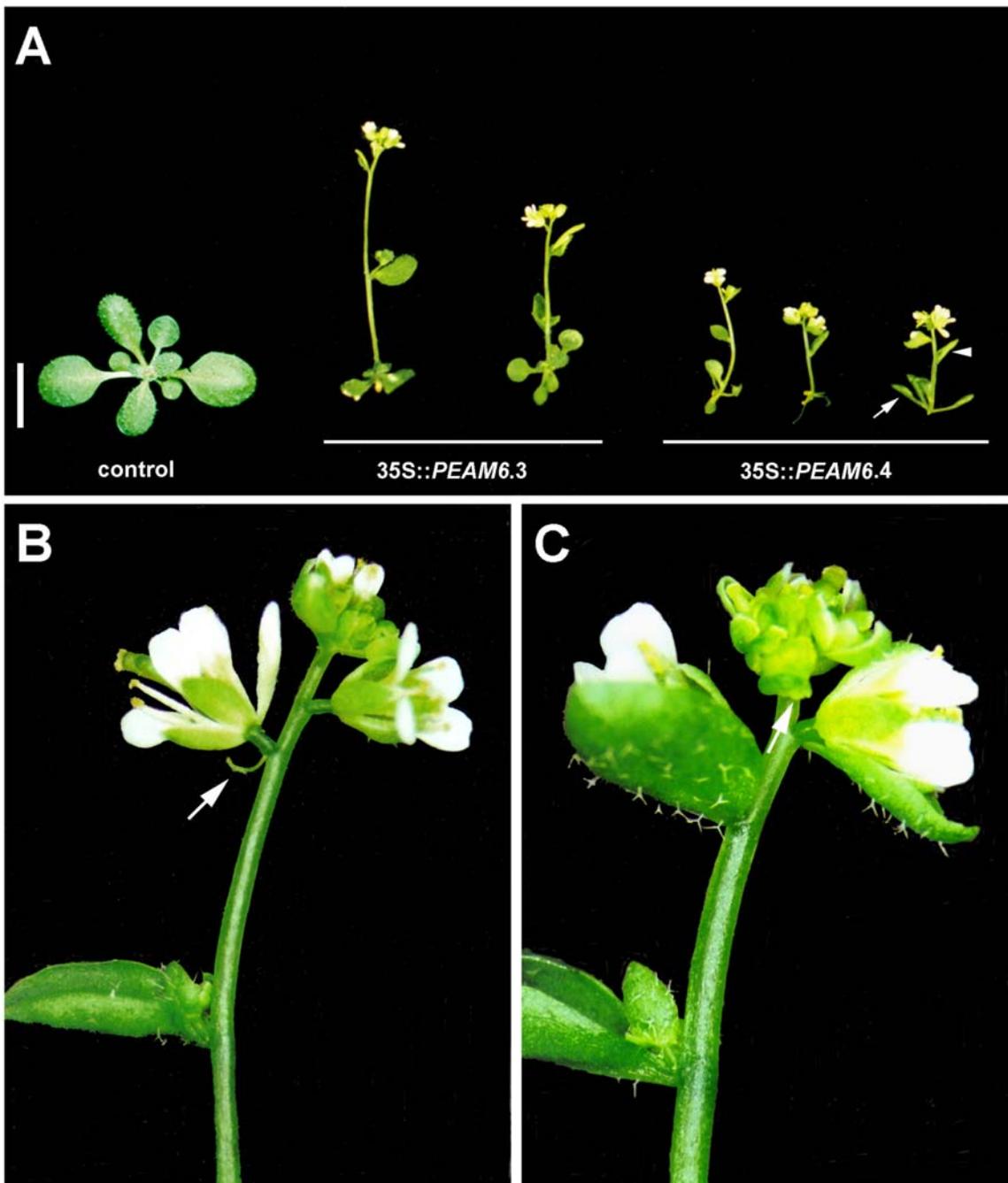
<sup>g</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la roseta (R).

<sup>h</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la inflorescencia (I).

<sup>i</sup> Número de plantas que presentan hoja curvada tanto en la roseta como en la inflorescencia (R + I).

<sup>j</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM6*.

<sup>k</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM6* numeradas 1, 3, 4, 11, 21.



**Figura 63. Fenotipo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, ecotipo *Ler*, transformadas con la construcción 35S::PEAM6. (A)** Se muestra el adelanto de la floración de plantas pertenecientes a dos líneas con expresión constitutiva de *PEAM6* respecto a una planta control transformada con el vector sin inserto. Mientras que las plantas 35S::PEAM6 florecen tras producir de 4-6 hojas, la planta control de la misma edad continúa su desarrollo vegetativo. La flecha señala una hoja de roseta curvada; la punta de flecha señala una hoja caulinar curvada. **(B)** Estructura de la inflorescencia de una planta 35S::PEAM6.4 mostrando la determinación del meristemo apical en una estructura terminal. La flecha señala una estructura carpeloide desarrollada en la base del pedúnculo de una flor, en la zona de su unión al tallo principal. También se aprecia la curvatura de la hoja caulinar que sustenta una coflorescencia **(C)** Estructura de la inflorescencia de una planta 35S::PEAM6.1 mostrando la determinación del meristemo apical en una estructura terminal; la flecha señala un sépalo con papilas estigmáticas en su región distal. Se observan también dos hojas caulinares sustentando flores solitarias, y una de ellas aparece curvada. La barra vertical representa 1 cm.

pequeño de flores (Figura 63), una o dos en las plantas más alteradas, en contraposición al crecimiento indeterminado de dicho meristemo en las plantas control. La frecuencia de producción de flores terminales es considerablemente superior en este ecotipo en comparación con el observado en las plantas 35S::*PEAM6* del ecotipo Col, llegando incluso en las líneas de fenotipo más severo a ser del 100%. Con bastante frecuencia se ha observado también la determinación de algunas coflorescencias así como de las inflorescencias secundarias.

El fenotipo de las estructuras terminales fue similar al observado en las plantas 35S::*PEAM6* del ecotipo Col, encontrándose en las estructuras más alteradas transformaciones homeóticas de los órganos del primer y tercer verticilo a órganos carpeloides, como queda patente por la diferenciación de papilas estigmáticas y estructuras similares a óvulos en los márgenes de estos órganos así como en su región distal (Figura 63C).

Ocasionalmente se han observado la aparición de estructuras carpeloides que no progresan, y que permanecen como vestigios de estos órganos en la zona de unión del pedúnculo floral al tallo principal (Figura 63B).

También se ha observado la formación de flores en las axilas de las hojas caulinares, en lugar de los tallos de inflorescencia de crecimiento indeterminado producidos por las plantas control (Figura 63A y C; Tabla 32). La formación de flores axilares se ha observado tanto en la inflorescencia principal como en las coflorescencias de estas plantas. En algunas líneas, al igual que se observó para las flores terminales, la frecuencia de aparición de flores axilares en la inflorescencia principal fue del 100% o muy cercana a este valor. Las flores axilares no muestran alteraciones morfológicas, con la excepción de que, ocasionalmente, presentan cinco pétalos. Salvo estas flores axilares y las que forman parte de la estructura terminal, el resto de flores de las plantas 35S::*PEAM6* son normales y no muestran diferencias con respecto a las flores de las plantas control. Frecuentemente, en las plantas de fenotipo más severo, todas las coflorescencias se encontraban reemplazadas por flores; este fenómeno, junto a la determinación del meristemo apical y la escasa producción de flores previas a esta estructura terminal, daba lugar a plantas de fenotipo tan extremo que en muchos casos resultaba muy difícil la recuperación de semillas a partir de las mismas.

En las plantas 35S::*PEAM6* también se ha observado la presencia de algunas hojas caulinares (Figura 63A, B y C; Tabla 32) y de roseta (Figura 63A; Tabla 32) curvadas hacia el haz. La mayor parte de las plantas 35S::*PEAM6* presentan simultáneamente curvatura en ambos tipos de hoja. La curvatura de las hojas caulinares se ha observado tanto en aquellas que sustentan tallos de inflorescencia como en la que sostienen flores solitarias, observándose más frecuentemente en estas últimas.

### 3.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE *PEAM6* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *Nicotiana tabacum*

Como resultado de la transformación de plantas de tabaco con la construcción 35S::*PEAM6* se generaron 8 brotes transgénicos primarios. Dos de ellos, que mostraron floración en cultivo *in vitro* antes de ser transplantados a tierra, se perdieron.

Con el fin de determinar el número de *loci* en el que se había producido la inserción del T-DNA se llevó a cabo el análisis de segregación de estas líneas transgénicas, mediante la siembra de su progenie T<sub>2</sub> en un medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y plantas transgénicas. Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 33.

**Tabla 33. Distribución de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas de tabaco, T<sub>2</sub> 35S::*PEAM6*.**

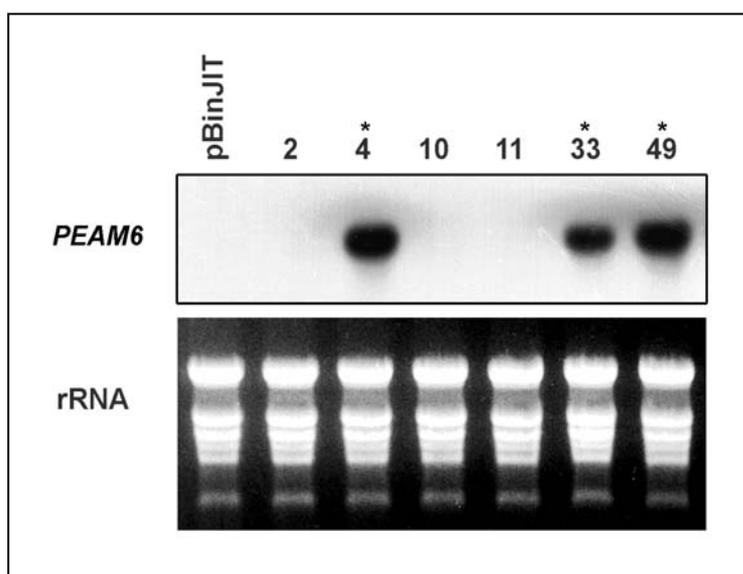
| Línea   | nº total de semillas analizadas (T) | Resistencia a Kan |     |       | Relació n S/T | Segregación R:S | Valor $\chi^2$ | Nivel de Significación (P) | nº copias |
|---------|-------------------------------------|-------------------|-----|-------|---------------|-----------------|----------------|----------------------------|-----------|
|         |                                     | +                 | -   |       |               |                 |                |                            |           |
|         |                                     | (R)               | (S) |       |               |                 |                |                            |           |
| T-2     | 42                                  | 31                | 11  | 1'1/4 | 3:1           | 0'032           | 0'86           | 1                          |           |
| T-4*    | 38                                  | 38                | 0   |       |               |                 |                | ≥2                         |           |
| T-10    | 40                                  | 29                | 11  | 1'1/4 | 3:1           | 0'100           | 0'75           | 1                          |           |
| T-11    | 41                                  | 28                | 13  | 1'3/4 | 3:1           | 0'837           | 0'36           | 1                          |           |
| T-33*   | 42                                  | 35                | 7   | 0'7/4 | 3:1           | 1'810           | 0'18           | 1                          |           |
| T-49*   | 40                                  | 32                | 8   | 0'8/4 | 3:1           | 0'700           | 0'40           | 1                          |           |
| Control | 40                                  | 0                 | 40  |       |               |                 |                | 0                          |           |

El asterisco señala las líneas que mostraban alteraciones fenotípicas.

En todas las líneas, excepto en la línea T-4, la segregación obtenida se ajusta a una relación 3:1 (resistentes:sensibles), que se corresponde con la esperada para la inserción del T-DNA en un único *locus*. En la línea T-4, la segregación obtenida sugiere inserciones del transgén en dos o más *loci* distintos.

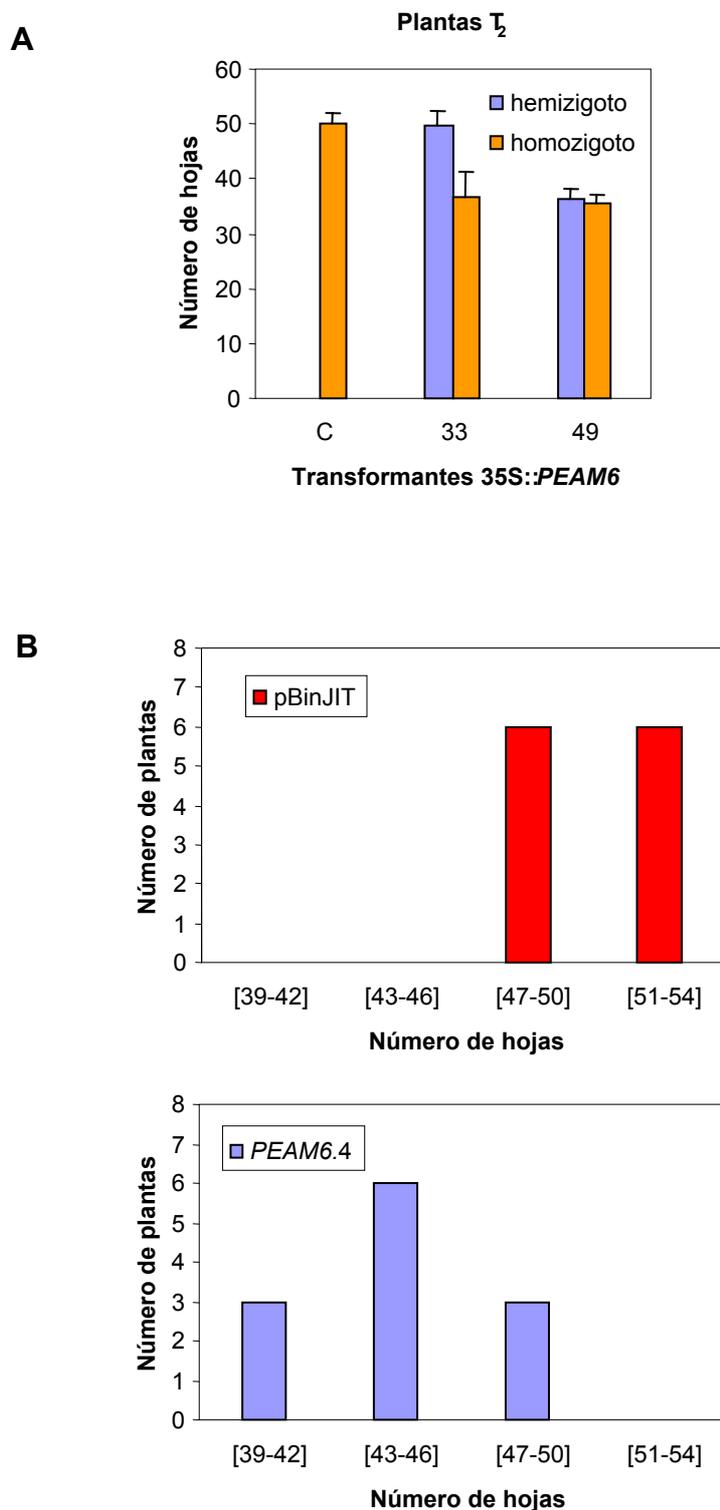
El nivel de expresión del transgén *PEAM6* en las distintas líneas transgénicas se analizó mediante análisis Northern; el resultado de ese análisis se muestran en la figura 64.

El análisis Northern mostró que el gen *PEAM6* se expresaba en tres de las seis líneas transgénicas analizadas mientras que no se detectó su expresión en el control pBINJIT ni en el resto de las líneas.



**Figura 64. Análisis Northern de la expresión del transgén *PEAM6* en plantas de tabaco transformadas con la construcción *35S::PEAM6*.** Línea control pBinJIT transformada con el vector sin inserto; líneas transgénicas *35S::PEAM6* (T-2 a T-49). En cada uno de los pocillos se cargó 12  $\mu\text{g}$  de RNA total extraído de una mezcla de hojas vegetativas jóvenes. En la hibridación se utilizó como sonda un fragmento *XhoI-EcoRI* (346 pb) del extremo 3' del cDNA de *PEAM6*. En la parte inferior se muestra el control de carga de RNA ribosómico. El asterisco señala las líneas que presentan alteraciones fenotípicas.

Debido al limitado número de líneas transgénicas obtenidas se seleccionaron para el análisis todas aquellas que mostraron expresión del transgén, independientemente del número de *loci* en el que éste se había insertado. Para analizar el efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* sobre el tiempo de floración en las distintas líneas transgénicas se contabilizó el número total de hojas producido por el tallo principal, antes de la formación de la flor terminal, en plantas de la progenie  $T_2$  de la línea control y de las tres líneas transgénicas. De cada una de las plantas analizadas se recogió semillas que se utilizaron para determinar el genotipo correspondiente a cada planta. Los resultados de dichos recuentos se muestran en la figura 65A y B. En la figura 65A se muestran los resultados para las líneas con una inserción del transgén, T-33 y T-49, donde los valores representados se corresponden con la media del número total de hojas  $\pm$  desviación estándar calculada a partir de muestras de 7-10 plantas hemizigotas ó de 5 homocigotas de cada una de las líneas transgénicas. En la figura 65B se muestra la distribución de plantas en función de su número de hojas en las poblaciones de la línea control y de la línea T-4, con inserción del transgén en varios *loci*.



**Figura 65. Análisis cuantitativo del efecto de la expresión constitutiva de *PEAM6* en el tiempo de floración de *Nicotiana tabacum*. (A) Número de hojas de plantas T<sub>2</sub> de las líneas con la inserción del transgén en un único locus. (B) Distribución de plantas T<sub>2</sub> resistentes a kanamicina de la línea 35::PEAM6.4 y de la línea control, en función de su número de hojas.**

El resultado de este experimento, mostró que las plantas homocigotas de las líneas T-33 y T-49, con inserción del transgén en un único *locus*, florecían con un menor número de hojas que las plantas control (Figuras 65A y 66). Sin embargo, sólo las plantas hemizigotas de la línea T-49 florecieron con un menor número de hojas que los controles, y muy similar al mostrado por sus correspondientes plantas homocigotas, mientras que las hemizigotas de la línea T-33 apenas mostraron diferencias con respecto a la línea control. Mientras en la línea control todas las plantas analizadas florecían tras producir un número de hojas comprendido entre 47-54, la mayor parte de las plantas T<sub>2</sub> de la línea T-4, con inserción del transgén en varios *loci*, se distribuían dentro de intervalos correspondientes a un menor número de hojas que los controles, a pesar de que una cierta fracción de plantas de esta línea florecía con un número de hojas similar al de los controles “más tempranos”.



**Figura 66. Fenotipo de las plantas transgénicas de tabaco transformadas con la construcción 35S::PEAM6.** Planta de la línea control (pBinJIT) transformada con el vector sin inserto y plantas de las líneas transgénicas 35S::PEAM6 con inserción del T-DNA en un único *locus* (T-33 y T-49).

En todos los casos, el parámetro de tiempo de floración medido como número de días desde la siembra hasta que el primer botón floral fue visible en la inflorescencia se correlacionaba con la medida del número de hojas mostrada anteriormente.

### **3.3. INTERACCIÓN DE PEAM6 CON OTROS POLIPÉPTIDOS**

#### **3.3.1. ENSAYO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS PEAM6 Y PEAM4 MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO**

Ya que los resultados del estudio funcional de *PEAM6* y *PEAM4* en sistemas heterólogos llevados a cabo en este trabajo, así como los resultados de trabajos previos a éste, sugieren que *PEAM4* y *PEAM6* podrían estar implicados en el control del mismo tipo de procesos durante la iniciación floral de guisante y puesto que, además, ambos presentan patrones de expresión solapantes en estadios tempranos del desarrollo de los meristemas florales, hemos testado la posible interacción en levadura de los polipéptidos codificados por estos dos genes mediante el sistema del doble híbrido en levadura.

Para ello, se generaron por PCR un fragmento de 746 pb del cDNA de *PEAM6* y uno de 719 pb del cDNA de *PEAM4*, usando cebadores específicos que incorporaban sitios de restricción situados de tal manera que la orientación y la pauta de lectura se mantuviera para la correcta expresión de las proteínas. En ambos casos los fragmentos comprendían desde el ATG hasta el codón de parada.

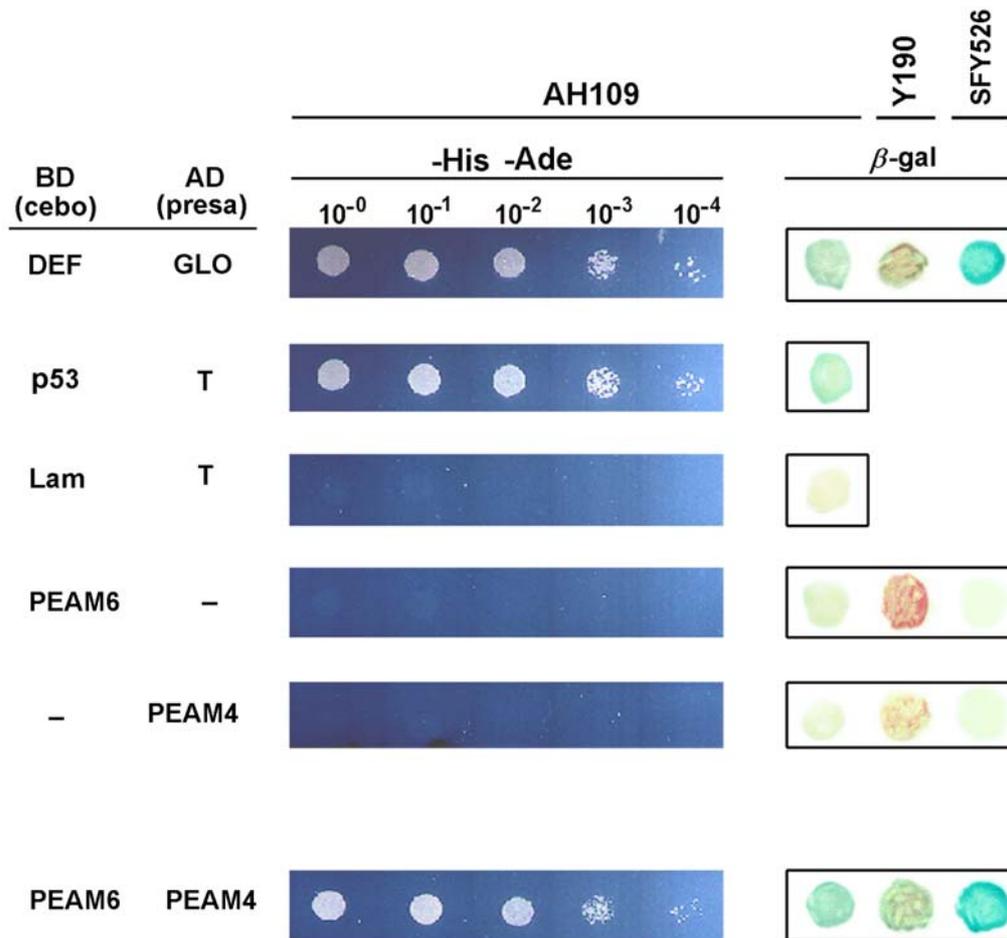
El fragmento derivado del cDNA de *PEAM6* se fusionó al dominio de unión a DNA del factor transcripcional GAL4 (DNA-BD), en el plásmido pGBKT7, mientras que el fragmento del cDNA de *PEAM4* se fusionó al dominio de activación del factor transcripcional GAL4 (AD), en el plásmido pACT2. Una vez generadas las construcciones híbridas para estos genes, BD-*PEAM6* (cebo) y AD-*PEAM4* (presa), se transformó la cepa de levadura AH109, que contiene los genes delatores *HIS3*, *ADE2* y *LacZ* bajo el control de promotores mínimos que contienen distintas secuencias de respuesta (UASs) al factor transcripcional GAL4 de manera independiente con cada una de las construcciones. Se testó en cada caso que dichas construcciones no activaban por sí solas los genes delatores en esta cepa. Para ello, colonias que contenían cada una de las construcciones se sembraron en paralelo en cajas de medio de selección sin histidina SD/-Trp(o -Leu)/-His, con distintas concentraciones del inhibidor 3-AT (0-50 mM), para optimizar aquella concentración que controla el fondo de crecimiento de la cepa transformada en medio selectivo, así como en cajas de medio de selección sin adenina SD/-Trp (o -Leu)/-Ade o en cajas de medio de selección sin ambos nutrientes SD/-Trp (o -Leu)/-His/-Ade. Estas colonias se cultivaron también en medio selectivo SD/-Trp/-Leu para, posteriormente, someterlas al ensayo en filtro de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Se comprobó en ambos casos que dichas construcciones no activaban los genes delatores, si bien en el caso de la cepa transformada con la construcción BD-*PEAM6*

fue necesaria la adición de 5 mM del inhibidor 3-AT para controlar el fondo de crecimiento en medio selectivo, debido a la expresión rezumante del gen *HIS3*.

A continuación, la cepa AH109 se transformó de manera secuencial con las construcciones híbridas, BD-*PEAM6* y AD-*PEAM4*. Para testar la interacción entre PEAM4 y PEAM6 en levadura, las colonias que contenían ambas construcciones se ensayaron para la activación de los tres genes delatores *HIS3*, *ADE2* y *LacZ*. Se sembraron diluciones seriadas ( $10^0$ - $10^{-4}$ ) a partir de una colonia que contenía las dos construcciones híbridas, en un medio selectivo SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade y se evaluó el efecto de estas construcciones en el crecimiento. Colonias de levadura que contenían la pareja de construcciones pGBT9-*DEF* (cebo) y pGADT7-*GLO* (presa), así como otras que contenían las construcciones pGBKT7-53 (cebo) y pGADT7-*T* (presa), se usaron como controles positivos de dos parejas de proteínas, DEFICIENS y GLOBOSA, y la murina p53 y el antígeno T del virus SV40, que se sabe que interaccionan en un ensayo de doble híbrido en levadura (Davies *et al.*, 1996a; Iwabuchi *et al.*, 1993; Li y Fields, 1993). Como control negativo se utilizaron colonias de levadura que contenían las construcciones pGBKT7-*Lam* (cebo) y pGADT7-*T* (presa). La Lámina C humana y el antígeno T del virus SV40 son dos proteínas que se sabe que no interaccionan en levadura; en general, pGBKT7-*Lam* nunca forma complejos ni interacciona con la mayoría de proteínas (Bartel *et al.*, 1993; S. Fields, no publicado; Ye y Worman, 1995). También se sembraron células que contenían las construcciones BD-*PEAM6* y el plásmido pACT2 sin inserto y otras que contenían las construcciones AD-*PEAM4* y el plásmido pGBKT7 sin inserto. El resultado de este experimento se muestra en la figura 67.

Como se puede observar, las células de levadura que contenían simultáneamente las construcciones BD-*PEAM6* y AD-*PEAM4* eran capaces de crecer normalmente en un medio sin histidina ni adenina, de manera similar a como lo hacían los controles positivos. Las células de levadura que contenían las construcciones BD-*PEAM6* y el plásmido pACT2, así como las que contenían las construcciones AD-*PEAM4* y el plásmido pGBKT7 eran incapaces de crecer en ese mismo medio, comportándose ambas como el control negativo. Este resultado indica que en la cepa de levadura AH109 estas dos proteínas interaccionan activando la expresión de los genes delatores *HIS3* y *ADE2*. Un resultado similar en esta misma cepa se obtuvo al sembrar las que contenían las distintas construcciones en cajas de medio SD/-Trp/-Leu/-His con 5 mM de 3AT.

La interacción entre PEAM4 y PEAM6 se testó también en la cepa de levadura AH109 mediante un ensayo de la activación del gen delator *LacZ*. Para ello, colonias de levadura que contenían las distintas construcciones se sembraron en una caja de medio selectivo SD/-Trp/-Leu y se ensayó su actividad  $\beta$ -galactosidasa en filtro de nitrocelulosa. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 67. Se observó que, tras aproximadamente media hora de



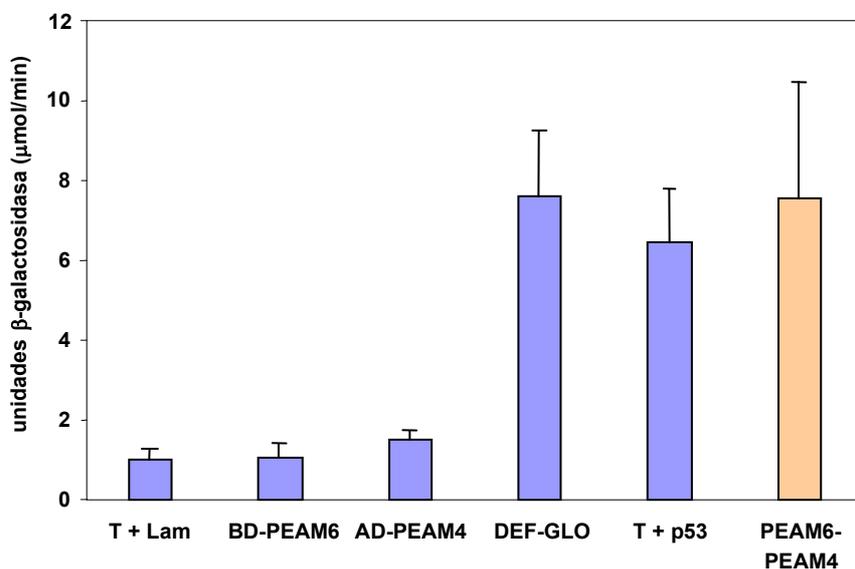
**Figura 67. Ensayo de interacción entre las proteínas PEAM4 y PEAM6 mediante el sistema del doble híbrido en levadura.** En el centro se muestra el ensayo de la activación de los genes delatores *HIS3* y *ADE2* en la cepa AH109. En un medio selectivo SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade se sembraron diluciones seriadas (10<sup>0</sup>-10<sup>-4</sup>) a partir de distintas colonias de la cepa AH109 que contenían las construcciones híbridas indicadas a la izquierda de la figura, y se observó el efecto de las diferentes construcciones en el crecimiento. A la derecha de la figura, se muestra el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, en filtro de nitrocelulosa, en las cepas AH109, Y190 y SFY526 cotransformadas con las distintas combinaciones de construcciones; los resultados mostrados corresponden a 1 hora de incubación a 37°C.

media hora de incubación a 37°C, los controles positivos y la levadura que contenía las construcciones BD-*PEAM6* y AD-*PEAM4* empezaron a mostrar una clara coloración azul, que se intensificó notablemente en todas ellas tras una hora de incubación (Figura 67). Las levaduras en las que una de las dos proteínas, PEAM4 o PEAM6, estaba ausente, así como el control negativo, no mostraron actividad  $\beta$ -galactosidasa a ninguno de los tiempos ensayados. Este resultado indica que PEAM4 y PEAM6 interaccionan en la cepa de levadura AH109 activando el gen delator *LacZ*.

Para verificar el resultado positivo de la interacción entre PEAM4 y PEAM6 en la cepa AH109, también se llevó a cabo el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas Y190

y SFY526. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 67. En este ensayo no se incluyeron ni el control positivo de la interacción BD-53/AD-T ni el control negativo BD-Lam/AD-T; como controles negativos se utilizaron las levaduras expresando sólo una de las dos proteínas, PEAM4 o PEAM6, que en la cepa AH109 no mostraron actividad  $\beta$ -galactosidasa. Tal y como ocurría en la cepa AH109, sólo el control positivo y la cepa de levadura expresando *PEAM6* y *PEAM4* mostraron actividad  $\beta$ -galactosidasa. La actividad  $\beta$ -galactosidasa es significativamente mayor en la cepa SFY526 que en las otras dos, si bien las diferencias observadas entre las distintas cepas como resultado de una inducción por interacción positiva se pueden explicar por posibles diferencias de expresión del gen *LacZ* debido a los diferentes promotores a los que se halla fusionado dicho gen en las distintas cepas.

Para tener una idea de la intensidad de la interacción entre PEAM4 y PEAM6, sugerida por los resultados anteriores, se llevó a cabo un ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en líquido, usando como sustrato el ONPG, en la cepa AH109. Para compensar la variabilidad en las determinaciones para cada combinación de construcciones, el ensayo se llevó a cabo a partir de tres colonias cotransformantes diferentes, y para cada una de ellas éste se realizó por duplicado. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 68.



**Figura 68. Cuantificación de la interacción entre PEAM6 y PEAM4 en la cepa AH109 mediante un ensayo en líquido de la actividad  $\beta$ -galactosidasa usando como sustrato el ONPG.** Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de unidades de  $\beta$ -galactosidasa ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), usando como sustrato el ONPG y fueron calculados a partir de dos ensayos independientes llevados a cabo a partir de tres colonias distintas para cada una de las levaduras transformadas con las construcciones que se indican en el eje horizontal. La reacción se paró 93 min después de la adición del sustrato.

Se observó una actividad residual de aproximadamente 1 unidad  $\beta$ -galactosidasa tanto en el control negativo como en los transformantes que expresaban sólo *PEAM4* ó *PEAM6*. Sin embargo, en los transformantes que expresaban simultáneamente *PEAM4* y *PEAM6* la actividad  $\beta$ -galactosidasa alcanzaba un valor de 7'5 unidades, similar al mostrado por el control positivo BD-DEF/AD-GLO, y ligeramente superior al mostrado por el control positivo BD-T/AD-53. Estos resultados muestran que *PEAM4* y *PEAM6* interaccionan en un ensayo de doble híbrido en levadura y que, además, esta interacción es aproximadamente tan fuerte como la mostrada por DEF+GLO o T+p53.

### **3.3.2. RASTREO DE UNA GENOTECA DE cDNA DE ÁPICES FLORALES DE GUISANTE USANDO COMO CEBO LOS PRODUCTOS DE LOS GENES *PEAM4* Y *PEAM6***

Para identificar genes cuyos productos interaccionan con *PEAM4* y *PEAM6* se llevó a cabo el rastreo de una genoteca de expresión en levadura para ensayos de doble híbrido de cDNA de ápices florales de guisante que contenían flores en estadios comprendidos entre -8 a -2 días antes de la antesis, usando como cebo *PEAM4* y *PEAM6*. La genoteca se había preparado en el vector plasmídico pACT2, en este vector los cDNAs se hallaban fusionados al dominio de activación del factor transcripcional GAL4.

Para obtener los cebos, las secuencias codificantes de los cDNAs de *PEAM4* y *PEAM6* se amplificaron por PCR con cebadores específicos, y se generaron construcciones híbridas mediante la fusión de los fragmentos amplificados de cada uno de los genes al dominio de unión a DNA de GAL4 en el plásmido pGBKT7.

A continuación, se transformaron las cepas de levadura AH109, Y190 y Hf7c, de manera independiente, con las construcciones BD-*PEAM4* y BD-*PEAM6* y se ensayó, en cada caso, si las construcciones activaban de manera autónoma la expresión de los genes delatores *HIS3*, *ADE2* (en la cepa AH109) y *LacZ*. Se comprobó que la construcción BD-*PEAM4* activaba los genes delatores en las distintas cepas, de manera que células transformadas con esta construcción eran capaces de crecer normalmente en un medio sin histidina (SD/-Trp/-His), aún añadiéndole concentraciones superiores a 50 mM de 3-AT. Las células transformadas de la cepa AH109 fueron además capaces de crecer en un medio sin adenina (SD/-Trp/-Ade), o sin histidina ni adenina (SD/-Trp/-His/-Ade). En las tres cepas, las células transformadas con BD-*PEAM4* también dieron coloración azul en el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Por tanto, se descartó el uso de la construcción de *PEAM4* como cebo en el rastreo de la librería de cDNA.

Para la construcción BD-*PEAM6* se comprobó que ésta no activaba la expresión de los genes delatores en ninguna de las cepas ensayadas, si bien fueron necesarias

concentraciones de 5 mM o de 40 mM del inhibidor 3-AT para controlar el fondo de crecimiento de las cepas AH109 e Y190, respectivamente; estas fueron las concentraciones de inhibidor que se usaron más tarde en el rastreo de la genoteca de cDNA.

Para su rastreo, alícuotas de 100  $\mu$ g de la genoteca de expresión de ápices florales de guisante se transformaron en las tres cepas de levadura previamente transformadas con la construcción BD-PEAM6. En la tabla 34 se resumen los resultados de los distintos rastreos llevados a cabo usando como cebo PEAM6, dos de ellos en la cepa AH109, uno en la cepa Y190 y otro en la cepa Hf7c.

**Tabla 34. Resultado de los rastreos, en distintas cepas de levadura, de la genoteca de expresión para doble híbrido de cDNA de ápices florales de guisante usando como cebo PEAM6.**

| Cepa de levadura | Nº de transformantes rastreados <sup>a</sup> | °Colonias His <sup>+</sup>             |                               |   |
|------------------|--|--|-------------------------------|---|
|                  |  | <sup>b</sup> Colonias His <sup>+</sup> | <sup>c</sup> Ade <sup>+</sup> | <sup>d</sup> Colonias LacZ <sup>+</sup> |
| AH109            | 2'5x10 <sup>6</sup>                          | 261                                    | 198                           | 141                                     |
| AH109            | 3 x10 <sup>6</sup>                           | 350                                    | 331                           | 331                                     |
| Y190             | 1'3x10 <sup>6</sup>                          | 289                                    | -                             | 48                                      |
| HF7c             | 10 <sup>6</sup>                              | 700                                    | -                             | 3                                       |

<sup>a</sup> Número de transformantes rastreados, estimados a partir del número de colonias capaces de crecer en un medio sin triptófano ni leucina en una muestra de las células transformadas.

<sup>b</sup> Colonias capaces de crecer en un medio sin histidina con 5 mM del inhibidor 3-AT para los rastreos realizados en la cepa AH109 y 40 mM para el de la cepa Y190.

<sup>c</sup> Colonias capaces de crecer en un medio sin histidina ni adenina.

<sup>d</sup> Colonias His<sup>+</sup> Ade<sup>+</sup> que dan coloración azul en un ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

Los transformantes en los que se activaba la expresión de los genes delatores se seleccionaron por su capacidad de crecer en medios selectivos a los que le falta histidina (SD/-Trp/-Leu/-His) y que contenían 5 mM del inhibidor 3-AT, en el caso de la cepa AH109, o 40 mM, en el de la cepa Y190 (Tabla 34); en el caso de la cepa Hf7c no se necesitó la adición del inhibidor. Las colonias His<sup>+</sup> de la cepa AH109 que se identificaron en el rastreo inicial se sometieron a un nuevo ensayo para medir la expresión de los genes *HIS3* y *ADE2* mediante su siembra en un medio sin histidina ni adenina (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade). En las colonias positivas para la activación de ambos genes (His<sup>+</sup> Ade<sup>+</sup>) se testó la activación del gen delator *LacZ* mediante el ensayo, en filtro de nitrocelulosa, de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Este ensayo se llevó a cabo también en las colonias His<sup>+</sup> de las cepas Y190 y Hf7c.

Se llevó a cabo el rescate del plásmido con el dominio de activación de seis de los 141 clones resultantes del primer rastreo en la cepa AH109 que habían mostrado una fuerte coloración azul en el ensayo en filtro de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Tabla 34); en la tabla 35 se muestra una relación de los clones analizados.

**Tabla 35. Análisis de los clones His<sup>+</sup> Ade<sup>+</sup> Lacz<sup>+</sup> de la cepa AH109.**

| Nº de clon | Tamaño del inserto | Homología   |
|------------|--------------------|---|
| 21         | 662 pb             | PT8P19.601At3g48550 putativa proteína de tipo zinc-finger [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] |
| 35         | 1115               | <i>PEAM4</i>  |
| 38         | 765                | AJ000995 proteína homóloga a DnaJ [ <i>Medicago sativa</i> ]                              |
| 51         | -                  | -   |
| 78         | 615                | <i>PEAM4</i>  |
| 82         | 1111               | <i>PEAM4</i>  |

Las secuencias correspondientes a los insertos de cDNA en tres de estos plásmidos correspondían al gen MADS-box *PEAM4*. Dos de los clones de cDNA de *PEAM4* son completos (clon 82 y 35), iguales entre sí, y de secuencia esencialmente idéntica a la secuencia de *PEAM4* previamente descrita (Berbel *et al.*, 2001); la única diferencia con este último consistía en que ambos clones presentan 30 nucleótidos más en la región 3' que la secuencia de *PEAM4*.

El otro clon de cDNA de *PEAM4* aislado (clon 78) es un clon parcial correspondiente a la mitad carboxilo terminal de la proteína a la que le falta la secuencia que codifica para los aa de 1-119. Este clon tiene en la región 3' 64 nucleótidos más que la secuencia de *PEAM4* (AJ291298), de los que los 30 primeros son idénticos a los de los clones completos. Este clon presenta además 35 nucleótidos no presentes en la secuencia de *PEAM4*, en la región 5', y que probablemente se deben a un artefacto generado en el proceso de generación de la genoteca de cDNA.

El clon 21 mostró en el análisis BLASTA una puntuación de 129 bits (322) y una identidad del 66% con el clon PT8P19.601At3g48550 de *Arabidopsis thaliana*, que codifica para una presunta proteína de tipo zinc-finger. El clon 38 mostró en el análisis BLASTA una puntuación de 288 bits (738) y una identidad del 72% con el clon AJ000995 de *Medicago sativa*, que codifica para una proteína de tipo DnaJ. El clon 51 no contenía inserto.

El aislamiento de *PEAM4* en el rastreo de una genoteca de cDNA de ápices florales de guisante usando como cebo el gen *PEAM6*, confirma la interacción en levadura entre estas dos proteínas puesta de manifiesto en los experimentos descritos en el apartado anterior.

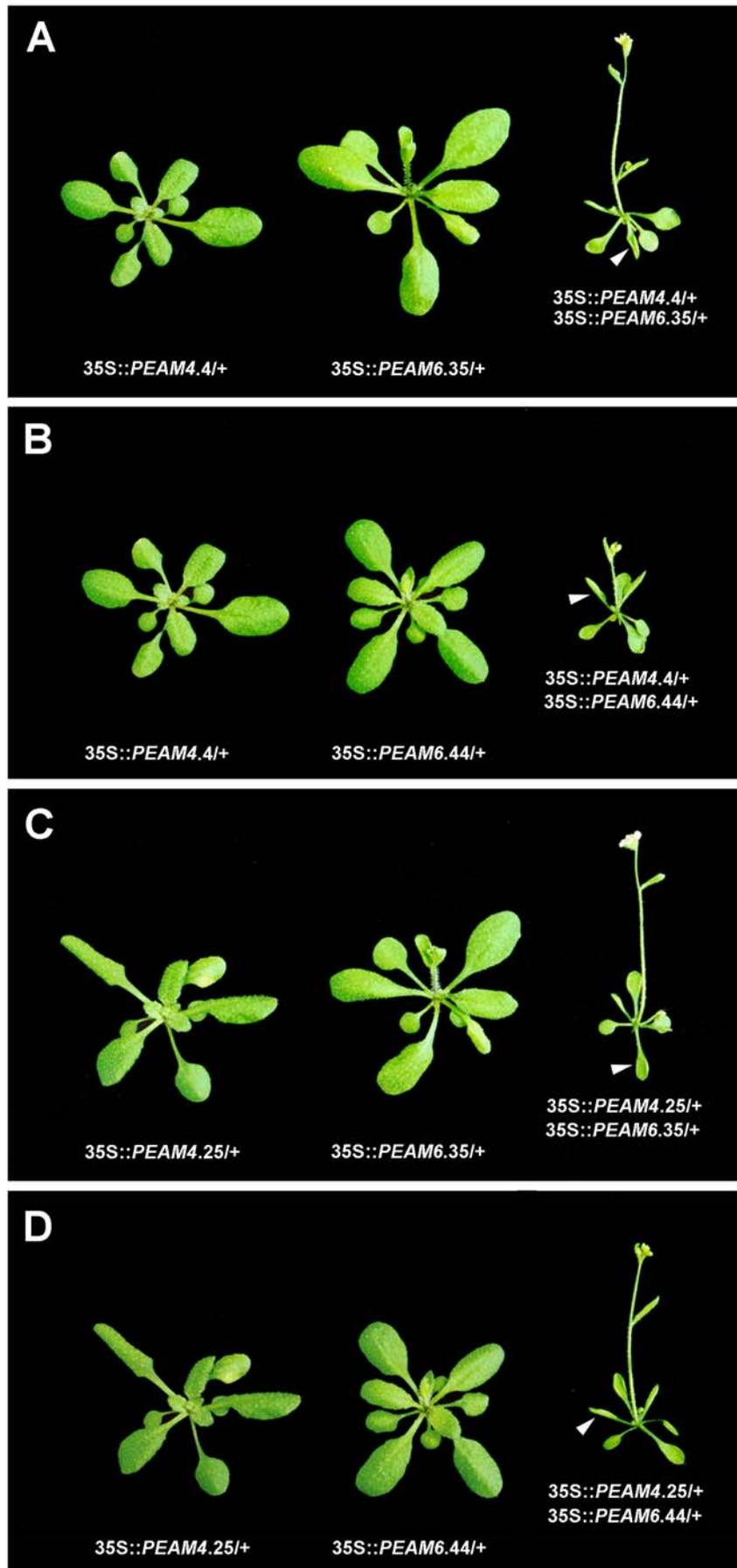
### **3.3.3. INTERACCIONES GENÉTICAS ENTRE LOS TRANSGENES 35S::*PEAM6* Y 35S::*PEAM4***

El resultado de los experimentos descritos en los apartados previos mostró que los polipéptidos codificados por *PEAM4* y *PEAM6* interaccionan en un ensayo de doble híbrido en levadura. Para buscar otro tipo de evidencias de la posible interacción entre *PEAM4* y *PEAM6*, se cruzaron entre sí plantas transgénicas que expresaban esos genes de manera constitutiva.

Para los cruces se utilizaron dos líneas transgénicas homocigotas representativas de 35S::*PEAM6*, la línea 35S::*PEAM6.44*, que no mostraba fenotipo en homocigosis como consecuencia de un silenciamiento del transgén, y la línea 35S::*PEAM6.35*, con un claro fenotipo tanto en hemizigosis como en homocigosis. También se utilizaron dos líneas transgénicas homocigotas representativas de 35S::*PEAM4*, la 35S::*PEAM4.4* y la 35S::*PEAM4.25*, ambas con fenotipo de adelanto de la floración. Como controles, se cruzaron las distintas plantas homocigotas para cada uno de los transgenes con plantas silvestres para obtener las correspondientes plantas hemizigotas simples.

#### **3.3.3.1. Efecto de la expresión constitutiva y simultánea de *PEAM4* y *PEAM6* en el tiempo de floración de *Arabidopsis***

Las plantas resultantes de los distintos cruces se cultivaron bajo condiciones de DL y DC. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 69 y en las tablas 36 y 37. Bajo condiciones de día largo los dobles hemizigotos 35S::*PEAM6*/35S::*PEAM4* florecen con un número inferior de hojas y muestran un fenotipo más severo que los correspondientes hemizigotos simples para cada uno de los transgenes (Figura 69; Tabla 36). En los cruces de la línea 35S::*PEAM6.35*, el tiempo de floración es, además, inferior al mostrado por las plantas homocigotas para cada uno de los transgenes (comparar tablas 24, 29 y 36). En las plantas resultantes de los cruces de la línea silenciada 35S::*PEAM6.44* con las distintas líneas 35S::*PEAM4* el valor del número de hojas es también inferior, en ambos casos, al valor mostrado por las plantas homocigotas de la línea 35S::*PEAM6.44* reduciéndose a la mitad, si bien es ligeramente inferior o igual al valor de las correspondientes plantas homocigotas 35S::*PEAM4* (comparar tablas 24, 29 y 36).



Bajo condiciones de día corto los fenotipos de los dobles hemizigotos son menos extremos que en día largo, aunque también florecen con un número inferior de hojas que los correspondientes hemizigotos simples cultivados en día corto. Bajo condiciones de día corto las plantas resultantes de los cruces de la línea 35S::*PEAM6.35* con las líneas 35S::*PEAM4* florecen con un número de hojas significativamente inferior al de las plantas homocigotas 35S::*PEAM4* y ligeramente superior al de las plantas homocigotas 35S::*PEAM6.35* (comparar tablas 25, 30 y 37). En el caso de las plantas resultantes de los cruces de la línea silenciada 35S::*PEAM6.44* con las líneas 35S::*PEAM4*, el valor del número de hojas en condiciones de día corto es inferior al mostrado por las plantas homocigotas para cada uno de los transgenes siendo esta reducción notablemente más significativa que la observada en DL (comparar tablas 25, 30 y 37).

En estos dobles hemizigotos se ha observado que el incremento en el número de hojas en plantas cultivadas en día corto frente a las cultivadas en día largo es de tres veces (frente a las seis de las plantas control y 35S::*PEAM4*) mientras que en las plantas homocigotas 35S::*PEAM6* es de dos veces (Tablas 36 y 37). Estos datos sugieren que aunque los dobles hemizigotos 35S::*PEAM4/35S::*PEAM6* muestran un comportamiento frente al fotoperiodo muy similar al mostrado por las plantas homocigotas 35S::*PEAM6*, sin embargo, en los dobles hemizigotos la insensibilidad al fotoperiodo no es tan acentuada como en las plantas homocigotas *PEAM6*; esta pérdida de la insensibilidad podría estar causada por la presencia de *PEAM4*.*

### 3.3.3.2. Efecto de la expresión constitutiva y simultánea de *PEAM4* y *PEAM6* en la arquitectura de *Arabidopsis*

Además del fenotipo de adelanto de floración, los dobles hemizigotos 35S::*PEAM6/35S::*PEAM4* mostraron cambios en la arquitectura de la inflorescencia similares a los encontrados en las plantas homocigotas para cada uno de los transgenes, aunque con una frecuencia más alta. En los dobles hemizigotos el meristemo apical se determina prematuramente en un meristemo floral dando lugar a la formación de una flor terminal (Figuras 69 y 70A y C; Tabla 36). La frecuencia de formación de flores terminales*

---

**Figura 69. Fenotipo de los dobles hemizigotos 35S::*PEAM4/35S::*PEAM6* de *Arabidopsis*.*** En los diferentes paneles se muestran plantas hemizigotas 35S::*PEAM4/+*, 35S::*PEAM6/+* y dobles hemizigotos 35S::*PEAM6/35S::*PEAM4*. Las plantas que aparecen en cada panel fueron cultivadas durante el mismo número de días. Las puntas de flecha señala en todos los casos la presencia de una hoja curvada de roseta.*



Tabla 36. Efecto de la expresión constitutiva conjunta de *PEAM4* y *PEAM6* en plantas de *Arabidopsis* crecidas bajo condiciones de día largo (DL).

| Línea   | n <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales | Flores terminales <sup>d</sup> | Flores axilares <sup>e</sup> | Flores axilares <sup>f</sup> | Flores axilares <sup>g</sup> | Hoja curvada R <sup>h</sup> | I <sup>i</sup> | R+I <sup>j</sup> |
|---|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|
| pBinJIT60 (control) <sup>k</sup>                  | 11             | 11'7 ± 0'9                   | 2'8 ± 0'4                     | 14'5 ± 1'1    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM4.4</i> / <sup>ll</sup>              | 21             | 7'6 ± 1'0                    | 2'1 ± 0'6                     | 9'7 ± 1'1     | 0                              | 0                            | 5                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i> /+                          | 15             | 8'5 ± 1'0                    | 2'2 ± 0'5                     | 10'5 ± 1'4    | 0                              | 0                            | 4                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6.35</i> /+                          | 15             | 5'7 ± 0'6                    | 2'9 ± 0'4                     | 8'7 ± 0'7     | 0                              | 2                            | 15                           | 0                            | 0                           | 13             | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6.44</i> /+                          | 12             | 5'9 ± 0'9                    | 2'1 ± 0'6                     | 8 ± 0'8       | 0                              | 3                            | 8                            | 0                            | 0                           | 5              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM4.4</i> /+ 35S:: <i>PEAM6.35</i> /+  | 13             | 3'5 ± 0'7                    | 2'5 ± 0'6                     | 5'9 ± 1'1     | 13                             | 12                           | 5                            | 5                            | 0                           | 0              | 13               |
| 35S:: <i>PEAM4.4</i> /+ 35S:: <i>PEAM6.44</i> /+  | 13             | 5'2 ± 0'8                    | 2'2 ± 0'7                     | 7'4 ± 0'7     | 0                              | 5                            | 9                            | 0                            | 2                           | 2              | 5                |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i> /+ 35S:: <i>PEAM6.35</i> /+ | 15             | 3'5 ± 0'6                    | 1'9 ± 0'7                     | 5'5 ± 1'1     | 15                             | 15                           | 0                            | 8                            | 0                           | 0              | 15               |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i> /+ 35S:: <i>PEAM6.44</i> /+ | 13             | 4'1 ± 0'5                    | 2'6 ± 0'5                     | 6'7 ± 0'5     | 9                              | 10                           | 7                            | 0                            | 2                           | 0              | 11               |

<sup>a</sup>n: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> Número de plantas en las cuales el tallo principal acaba en una flor.

<sup>e</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en el tallo principal.

<sup>f</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en coflorescencias.

<sup>g</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de roseta.

<sup>h</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la roseta (R).

<sup>i</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la inflorescencia (I).

<sup>j</sup> Número de plantas que presentan hoja curvada tanto en la roseta como en la inflorescencia (R + I).

<sup>k</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM6*.

<sup>l</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM4* y 35S::*PEAM6* hemizigotas numeradas 4, 25 y 35, 44 respectivamente.

<sup>ll</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM4* / 35S::*PEAM6* doble hemizigotas.



**Tabla 37. Efecto de la expresión constitutiva conjunta de *PEAM4* y *PEAM6* en plantas de *Arabidopsis* crecidas bajo condiciones de día corto (DC).**

| Línea   | <i>n</i> <sup>a</sup> | Hojas de roseta <sup>b</sup> | Hojas de caulinares <sup>c</sup> | Hojas totales | Flores terminales <sup>d</sup> | Flores axilares <sup>e</sup> | Flores axilares <sup>f</sup> | Hoja curvada R <sup>h</sup> | I <sup>i</sup> | R+I <sup>j</sup> |
|---|-----------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|
| pBinJIT60 (control) <sup>k</sup>  | 12                    | 76'3 ± 2'6                   | 9'7 ± 0'8                        | 85'9 ± 2'7    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM4.4</i> / <sup>ll</sup>                                      | 21                    | 56'4 ± 3'0                   | 9'0 ± 0'7                        | 65'4 ± 2'9    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i> / <sup>l</sup>                                      | 16                    | 54'7 ± 3'9                   | 8'6 ± 0'7                        | 63'2 ± 3'7    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6.35</i> / <sup>l</sup>                                      | 17                    | 19 ± 3'4                     | 5'2 ± 1'3                        | 24'2 ± 4'5    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM6.44</i> / <sup>l</sup>                                      | 10                    | 20'1 ± 5'9                   | 6'2 ± 1'7                        | 26'3 ± 7'1    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM4.4</i> / <sup>l</sup> 35S:: <i>PEAM6.35</i> / <sup>l</sup>  | 16                    | 11'4 ± 2'6                   | 3'4 ± 0'9                        | 14'9 ± 2'9    | 0                              | 0                            | 3                            | 0                           | 4              | 2                |
| 35S:: <i>PEAM4.4</i> / <sup>l</sup> 35S:: <i>PEAM6.44</i> / <sup>l</sup>  | 14                    | 18'1 ± 5'2                   | 4'1 ± 1'4                        | 22'3 ± 6'3    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 0              | 0                |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i> / <sup>l</sup> 35S:: <i>PEAM6.35</i> / <sup>l</sup> | 13                    | 11'8 ± 2'5                   | 3'7 ± 0'8                        | 15'5 ± 3'0    | 0                              | 0                            | 2                            | 0                           | 4              | 1                |
| 35S:: <i>PEAM4.25</i> / <sup>l</sup> 35S:: <i>PEAM6.44</i> / <sup>l</sup> | 15                    | 11'5 ± 2'9                   | 3'4 ± 0'7                        | 14'9 ± 3'3    | 0                              | 0                            | 0                            | 0                           | 4              | 0                |

<sup>a</sup> *n*: número de plantas analizadas.

<sup>b</sup> Hojas de roseta: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>c</sup> Hojas caulinares: valores expresados como la media ± desviación estándar.

<sup>d</sup> Número de plantas en las cuales el tallo principal acaba en una flor.

<sup>e</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en el tallo principal.

<sup>f</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de inflorescencia en coflorescencias.

<sup>g</sup> Número de plantas en las cuales se observaron flores solitarias sostenidas por una hoja de roseta.

<sup>h</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la roseta (R).

<sup>i</sup> Número de plantas que sólo presentan hoja curvada en la inflorescencia (I).

<sup>j</sup> Número de plantas que presentan hoja curvada tanto en la roseta como en la inflorescencia (R + I).

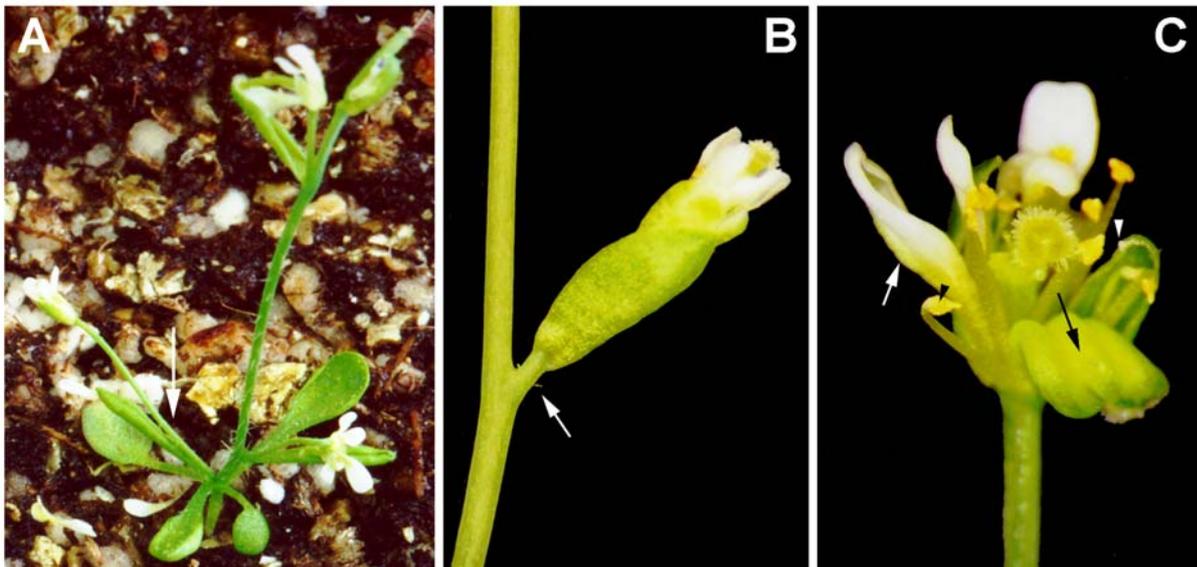
<sup>k</sup> El control es una línea transgénica homocigota para el vector pBinJIT60 sin inserto 35S::*PEAM6*.

<sup>l</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM4* y 35S::*PEAM6* hemizigotas numeradas 4, 25 y 35, 44 respectivamente.

<sup>ll</sup> Líneas transgénicas independientes 35S::*PEAM4* / 35S::*PEAM6* doble hemizigotas.

en los dobles hemizigotos en DL es superior a la mostrada por las plantas homocigotas para cada transgén, llegando a ser del 100% en los fenotipos más severos. En las plantas dobles hemizigotas derivadas de la línea 35S::PEAM6.35, que muestran los fenotipos más severos, se ha observado que todas las coflorescencias y ramas secundarias se determinan en una estructura terminal. Este fenómeno no se observó en los dobles hemizigotos con la línea 35S::PEAM6.44. No se ha observado la formación de flores terminales en los dobles hemizigotos crecidos bajo condiciones de DC (Tabla 37).

En conjunto, la apariencia de estas flores terminales es similar a las formadas en las plantas 35S::PEAM6, aunque en ellas se ha observado una menor frecuencia de las estructuras carpeloides en estas flores y algunas transformaciones homeóticas como características diferenciales. Se han observado frecuentemente transformaciones homeóticas de diversos órganos florales, principalmente estambres hacia carpelo y, en menor grado, de sépalos a carpelos, así como carpelos hipertrofiados parcialmente enroscados como en las flores terminales 35S::PEAM6 (Figura 70C). También se han identificado fusiones sépalo-pétalo



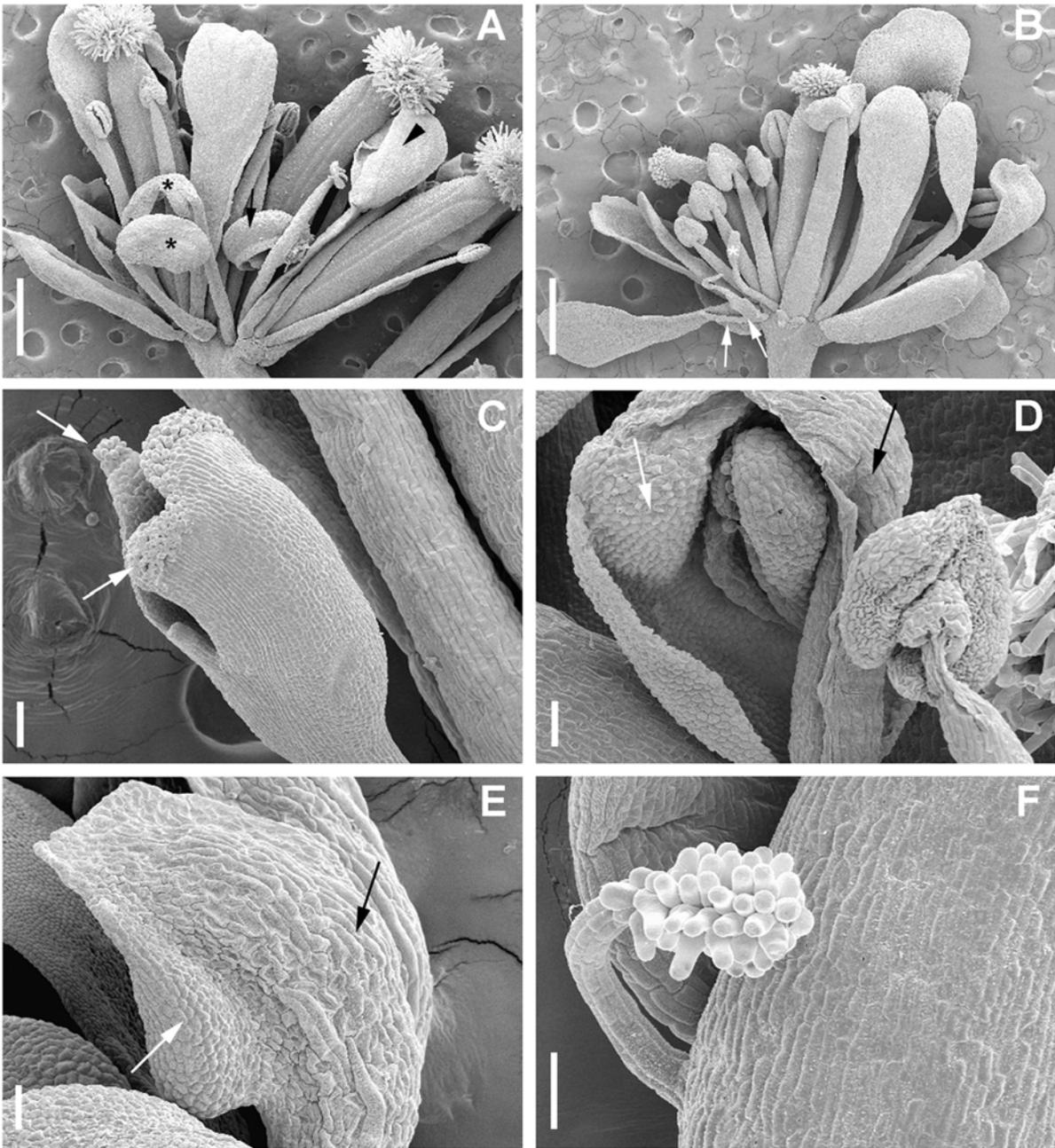
**Figura 70. Fenotipo de los dobles hemizigotos 35S::PEAM6/36S::PEAM4. (A)** Planta del cruce 35S::PEAM6.35/35S::PEAM4.25 que florece tras producir sólo 3 hojas de roseta, que se muestran curvadas hacia el haz. Esta planta desarrolla dos flores axilares sostenidas por hojas caulinares, que también se muestran curvadas hacia el haz, antes de determinarse en una flor terminal. La flecha señala una flor solitaria desarrollada en la axila de una hoja de roseta. **(B)** Detalle de una hoja caulinar curvada sosteniendo una flor solitaria, próxima a la flor terminal de un doble hemizigoto 35S::PEAM6.35/35S::PEAM4.4. La flecha señala una de las estructuras filiformes de apariencia carpeloide desarrolladas en el pedúnculo floral. **(C)** Detalle de una flor terminal de una planta 35S::PEAM6.35/35S::PEAM4.25; la flecha negra señala un carpelo hipertrofiado y curvado hacia abajo. En la zona distal de uno de los sépalos se desarrollan papilas estigmáticas señaladas con una punta de flecha. Son frecuentes en estas flores la fusión de sépalos y pétalos, enroscándose estos últimos hacia el interior desde la zona media hacia la zona distal (flecha blanca). La punta de flecha negra señala un estambre de tamaño reducido en el que las anteras, de forma alargada, presentan características carpeloides.

y la presencia de pétalos enroscados, características no observadas en las flores terminales 35S::*PEAM6* (Figura 70C).

El fenotipo de las flores terminales más alteradas así como de las flores axilares más cercanas a éstas se analizó mediante SEM (Figura 71) lo que permitió observar con detalle las alteraciones homeóticas presentes en estas flores. Las transformaciones homeóticas más frecuentes son las observadas en los estambres, los cuales se transforman en estructuras carpeloides. Estos órganos se muestran como estructuras en las que el filamento no parece mostrar alteraciones morfológicas aparentes aunque adquiere un tamaño reducido con respecto a los controles y en su extremo se desarrollan las anteras como estructuras más o menos alargadas (Figura 71A), en cuya zona distal se diferencian frecuentemente papilas estigmáticas y células típicas del tejido carpeloide (Figura 71C). Los pétalos aparecen enroscados hacia el interior, principalmente en su zona distal, aunque no se ha observado transformación homeótica en estos órganos (Figura 71A). A menudo se observan sépalos cuya zona distal se ha transformado en tejido petaloide que tiende a enroscarse hacia abajo (Figura 71D). Otra transformación homeótica que también se ha identificado en los sépalos es la aparición en éstos de estructuras estaminoides, siendo las zonas distales de los márgenes las zonas más transformadas (Figura 71E). Con bastante frecuencia los sépalos aparecen como estructuras filiformes, que parecen no haber completado su desarrollo y se muestran como vestigios de órgano en el “verticilo” externo de la estructura terminal (figura 71B). En las flores axilares más cercanas a la estructura terminal es frecuente observar la formación de estructuras carpeloides de forma filiforme y con papilas estigmáticas en su extremo, bien en la zona de unión con la hoja caulinar o en la unión de ésta al tallo principal (Figura 71F).

También se ha observado en los dobles hemizigotos, cultivados en DL, la formación de flores solitarias en las axilas de las hojas caulinares (Figura 70; Tabla 36). La formación de flores axilares se ha observado tanto en la inflorescencia principal como en las coflorescencias e inflorescencias secundarias, con una frecuencia superior a la observada para las líneas homocigotas para cada uno de los transgenes (comparar tablas 24, 29 y 36). En ocasiones estas flores desarrollan uno o dos pétalos adicionales (no mostrado).

Como algo destacable se ha observado también en estas plantas la formación de flores solitarias, sostenidas por un largo pedúnculo, en las axilas de algunas hojas de roseta, reemplazando las inflorescencias secundarias que se desarrollan normalmente en una planta control (Figura 70A; Tabla 36). Esto nunca se ha observado en las plantas 35S::*PEAM6* ni en las 35S::*PEAM4*.



En los dobles hemizigotos también se ha observado la presencia de hojas caulinares y de roseta curvadas hacia el haz, que normalmente se suelen presentar simultáneamente en una misma planta (Figura 69; Figura 70A y B; Tabla 36); la presencia simultánea de ambos tipos de hoja ocurre con menor frecuencia en las plantas 35S::*PEAM6* y prácticamente no se observan en las plantas 35S::*PEAM4*. En ocasiones se ha podido observar curvatura incluso en algunos cotiledones de los dobles hemizigotos de fenotipo más severo (no mostrado).

Tal y como ocurría en las plantas 35S::*PEAM4* y 35S::*PEAM6*, a excepción de las flores que constituyen la estructura terminal y de algunas flores axilares, las flores de las plantas dobles hemizigotas son normales, no mostrando alteraciones con respecto a las flores de las plantas control, lo que indica que la expresión constitutiva conjunta de *PEAM6* y *PEAM4* no produce alteraciones en el desarrollo de la flor.

La intensificación sinérgica de los fenotipos de floración temprana en las plantas que contienen ambos transgenes con respecto a las plantas que sólo portan uno de ellos, con la aparición de características fenotípicas nuevas, apoya la idea de que *PEAM4* y *PEAM6* interaccionen “*in planta*”.

---

**Figura 71. Fenotipos de las flores terminales de los dobles hemizigotos 35S::*PEAM4*/35S::*PEAM6* observados mediante microscopía electrónica de barrido. (A)** Flor terminal producida por una planta 35S::*PEAM4*.25/35S::*PEAM6*.35 en la que se pueden identificar dos estambres mostrando transformación parcial a carpelo (asterisco). El filamento no está alterado pero las anteras adquieren forma alargada y muestran células típicas del tejido de carpelo. En el centro de la figura, señalado por una flecha, se indica la presencia de un carpelo enroscado hacia el interior y con óvulos ectópicos en su zona distal. La punta de flecha señala la parte superior de un pétalo plegada hacia el interior en su zona distal. **(B)** Flor terminal producida por una planta 35S::*PEAM4*.4/35S::*PEAM6*.35 mostrando un estambre carpeloide (asterisco) y dos estructuras filiformes que se corresponden con sépalos que no han completado normalmente su desarrollo (flechas). **(C)** Estambre carpeloide que consiste en un filamento relativamente corto, aunque aparentemente sin alteraciones morfológicas, que sostiene una estructura parcialmente ensanchada con formación de papilas estigmáticas típicas de tejido carpeloide en las zonas distales (flechas). **(D)** Sépalo, con las células alargadas características (punta de flecha negra), cuya zona distal se ha transformado en tejido petaloide, conteniendo las células cónicas características (punta de flecha blanca), que tiende a enroscarse hacia debajo de manera que ha encerrado un estambre en su interior. **(E)** Sépalo en el que en la zona distal de uno de sus márgenes laterales las células de sépalo (flecha blanca) han sido sustituidas por células cuya apariencia irregular recuerda a la de las células de antera (flecha negra). **(F)** Detalle de una de las estructuras carpeloides formadas en el pedúnculo de una flor axilar próxima a la flor terminal; se trata de estructuras filiformes en cuya zona distal aparecen papilas estigmáticas. Las barras verticales representan: 500  $\mu\text{m}$  en A y B y 50  $\mu\text{m}$  en C, D, E y F.



## ***DISCUSIÓN***



Aunque el guisante es una planta eudicotiledónea, tal como *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, el desarrollo de sus inflorescencias y flores ocurre de manera significativamente distinta a como tienen lugar estos mismos procesos en esas especies modelo; esto, junto con la existencia de una amplia colección de mutantes de guisante afectados en dichos procesos, hacen de esta planta un modelo atractivo para estudios comparativos en la genética molecular de la floración.

Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares que controlan los procesos de iniciación floral y desarrollo de órganos florales en guisante, en este trabajo hemos abordado el estudio funcional de los genes MADS de guisante *PEAM1*, *PEAM4* y *PEAM6*, aislados previamente en nuestro laboratorio.

Debido a la baja eficiencia de transformación del guisante, el estudio funcional de estos genes se ha llevado a cabo mediante la expresión constitutiva de los cDNAs correspondientes a cada uno de ellos en orientación sentido y antisentido en plantas de fenotipo silvestre de los sistemas heterólogos *Arabidopsis* y tabaco. Sólo en el caso de la transformación de tabaco con la construcción antisentido de *PEAM4* se obtuvieron plantas que mostraron fenotipo alterado, esto probablemente sea debido a que la homología entre los transgenes y sus homólogos endógenos no es lo suficientemente alta en el caso de *PEAM1* y *PEAM6*. También se ha llevado a cabo el ensayo de complementación de mutantes en genes de función A y B de *Arabidopsis*, mediante la expresión constitutiva de los genes *PEAM1* y *PEAM4*, respectivamente.

Por último, hemos utilizado el sistema del doble híbrido como herramienta para analizar las interacciones que tienen lugar entre los productos de genes implicados en los procesos de iniciación y desarrollo de flores en guisante.

## **1. ESTUDIO FUNCIONAL DE *PEAM1***

### **1.1. LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *PEAM1* EN SISTEMAS TRANSGÉNICOS HETERÓLOGOS APOYA LA HIPÓTESIS DE UNA POSIBLE FUNCIÓN COMO UN GEN DE IDENTIDAD DE ÓRGANO DE TIPO B**

El gen *PEAM1* comparte homología de secuencia y patrón de expresión (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001) con genes de identidad de órgano floral de clase B del grupo GLO (Theißen *et al.*, 2000) como *PI* y *GLO*, de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente.

Los fenotipos florales resultantes de la expresión constitutiva de *PEAM1* en plantas de *Arabidopsis* y de tabaco son consistentes con una posible función de *PEAM1* como gen de identidad de órgano de función B. Los fenotipos obtenidos se pueden explicar, en ambos

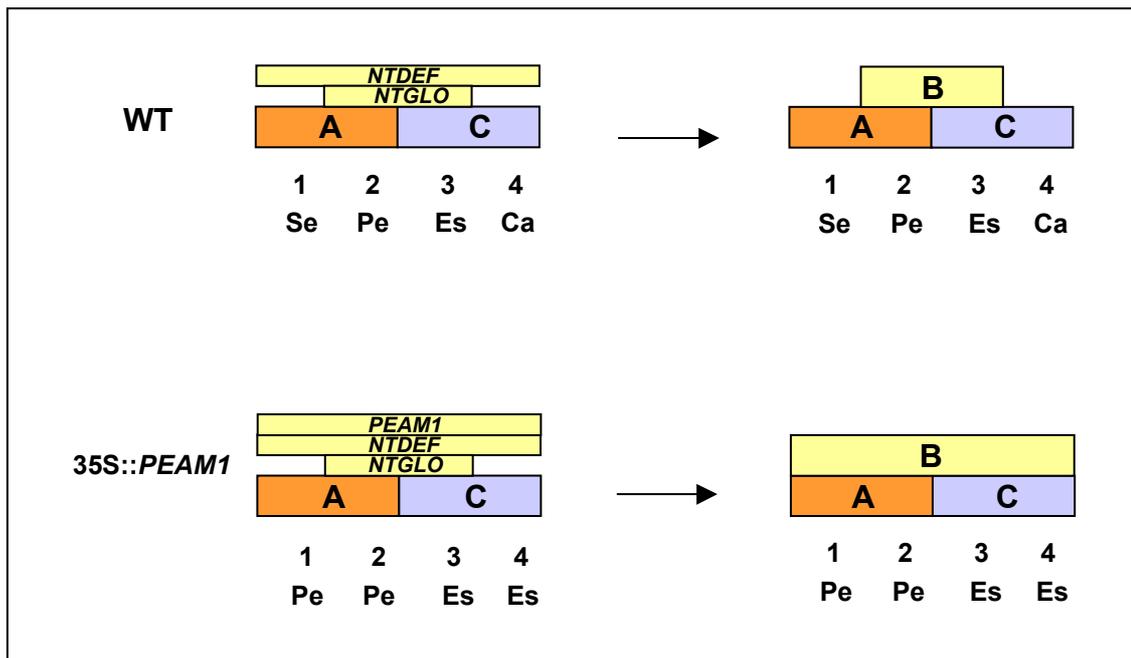
casos, teniendo en cuenta los patrones iniciales de expresión espacial de la pareja de genes endógenos de función B en cada una de las especies, *P/IA3*, en *Arabidopsis*, y *NTGLO/NTDEF*, en tabaco, y el mecanismo de autorregulación, mediado por la formación del heterodímero de ambos tipos de polipéptidos, que parece controlar el mantenimiento de la expresión de estos genes (Davies y Schwarz-Sommer, 1994; Davies *et al.*, 1999b).

### **1.1.1. Expresión constitutiva de *PEAM1* en tabaco**

La expresión constitutiva del gen *PEAM1* en tabaco produce cambios en la identidad de los órganos florales del primer y cuarto verticilo. Así, las flores de las plantas 35S::*PEAM1* presentan sépalos petaloides y carpelos estaminoides. Este fenotipo es, en esencia, similar al mostrado por plantas de tabaco 35S::*GLO* y 35S::*GLO/35S::DEF*, que expresan constitutivamente los genes de tipo B de *Antirrhinum majus* (Davies *et al.*, 1996b). También se parece al de las plantas transgénicas de *Gerbera hybrida* resultantes de la expresión constitutiva del gen *GGLO1*, el homólogo funcional de *GLO* en gerbera, donde los *pappi* (sépalos altamente modificados para la dispersión de semillas) son transformados en corolas y los carpelos en estambres (Yu *et al.*, 1999).

En tabaco, los genes *NTDEF* y *NTGLO* son los homólogos funcionales de los genes de función B de *Antirrhinum DEF* y *GLO*, respectivamente (Davies *et al.*, 1996b; Hansen *et al.*, 1993). Sus patrones de expresión son similares a los de sus homólogos de *Antirrhinum*. La expresión de *NTGLO* se restringe a la región del meristemo floral que dará lugar a los pétalos y a los estambres mientras que *NTDEF* se expresa en los cuatro verticilos, observándose niveles altos de su transcrito en pétalos y estambres, moderados en carpelos y apenas detectables en sépalos. En las flores de la planta silvestre la expresión de ambos genes se solapa en el segundo y tercer verticilo. Cuando la expresión de 35S::*PEAM1* se superpone a la expresión de los genes endógenos el resultado es que *PEAM1*, homólogo a *NTGLO*, podría interactuar con el producto del gen *NTDEF*, además de en los verticilos segundo y tercero, en el primer y cuarto verticilo, de manera que la función B se hallaría activa también en estos dos verticilos. Esto sería lo que conduce a las conversiones homeóticas del primer verticilo, de sépalo a pétalo, y del cuarto, de carpelo a estambre (Figura 72).

El hecho de que las conversiones observadas en el primer y cuarto verticilo de las plantas 35S::*PEAM1* sean parciales supone un indicio de que la capacidad del heterodímero heterólogo *PEAM1/NTDEF* para activar el sistema de autorregulación de los genes B endógenos sea menor que la que tendría el heterodímero endógeno *NTGLO/NTDEF*. Se ha propuesto que la activación autorreguladora de la expresión de los genes de función B



**Figura 72. Esquema del efecto resultante de la expresión de *PEAM1* sobre la expresión de los genes de función B de tabaco y sobre el desarrollo de los órganos florales.** En la parte superior se muestran los patrones de expresión de los genes endógenos *NTDEF* y *NTGLO* en flores silvestres y en la parte inferior los de los genes endógenos y el transgén *PEAM1* en las plantas *35S::PEAM1*.

podría deberse a la interacción directa del heterodímero DEF/GLO con los promotores de *DEF* y *GLO*, ya que se ha mostrado la unión *in vitro* del heterodímero DEF/GLO a las cajas CarG de ambos promotores (Davies *et al.*, 1996a; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Trobner *et al.*, 1992; Zachgo *et al.*, 1995). También se ha comprobado la unión *in vitro* del heterodímero PI/AP3 al promotor de *AP3* (Hill *et al.*, 1998; Tilly *et al.*, 1998). Trasladando esta situación a las plantas de tabaco *35S::PEAM1*, habría que proponer que el heterodímero NTDEF/PEAM1 es capaz de activar, al menos parcialmente, la expresión de algunos de los genes diana que conducen al desarrollo de pétalos y de estambres, y a los dos genes endógenos de función B. Así, en las plantas *35S::PEAM1* se detecta la expresión del gen endógeno *NTGLO* en el cuarto verticilo y un aumento del nivel de expresión del gen *NTDEF* en los verticilos primero y cuarto. La activación de la expresión de los dos genes endógenos en el cuarto verticilo de las plantas de tabaco *35S::PEAM1* explicaría el porqué se observan fenotipos más severos en el cuarto verticilo de sus flores que en el primero. Se ha observado que el fenotipo del cuarto verticilo de las plantas de tabaco *35S::PEAM1* es notablemente más severo que el mostrado por las plantas de tabaco *35S::GLO*, donde no se ha detectado activación de ninguno de los genes de función B endógenos.

A diferencia de lo que ocurre con respecto a la intensidad de las transformaciones en el cuarto verticilo, el fenotipo mostrado por el primer verticilo de las flores *35S::PEAM1* es poco

severo, menos que el que se observa en el primer verticilo de las plantas de tabaco 35S::GLO. Esto probablemente refleje una menor capacidad del heterodímero NTDEF/PEAM1, en comparación con la del NTDEF/GLO, para activar a los genes diana del desarrollo de pétalos, aunque, como acabamos de mencionar, sea más efectivo en activar a los de desarrollo de estambres. De hecho, a diferencia de lo que se observa en las plantas 35S::GLO, donde se induce la expresión del gen endógeno NTGLO en el primer verticilo, esta inducción no se observa en las plantas 35S::PEAM1. En las plantas 35S::GLO/35S::DEF se ha descrito una intensificación del fenotipo petaloide del primer verticilo con respecto al mostrado por las plantas 35S::GLO, intensificación que correlaciona con una mayor expresión del gen endógeno NTGLO en este verticilo. Sin embargo, en estas plantas la transformación del cuarto verticilo no se ve afectada por la presencia o ausencia de 35S::DEF y sigue siendo más débil que la que muestran las plantas 35S::PEAM1 (Davies *et al.*, 1996b).

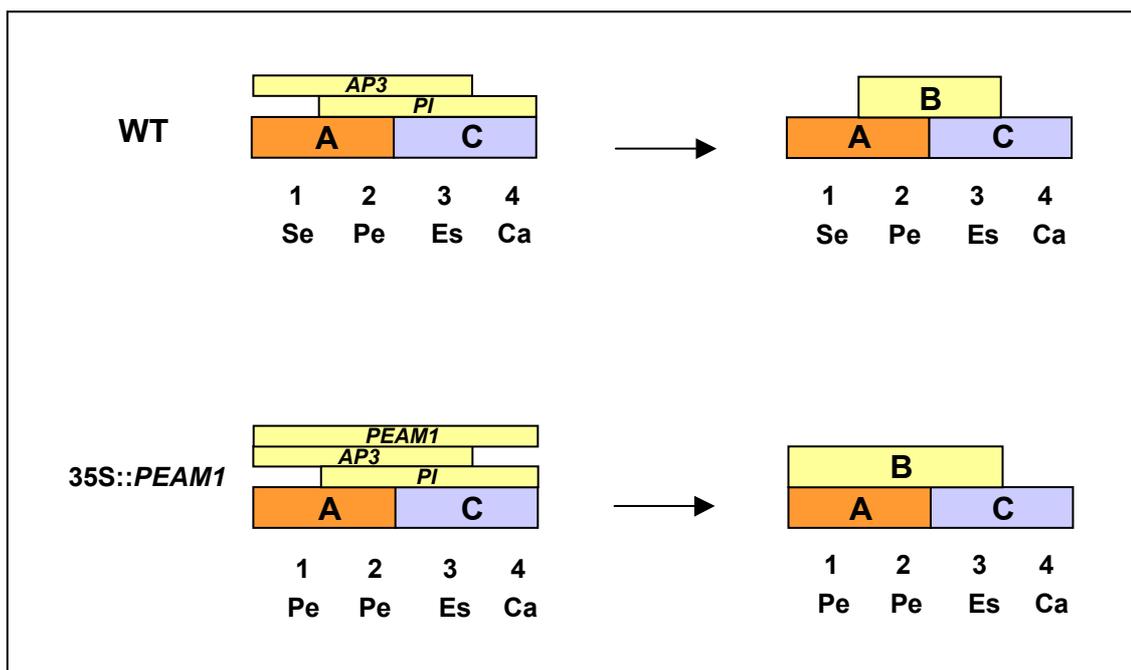
Se ha sugerido que la exclusión de la expresión de GLO de las regiones internas de las anteras en desarrollo en plantas silvestres de *Antirrhinum* podría ser importante para el desarrollo del polen (Davies *et al.*, 1996b); esto explicaría la reducción en la producción de polen observada en las flores de tabaco 35S::PEAM1, en las que PEAM1 se debe de estar expresando constitutivamente en todos los tejidos, y que también ha sido observada en las flores 35S::GLO y 35S::GLO/ 35S::DEF (Davies *et al.*, 1996b).

En tabaco, la expresión constitutiva de PEAM1 no tiene efectos fuera de los órganos florales. Estas plantas no muestran adelanto en el tiempo de floración ni alteraciones morfológicas en las hojas vegetativas o en las brácteas. En las plantas de tabaco 35S::PEAM1 no se ha observado inducción de los genes endógenos NTGLO y NTDEF en las hojas; sin embargo, se ha observado la expresión del gen NTDEF en hojas de las plantas 35S::DEF/35S/GLO, aunque no en las de las plantas que expresan solo uno de los dos genes de tipo B, lo que sugiere que ambas proteínas se requieren para la inducción de NTDEF (Davies *et al.*, 1996b). No obstante, en las plantas 35S::DEF/35S/GLO no se ha observado la expresión del gen NTGLO en las hojas de estas plantas, lo que sugiere que la regulación de los dos genes de función B usa mecanismos diferentes y en algunos casos puede requerir funciones específicas de tejido (Davies *et al.*, 1996b). La incapacidad de los genes de función B para promover el desarrollo de los órganos florales fuera del contexto de la flor sugiere que se requiere la participación de otros factores adicionales.

### 1.1.2. Expresión constitutiva de *PEAM1* en *Arabidopsis*

La expresión constitutiva de *PEAM1* en *Arabidopsis* ocasiona transformaciones homeóticas en el primer verticilo, dando lugar a órganos mosaico que tienen tanto tejido de sépalo como de pétalo.

En *Arabidopsis*, los transcritos de *PI* se detectan inicialmente en los tres verticilos internos (Goto y Meyerowitz, 1994), mientras que los transcritos de *AP3* se encuentran inicialmente en los tres verticilos externos (Jack *et al.*, 1992; Weigel y Meyerowitz, 1993). La expresión de ambos genes se solapa en estadios tempranos del desarrollo en el segundo y tercer verticilo, donde los polipéptidos interactúan. Cuando la expresión de *PEAM1* bajo el promotor constitutivo 35S se superpone a estos patrones de expresión, *PEAM1* puede interactuar con *AP3* en el primer verticilo; de este modo la función B sería activa y se mantendría también en este verticilo y esto sería lo que conduce a la conversión homeótica del primer verticilo de sépalo a pétalo (Figura 73).



**Figura 73. Esquema del efecto resultante de la expresión de *PEAM1* sobre la expresión de los genes de función B de *Arabidopsis* y sobre el desarrollo de los órganos florales.** En la parte superior se muestran los patrones de expresión de los genes endógenos *AP3* y *PI* en flores silvestres y en la parte inferior los de los genes endógenos y el transgén *PEAM1* en las plantas 35S::*PEAM1*.

El fenotipo de las plantas 35S::*PEAM1* es similar al mostrado por plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción 35S::*PI* así como al de las transformadas con las construcciones quiméricas 35S::*SRF-PI* ó 35S::*MEF2-PI*, en las que la mitad de la caja

MADS de *PI* se había sustituido por las correspondientes secuencias de las proteínas humanas SRF y MEF2 (Krizek y Meyerowitz, 1996a; Riechmann y Meyerowitz, 1997b). Este fenotipo es también similar al mostrado para la expresión constitutiva en petunia del gen de clase B de petunia *GREEN PETALS* (Halfter *et al.*, 1994). Al igual que en las plantas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM1* el primer verticilo de las flores de las transgénicas de petunia está constituido por órganos mosaico que poseen tejido de sépalo y de pétalo. En petunia se ha demostrado que la formación de estos órganos mosaico se debe a que, a pesar de que el 35S se considera un promotor constitutivo, la expresión del transgén, en los órganos del primer verticilo de estas flores, sólo se da en estadios relativamente tardíos de su desarrollo (Halfter *et al.*, 1994).

La conversión homeótica del primer verticilo hacia pétalo es más completa en las plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción 35S::*PI* que en las plantas 35S::*PEAM1*, lo que sugiere que el heterodímero PI/AP3 es más activo que el PEAM1/AP3 en la inducción de la expresión de sus genes diana, incluido el gen *AP3*. Asimismo, el carácter petaloide del primer verticilo es aún más acentuado en las plantas de *Arabidopsis* que expresan constitutivamente al mismo tiempo los dos genes de función B de esta especie, *PI* y *AP3* (Krizek y Meyerowitz, 1996a). Este fenotipo indica que el heterodímero PI/AP3 que se forma por expresión exclusiva de 35S::*PI* no es suficiente para mantener una expresión suficientemente elevada de *AP3* en el primer verticilo. En todos los casos se ha observado un mayor grado de conversión a tejido de pétalo en las zonas basal y media de estos órganos, así como en sus márgenes. Una característica de las flores 35S::*PEAM1*, que no se ha descrito para las 35S::*PI*, es que en las flores 35S::*PEAM1* la transformación homeótica de los sépalos afecta mucho más a la superficie adaxial que a la abaxial.

La expresión constitutiva de *PEAM1* en *Arabidopsis* no tiene efecto sobre el tiempo de floración y tampoco se han observado alteraciones fenotípicas fuera de los órganos florales. Además, la expresión constitutiva de *PEAM1* no altera ni el número de verticilos ni el de órganos florales.

En *Arabidopsis* la expresión constitutiva de los dos genes de tipo B al mismo tiempo, 35S::*PI/35SAP3*, da lugar a flores con dos verticilos de pétalos y dos de estambres pero, además, estas plantas presentan adelanto de la floración y curvatura en las hojas de roseta y caulinares, un fenotipo que no se ha encontrado cuando se expresa constitutivamente sólo uno de los dos (Krizek y Meyerowitz, 1996a). La expresión constitutiva simultánea de *AP3* y *PI* causa que algunas de las hojas caulinares producidas tardíamente en la inflorescencia sean petaloides (Krizek y Meyerowitz, 1996a). Este mismo fenotipo lo muestran también las plantas 35S::*SRF-AP3* 35S::*SRF-PI* y 35S::*MEF2-AP3* 35S::*MEF2-PI* (Riechmann y Meyerowitz, 1997b). Puesto que ni las hojas de roseta ni las hojas caulinares tempranas

presentan esta transformación se postula la existencia de un gradiente de algún factor que se requiere para dicha transformación.

Los intentos fallidos de convertir los órganos vegetativos en órganos florales alterando la expresión de los genes A, B y C (Mizukami y Ma, 1992; Krizek y Meyerowitz, 1996a) han llevado a pensar que los genes ABC son necesarios pero no suficientes para especificar la identidad de los órganos florales y que otros factores adicionales son necesarios para que estos genes sean activos fuera de la flor. Recientemente se ha demostrado que en *Arabidopsis* la actividad de los genes de identidad de órgano B y C requiere de la participación de los genes *SEPALLATA1/2/3* (*SEP1/2/3*, Ma *et al.*, 1991; Mandel y Yanofsky, 1998).

El fenotipo de las plantas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM1* pone de manifiesto que, *PEAM1* es suficiente para especificar la identidad de los pétalos y por tanto confirma la hipótesis, sugerida a partir de los datos de homología de secuencia y patrón de expresión, de que *PEAM1* pueda funcionar como un gen de identidad de órgano floral de función B.

## **1.2. LOS ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN CON *PEAM1* DE MUTANTES DE IDENTIDAD DE ÓRGANO FLORAL DE CLASE B DE *Arabidopsis* APOYAN LA HIPÓTESIS DE QUE *PEAM1* ES EL HOMÓLOGO FUNCIONAL DE *PI***

Nuestros resultados muestran que la expresión constitutiva de *PEAM1* es capaz de complementar, al menos parcialmente, la mutación fuerte *pi-1*. Hasta la fecha no existen referencias previas del uso de la complementación heteróloga como herramienta para ensayar la función de presuntos genes de función B. El único caso relacionado es el de la introducción de diversas versiones del gen *DEF*, de *Antirrhinum*, en plantas de *Arabidopsis* mutantes para el gen *AP3*, homólogo funcional de *DEF* (Irish y Yamamoto, 1995; Samach *et al.*, 1997). Este tipo de experimentos no han sido tanto encaminados a conocer la posible función del gen *DEF*, previamente esclarecida gracias a la caracterización del fenotipo causado por la mutación en *Antirrhinum* (Sommer *et al.*, 1990, 1991), como a dilucidar la divergencia de funciones de este gen entre las dos especies y a analizar su regulación transcripcional (Irish y Yamamoto, 1995; Samach *et al.*, 1997).

Las flores del mutante *pi-1* muestran conversión homeótica de pétalos a sépalos en el segundo verticilo, mientras que, los órganos del tercer verticilo están ausentes o son de naturaleza filamentosos; además de eso, un gineceo anormalmente grande, formado por más de dos carpelos, ocupa el centro de la flor (Bowman *et al.*, 1989; Hill y Lord, 1989). En las flores 35S::*PEAM1 pi-1* el segundo verticilo se halla completamente restaurado tanto en el número como en la forma de los pétalos que lo ocupan; en el tercer verticilo también se

produce restauración, aunque ésta es parcial y se producen estambres totalmente normales y otras estructuras con características intermedias entre estambres y carpelos; los sépalos son anormales, mostrando el fenotipo petaloide típico de la expresión constitutiva de *PEAM1* en plantas silvestres. Este fenotipo es, en esencia, igual al de la complementación parcial mostrada por las flores de las plantas *pi-1* transformadas con la construcción 35S::*PI* (Krizek y Meyerowitz, 1996a; Riechmann y Meyerowitz, 1997b) o con las construcciones quiméricas 35S::*SRF-PI* ó 35S::*MEF2-PI* (Riechmann y Meyerowitz, 1997b). No se han observado diferencias significativas entre el grado de complementación obtenido mediante la complementación del mutante *pi-1* con la construcción del gen homólogo 35S::*PI* y el obtenido con la construcción 35S::*PEAM1*, sin embargo, en las plantas 35S::*PI pi-1* se ha descrito una reducción del grado de complementación de forma acropétala (Riechmann y Meyerowitz, 1997b) que no se ha observado en las plantas 35S::*PEAM1 pi-1*.

Se ha descrito que la expresión constitutiva conjunta de los dos genes de tipo B de *Arabidopsis*, *PI* y *AP3*, complementa sólo parcialmente el fenotipo mutante *pi-1* y transforman esta mutación recesiva en parcialmente dominante (Krizek y Meyerowitz, 1996a). La mutación *pi-1* da lugar a un codón de parada 22 aá después de la caja MADS; esta proteína podría interaccionar con las proteínas *AP3* endógenas y transgénicas dando lugar a un complejo funcionalmente inactivo. Se ha sugerido que el fenotipo semidominante se podría deber a la producción de niveles altos del producto del gen mutado generados por la activación del gen endógeno *pi* como resultado de la expresión constitutiva de *PI* y *AP3* (Krizek y Meyerowitz, 1996a). Una menor producción del este producto mutado en las plantas 35S::*PEAM1 pi-1* o 35S::*PI pi-1* podría explicar el mayor grado de complementación observado en estas plantas en comparación con el mostrado por las plantas 35S::*PI* 35S::*AP3 pi-1*.

En las plantas *pi-1* transformadas tanto con las construcciones 35S::*PEAM1* como con 35S::*PI* se observa una diferencia en el grado de rescate de los órganos del segundo y del tercer verticilo (Krizek y Meyerowitz, 1996a; Riechmann y Meyerowitz, 1997b). Una posible explicación de la restauración sólo parcial del fenotipo silvestre en el tercer verticilo de las plantas 35S::*PEAM1 pi-1* o 35S::*PI pi-1* podría ser que al promotor 35S le falten algunos elementos reguladores, presentes en el promotor de *PI*, necesarios para conducir la expresión de manera efectiva en dicho verticilo. Esta hipótesis ha sido propuesta para explicar el carácter parcial del rescate que se observa en las flores de las plantas *ap3-3* transformadas con el cDNA de *AP3* fusionado al promotor 35S (Jack *et al.*, 1994). Sin embargo, un clon genómico de *AP3* rescata completamente el fenotipo floral de los mutantes *ap3-1* (débil) y *ap3-3* (fuerte) (Irish y Yamamoto, 1995; Okamoto *et al.*, 1994) y también se ha observado complementación completa con construcciones de cDNA de *AP3*

fusionada al promotor de *AP3* (Irish y Yamamoto, 1995). Hasta la fecha no se ha llevado a cabo, sin embargo, la complementación genética de la mutación *pi-1* con un clon genómico de *PI*, lo que permitiría comparar los resultados de las complementaciones de los mutantes *pi* y *ap3* con sus correspondientes genes. A diferencia de lo que ocurre con el clon genómico de *DEF*, el cual es capaz de reemplazar a *AP3* en producir pétalos y estambres en los mutantes *ap3-1* y *ap3-3* (Samach *et al.*, 1997), se ha observado que una construcción quimérica de una fusión de cDNA *AP3-DEF*, bajo el control del promotor de *AP3*, complementaba parcialmente la mutación *ap3-3* pero fue incapaz de producir ningún pétalo o estambre silvestre (Irish and Yamamoto, 1995). En este caso la falta de complementación completa ha sido explicada por la incapacidad de la proteína DEF en activar su propia transcripción mediante el promotor de *AP3* (Samach *et al.*, 1997). Una diferencia entre la complementación del mutante *ap3-3* con la construcción 35S::*AP3* y la del mutante *pi-1* con la construcción 35S::*PEAM1* ó 35S::*PI* es que, incluso en las flores 35S::*PI pi-1* y 35S::*PEAM1 pi-1* que muestran los fenotipos menos complementados, los órganos del segundo verticilo son siempre rescatados en número, forma y tamaño normal; sin embargo, en las flores más complementadas 35S::*AP3 ap3-3* aparecen pétalos sólo parcialmente restaurados, que muestran sectores sepaloideos. Esto podría sugerir que, en pétalos, la expresión del promotor de *PI* requiere para su activación niveles menores del heterodímero AP3/PI que el promotor de *AP3*.

La construcción 35S::*PEAM1* no fue, sin embargo, en absoluto capaz de complementar el fenotipo de los mutantes *ap3-1* y *ap3-3* de *Arabidopsis*. La complementación específica de la mutación *pi-1* por *PEAM1* y el resultado de la expresión constitutiva de este gen en sistemas transgénicos heterólogos apoyan la hipótesis de que el gen *PEAM1* es el homólogo funcional de guisante del gen de identidad de órgano floral de tipo B, *PI*.

A diferencia de los genes de clase B identificados hasta el momento, cuya expresión es específica de flores, se ha detectado también expresión de *PEAM1* en primordios foliares de guisante, aunque con un nivel de expresión más bajo que el mostrado en flores (Navarro, 2001). En guisante, el gen *UNI*, homólogo funcional de *LFY* y *FLO* de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente (Carpenter y Coen, 1990; Coen *et al.*, 1990; Hofer *et al.*, 1997; Huala y Sussex, 1992; Schultz y Haughn, 1991a; Weigel y Meyerowitz, 1993; Weigel *et al.*, 1992), y el gen *STP*, homólogo funcional de *UFO* y *FIM*, de *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, respectivamente (Levin y Meyerowitz, 1995; Simon *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 2001; Wilkinson y Haughn, 1995), además de regular el desarrollo de los meristemos florales, son necesarios para el correcto desarrollo de la hoja compuesta, controlando el nivel de complejidad de la misma (Hofer *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2001). Puesto que *LFY* y *UFO* actúan conjuntamente para activar la expresión de los genes de clase B, *AP3* y *PI* en las

flores (Honma y Goto, 2000; Parcy *et al.*, 1998), cabe pensar que en guisante *UNI* y *STP* activen a *PEAM1* en las hojas y que éste también juegue un papel en el desarrollo de dichos órganos.

En ningún caso se ha detectado que la expresión constitutiva de *PEAM1* afecte al desarrollo de las hojas de tabaco o *Arabidopsis*. Esto no resulta extraño ya que, aunque *PEAM1* pudiera jugar un papel en el circuito que regula el desarrollo de la hoja compuesta de guisante, es más que probable que en las hojas simples de tabaco y *Arabidopsis* no se encuentren presentes gran parte de las otras proteínas que participen en dicho proceso.

## **2. ESTUDIO FUNCIONAL DE *PEAM4***

En este trabajo se ha llevado a cabo una caracterización de la función de *PEAM4*, el homólogo de *SQUA/AP1* en guisante. *AP1* y *SQUA* son genes MADS-box pertenecientes a la subfamilia *SQUA*, que incluye genes MADS-box de otras muchas especies de plantas (Theißen *et al.*, 2000). En esta subfamilia de genes de plantas dicotiledóneas se pueden distinguir dos clades: una está representado por *AP1* y *SQUA* y la otra por genes tales como *FUL*, de *Arabidopsis* (Gu *et al.*, 1998). Mientras que se ha caracterizado la función de varios genes de la clade *FUL* de especies diferentes (Ferrándiz *et al.*, 2000a; Immink *et al.*, 1999; Kyojuka *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1999), no se ha analizado con detalle la función de genes del clade *AP1/SQUA* de otras plantas que no sean *Arabidopsis* y *Antirrhinum*.

Varias líneas de evidencia indican que *PEAM4* es el homólogo funcional en guisante de los genes *AP1*, de *Arabidopsis*, y de *SQUA*, de *Antirrhinum*. Por un lado, la secuencia aminoacídica deducida de *PEAM4* (Ferrándiz, 1996) muestra un alto nivel de homología a las de *AP1* y *SQUA*, y a las de otros miembros de la clade tales como *CAL*. Por otro, el patrón de expresión de *PEAM4* (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001), aún con ciertas particularidades posiblemente relacionadas con la peculiar ontogenia de la flor de guisante, es equivalente al descrito para *AP1* de *Arabidopsis* (Mandel *et al.*, 1992b) y difiere sólo ligeramente del de *SQUA*, el cual se expresa, adicionalmente, en la parte basal del carpelo en desarrollo (Huijser *et al.*, 1992). Por último, los resultados de este trabajo muestran que la expresión constitutiva de *PEAM4* causa adelanto del tiempo de floración y, en *Arabidopsis*, transformaciones de las inflorescencias en flores; además de eso, la expresión constitutiva de *PEAM4* fue capaz de rescatar los defectos en los órganos florales del mutante fuerte *ap1-1*.

Otro apoyo adicional de que *PEAM4* es el homólogo funcional de *AP1/SQUA* procede de resultados recientes que indican que el fenotipo del mutante *pim* de guisante es causado por mutaciones que provocan la pérdida de la función de este gen (S. Taylor, J. Hofer, J.

Sollinger, M. Knox, S. Singer, N. Ellis and I. Murfet, comunicación personal). El fenotipo del mutante *pim*, que se ha comparado con el de los mutantes *ap1* o *squa*, se caracteriza por la sustitución de los meristemas florales por estructuras proliferativas que producen flores anormales que, aunque de fenotipo variable, presentan, como defectos más comunes, la conversión de los sépalos en estructuras bracteoides, ausencia de pétalos y, en ocasiones, fusión de estambres a carpelos (Singer *et al.*, 1994; S. Taylor, J. Hofer, J. Sollinger, M. Knox, S. Singer, N. Ellis y I. Murfet, comunicación personal).

## 2.1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE *PEAM4* EN EL TIEMPO DE FLORACIÓN Y LA ARQUITECTURA DE LA INFLORESCENCIA DE *Arabidopsis* Y TABACO

El tiempo y la posición en que se inician las flores determina la arquitectura de la inflorescencia de una planta. El análisis de los fenotipos mutantes y de los patrones de expresión de los genes *LFY* y *AP1* de *Arabidopsis thaliana*, y de sus homólogos funcionales en *Antirrhinum majus*, *FLO* y *SQUA*, respectivamente, sugiere que estos genes juegan un papel determinante en el proceso de la iniciación floral de estas plantas modelo, especificando la identidad del meristemo floral (Coen *et al.*, 1990; Davies *et al.*, 1999; Huijser *et al.*, 1992; Mandel *et al.*, 1992b; Weigel *et al.*, 1992). Mutaciones en cualquiera de estos genes producen fenotipos en los que los meristemas florales son reemplazados por inflorescencias. *LFY* parece jugar un papel más prominente que *AP1* en la iniciación floral de *Arabidopsis*, como lo indica el que se den las conversiones más severas de las flores a inflorescencias en los mutantes *lfy*. Esto se explica por la existencia de homólogos a *AP1*, como *CAL* y *FUL*, que actúan redundantemente con *AP1* en el control de la identidad del meristemo floral en esta especie (Bowman *et al.*, 1993; Ferrándiz *et al.*, 2000a). En *Antirrhinum* ambos mutantes, *flo* y *squa*, exhiben un fenotipo fuerte de inflorescencia, sugiriendo que en la iniciación floral en esta especie podría no existir un nivel de redundancia tan alto para la función *squa*. Hasta la fecha no se ha encontrado en *Antirrhinum* ningún gen que pudiera tener una función equivalente a *CAL*; no obstante, se ha descrito recientemente en esta especie la caracterización de *DEFH28*, un gen que parece ser el homólogo funcional de *FUL* (Müller *et al.*, 2001). En tabaco, donde el fenotipo mutante para este gen no ha sido descrito, el que el homólogo de *LFY* se expresa fuertemente en el SAM, desde estadios tempranos del desarrollo, cuando todavía es vegetativo (Amaya *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1995), quizás sugiere que, en esta especie, otros genes, homólogos a *AP1*, podrían tener un papel más relevante en la especificación de la identidad de los meristemas florales. En guisante, con una arquitectura de inflorescencia diferente a la de

*Arabidopsis* o *Antirrhinum*, *UNI*, el ortólogo de *LFY/FLO*, se expresa también en tejidos florales y hojas y, de hecho, los mutantes *uni* exhiben una morfología de la hoja alterada (Hofer *et al.*, 1997). Por el contrario, *PEAM4*, el homólogo de *AP1/SQUA* de guisante se expresa sólo en tejidos florales, lo cual sugiere que su papel estaría restringido a la iniciación y el desarrollo floral.

Se ha mostrado que la expresión constitutiva de los genes de identidad de meristemo floral tales como *LFY*, *AP1* o *FUL*, y algunos de sus homólogos, causan floración temprana en diferentes especies y, en *Arabidopsis*, causan también la conversión de los meristemos inflorescentes en meristemos florales (Elo *et al.*, 2001; Ferrándiz *et al.*, 2000b; He *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 1999; Kyojuka *et al.*, 1997; Mandel y Yanofsky, 1995b; Mouradov *et al.*, 1998; Nilsson y Weigel, 1997; Peña *et al.*, 2001; Rottmann *et al.*, 2000; Southerton *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999; Weigel y Nilsson, 1995). Las plantas de *Arabidopsis* 35S::*LFY* y 35S::*AP1*, cultivadas bajo condiciones de DL o de DC, florecen tras producir un menor número de hojas, tanto de roseta como caulinares, que las plantas control sin transformar (Mandel y Yanofsky, 1995b; Weigel y Nilsson, 1995).

De acuerdo con la idea de que, como *AP1* o *SQUA*, *PEAM4* podría funcionar como un gen de identidad de meristemo floral, la expresión constitutiva de este gen causa adelanto de la floración tanto en *Arabidopsis* como en tabaco. En *Arabidopsis*, las plantas 35S::*PEAM4* florecen con menor número de hojas, de roseta y caulinares, que los controles, tanto cuando se cultivan bajo condiciones de DL como de DC; también se produce la conversión de ápices de inflorescencia en flores terminales y la aparición de flores solitarias en las axilas de las hojas caulinares y de hojas caulinares curvadas. El fenotipo de las plantas 35S::*PEAM4* reproduce el causado por la expresión constitutiva de *AP1*; no obstante, el fenotipo de las plantas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM4* es menos severo que el descrito para la expresión constitutiva de *AP1* (Mandel y Yanofsky, 1995b). La expresión constitutiva de *PEAM4* en el fondo genético *ap1-1*, además del rescate del fenotipo floral que se discute en el siguiente apartado, causó también adelanto de la floración con conversión del ápice de la inflorescencia principal en flor terminal, una reducción del número de coflorescencias presentes en la inflorescencia principal y la aparición de flores solitarias en las axilas de las hojas caulinares. En el fondo genético *ap1-1*, a diferencia del efecto mostrado sobre el fondo genético silvestre, la construcción 35S::*PEAM4* no causó reducción en el número de hojas caulinares, aunque sí en el de hojas de roseta con respecto al mostrado por las plantas *ap1-1*. Las plantas 35S::*PEAM4 ap1-1* reproducen el efecto de la construcción 35S::*AP1* en la inflorescencia del mutante *ap1-1*, aunque el fenotipo de estas últimas es más extremo.

La aceleración de la floración causada por la construcción 35S::PEAM4 en tabaco mostró un claro patrón dosis-dependiente. En algunas de las líneas transgénicas, las plantas florecieron tras producir un número de hojas cinco veces inferior al producido por la planta silvestre. En este sentido, el efecto de la expresión constitutiva de PEAM4 fue mucho más dramático en tabaco que en *Arabidopsis*, sugiriendo quizás un papel más prominente de los genes relacionados con AP1 en la iniciación floral en tabaco. Las únicas modificaciones obvias de la arquitectura de la inflorescencia de las plantas de tabaco transformadas con la construcción 35S::PEAM4 fueron la reducción en el grado de ramificación de las inflorescencias que componen la estructura apical y, en concordancia, la disminución del número de flores producido en las inflorescencias primarias y secundarias. El efecto aparentemente más leve de la expresión constitutiva de PEAM4 sobre la arquitectura de la inflorescencia de tabaco que sobre la de *Arabidopsis* puede deberse a la naturaleza cimosa de la inflorescencia de tabaco, en la que los meristemos de inflorescencia se diferencian en flores terminales.

## 2.2. UN NUEVO FENOTIPO DE FLORACIÓN INHIBIDA CAUSADO POR LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE PEAM4 EN TABACO

En tabaco el transgén 35S::PEAM4 también produjo plantas con un fenotipo de floración inhibida. De las seis líneas 35S::PEAM4 que se han estudiado con detalle en este trabajo, la línea T-48 fue la que mostró el fenotipo más severo de adelanto del tiempo de floración. Sin embargo, algunas de las plantas de la población T<sub>2</sub> de esa línea, en lugar de florecer tempranamente, parecían tener inhibida la floración. En estas plantas, a diferencia a lo que ocurría en las plantas control, la inflorescencia se hallaba reemplazada por una estructura vegetativa, que mostraba una fuerte reducción en la longitud de los entrenudos, un hábito de crecimiento indeterminado, pérdida de la dominancia apical y cambios en la morfología de la hoja. El análisis del fenotipo de estas plantas 35S::PEAM4.48 sugiere que en ellas se produce la transición a la fase reproductiva pero que la iniciación floral no tiene lugar. La floración retrasada en tabaco se ha descrito para otros genotipos. Por ejemplo, el mutante Maryland Mammoth muestra un crecimiento vegetativo indefinido bajo condiciones de DL (Allard, 1919). De manera similar, las plantas de tabaco que expresan constitutivamente el gen *CEN*, atraviesan una fase vegetativa excepcionalmente larga antes de florecer (Amaya *et al.*, 1999). Sin embargo, en estos casos el fenotipo de la planta durante la fase vegetativa parece constante en términos de tamaño de hoja y longitud de los entrenudos hasta que se alcanza la transición a la fase reproductiva con la formación de la flor terminal (Allard, 1919; Amaya *et al.*, 1999). Las bases moleculares para el fenotipo de no floración de la línea

35S::*PEAM4.48* no están claras, aunque se podría explicar por una inhibición de la iniciación floral a través del silenciamiento génico de genes relacionados con *AP1*. Esto se ve apoyado por la ausencia de la expresión de los genes *NAP1-1* y *NAP1-2* en los ápices de tallos axilares de posiciones acropétalas del tallo principal de las plantas 35S::*PEAM4.48* con fenotipo de no floración, lo que indica la naturaleza vegetativa de estos ápices, y por la reducción de la expresión de dichos genes en ápices florales y en las flores que, ocasionalmente, llegaron a formar en ramas terciarias de algunas de ellas.

Visto de este modo, la “inflorescencia” de las plantas 35S::*PEAM4.48* representaría una nueva fase de desarrollo, con la función de *AP1* muy reducida, lo que conduciría a la formación de nuevos rasgos en la morfología de la hoja y en la longitud de los entrenudos. Esta nueva fase puede reflejar la actividad de *NFL*, cuya expresión no se ve alterada en las plantas 35S::*PEAM4* con fenotipo de no floración, y de otras rutas del proceso de iniciación floral. Alternativamente, el severo bloqueo de la iniciación floral causado por 35S::*PEAM4* en estas plantas podría ser el reflejo de un requerimiento estricto de la función *AP1* para la iniciación floral en tabaco. Esto podría deberse a un papel menos prominente de la ruta *LFY* en la iniciación floral en tabaco y/o a una menor redundancia de la ruta *AP1* en tabaco.

Es posible en las plantas 35S::*PEAM4.48* que no florecen se esté silenciando simultáneamente más de un gen relacionado con *AP1*. Aunque mediante análisis Northern se ha mostrado la supresión de la expresión de los genes *NAP1-1* y *NAP1-2* no podemos excluir la posibilidad de que en tabaco haya otros genes no identificados, homólogos a los genes testados, cuya expresión se halle también reducida en estas plantas. De hecho, el fenotipo observado recuerda a la inhibición de la floración que se produce en el triple mutante *ful ap1 cal* de *Arabidopsis* (Ferrándiz *et al.*, 2000a). Un fenotipo de no floración similar al observado en las plantas de la línea 35S::*PEAM4.48* de tabaco se ha descrito también para plantas de petunia donde se cosuprimió el *PETUNIA FLOWERING GENE* (*PFG*), un gen que también pertenece a la subfamilia *SQUA* y está relacionado con *FUL*. En la cosupresión de *PFG* también se observó el silenciamiento del gen *FLORAL BINDING PROTEIN26* (*FBP26*), un homólogo de petunia del gen *SQUA* de *Antirrhinum* (Immink *et al.*, 1999).

El fenómeno de la cosupresión, descrito repetidamente en los últimos años en plantas transgénicas, implica el silenciamiento simultáneo de la expresión del transgén y de genes endógenos homólogos (Baulcombe y English, 1996; Dorlhac de Borne *et al.*, 1994; Elmayan y Vaucheret, 1996; revisado en Flavell, 1994; Matzke y Matzke, 1995; Meyer, 1995; Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Se supone que la diana de la cosupresión es el RNA ya que experimentos de “run-off” nuclear han mostrado que la cosupresión no afecta a la transcripción de los genes endógenos ni a la de los transgenes sino que ocurre a nivel post-

transcripcional (de Carvalho Niebel *et al.*, 1995; Künz *et al.*, 1996; Van Blokland *et al.*, 1994). Experimentos de cosupresión de la nitrato reductasa (NR) de tabaco, como un sistema modelo del silenciamiento post-transcripcional, mostraron que la frecuencia de cosupresión de dicho gen decrece cuando se impide la transcripción del gen endógeno o del transgén, y aumenta cuando se incrementa el número de copias de *loci* funcionales del gen endógeno o del transgén (Vaucheret *et al.*, 1997). Estos resultados indican que para iniciar la cosupresión de la NR se requiere un estado transcripcional activo del transgén y, en menor medida, de los genes endógenos *Nia*, y que la ausencia de la transcripción de estos últimos reduce la frecuencia de cosupresión o retrasa su inicio (Vaucheret *et al.*, 1997). Este requerimiento de un estado transcripcional activo tanto del transgén como de los genes homólogos endógenos, para que se pueda producir un fenómeno de cosupresión, podría explicar porqué en la T<sub>2</sub> de la línea 35S::*PEAM4.48* no se encontró diferencia en la expresión del transgén *PEAM4* en hojas vegetativas, donde no se expresan los homólogos endógenos *NAP1-1* y *NAP1-2*, entre las plantas con fenotipo de inhibición de la floración y las plantas con floración temprana. En las plantas 35S::*PEAM4.48* con fenotipo de floración inhibida la cosupresión se produciría solamente de manera local en el meristemo apical en el momento en que los endógenos homólogos a *PEAM4* comenzaran a expresarse. En nuestro caso el fenómeno no parece depender de manera estricta de la dosis del transgén ya que las líneas con el fenotipo de no floración cuyo genotipo se pudo analizar resultaron ser hemizigotas.

Algunas de las características fenotípicas mostradas por las flores anormales producidas por varias plantas T<sub>3</sub> 35S::*PEAM4.48* descendientes de una de las plantas con floración inhibida, como la presencia de sépalos bracteoides y estambres petaloides, recuerdan en cierto modo a la de las flores producidas por plantas de guisante con mutación en el gen *BRAC*, gen que se ha asociado a la función A en esta especie (Ferrándiz *et al.*, 1999). Las alteraciones fenotípicas de estas flores, de nuevo, podrían explicarse por la cosupresión de los genes endógenos homólogos a *PEAM4*, como *NAP1-1* y *NAP1-2*.

Recientemente se ha propuesto que las distintas fases del desarrollo de la planta estarían controladas por la formación de complejos de proteínas MADS, cuya composición iría cambiando dependiendo del estadio de desarrollo. En la formación de estos complejos está basado el modelo ABCD de la especificación de los órganos florales. El fenotipo de retraso en el tiempo de floración mostrado por las plantas de tabaco que expresan constitutivamente *PEAM4* en orientación antisentido podría ser explicado por un efecto de dicha construcción, mediado por la degradación de RNA, alterando la composición de los complejos formados por genes MADS de tabaco implicados en promover el proceso de la transición floral.

### 2.3. EL PAPEL DE LA PRENILACIÓN PROTEICA EN LA ACTIVIDAD DE AP1

El polipéptido PEAM4 representa un mutante natural carente del motivo de prenilación C-terminal (CaaX-box) que se encuentra presente en AP1, SQUA y otros homólogos a AP1 (Yalovsky *et al.*, 2000). La prenilación proteica es una modificación post-traducciona que implica la unión covalente, mediante puentes tioester, del farnesil difosfato (FPP) o del geranil geranil difosfato (GGPP) a una cisteína conservada cerca de la región C-terminal de las proteínas; esta reacción es catalizada por una farnesiltransferasa (FTasa) o por una geranilgeraniltransferasa-I (GGTasa-I). Estas enzimas reconocen una secuencia de aminoácidos conservada, la caja CaaX, en la que la C es una cisteína, a es normalmente un aminoácido alifático y X es normalmente serina, metionina, cisteína, alanina, glutamina o leucina. Si "X" es leucina, la proteína es modificada por la GGTasa-I. Si "X" es cualquier otro aminoácido, la proteína es preferencialmente modificada por FTasa (Schafer y Rine, 1992). La mayoría de las proteínas que sufren prenilación llevan a cabo papeles reguladores claves en la señalización, regulación del ciclo celular, y transporte de vesículas, lo que sugiere una relación entre el control del crecimiento celular y la biosíntesis citoplasmática de isoprenoides (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999; Yalovsky *et al.*, 1999; Zhang y Casey, 1996).

Se ha propuesto que la prenilación del polipéptido AP1, mediante un proceso de farnesilación, modula su función, y quizás su especificidad (Yalovsky *et al.*, 2000). Esto está basado en experimentos que muestran que AP1 es prenilada eficientemente *in vivo* e *in vitro*, y en la observación de que la expresión constitutiva en plantas de *Arabidopsis* de una versión de AP1 con una mutación que afecta a la caja CaaX no es capaz de causar la formación de flores terminales, ni en la inflorescencia primaria ni en las secundarias, a pesar de que estos transformantes florecían tempranamente y tenían hojas curvadas. No obstante, en las plantas de *Arabidopsis* 35S::PEAM4 se han observado todas las características relacionadas con la expresión constitutiva del polipéptido AP1 silvestre, incluyendo la conversión de los tallos laterales en flores solitarias y la producción de flores terminales. Estos resultados, resultan difíciles de reconciliar con la propuesta y las observaciones de Yalovsky *et al.*, (2000). Sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con los de Krizek y Meyerowitz (1996b), que encontraron que una proteína quimérica constituida por la caja MADS y el dominio L de AP1 y los dominios K y C de la proteína AG (que no contiene el motivo CaaX), podían producir el fenotipo característico de la expresión constitutiva de AP1 en plantas de *Arabidopsis*. Una explicación para esta discrepancia podría ser que el AP1 de guisante no necesite ser prenilado para desempeñar su función. Alternativamente, estos resultados sugieren que la prenilación no es un requerimiento estricto para la función

de AP1, pero podría reforzar la actividad de la proteína. Esto podría explicar porqué la expresión constitutiva de *PEAM4* (presumiblemente incapaz de ser prenilado) causa un fenotipo menos severo que el mostrado por las plantas 35S::*AP1* y porqué el rescate del fenotipo floral mutante *ap1-1* por la construcción 35S::*PEAM4* es menor que el observado con la construcción 35S::*AP1* (Mandel y Yanofsky, 1995b). Así pues, podría ser que la prenilación tenga un efecto cuantitativo, pero no cualitativo, sobre la actividad de AP1. Recientemente se ha descrito que la expresión del gen *LtMADS2*, un gen homólogo a *AP1* de *Lolium temulentum* (monocotiledónea), bajo el control del promotor de *AP1*, puede complementar parcialmente los defectos en el número de órganos del alelo mutante *ap1-15*, a pesar de que el polipéptido codificado por este gen carece del motivo de prenilación CaaX (Gocal *et al.*, 2001).

#### 2.4. *PEAM4* Y LA FUNCIÓN A EN GUISANTE

La aplicación del modelo ABC a diferentes especies de plantas presenta problemas con respecto a los genes de clase A y a la función A (Davies *et al.*, 1999b; Motte *et al.*, 1998b; Theißen *et al.*, 2000). La función A, tal y como la define el modelo ABC, sería responsable de la especificación de los sépalos y pétalos, y de la regulación catastral de la función C (Bowman *et al.*, 1991). Sin embargo, el fenotipo del mutante del gen de clase A *AP1*, de *Arabidopsis*, difiere en un aspecto clave del causado por la mutación en el gen *SQUA*, su homólogo de *Antirrhinum*: las mutaciones en el gen de *Arabidopsis* afectan a la identidad de los órganos del periantio, pero no las mutaciones en el gen de *Antirrhinum*. Por tanto, el modelo no explica completamente el control de la identidad de los órganos florales en plantas tales como *Antirrhinum*, donde las mutaciones en el gen de clase A *SQUA* no causan defectos que puedan ser atribuibles a la pérdida de la función A (Huijser *et al.*, 1992). Además, no se ha identificado ningún mutante de clase A con defectos en la especificación de la identidad de los órganos en una especie distinta de *Arabidopsis* (Davies *et al.*, 1999b).

Nuestros resultados muestran que *PEAM4* es capaz de restaurar, al menos parcialmente, la formación de pétalos y sépalos en el mutante de fenotipo severo *ap1-1*. Esto sugiere que *PEAM4*, además de ser altamente homólogo a *AP1* en secuencia y patrón de expresión, podría compartir con *AP1* la capacidad de especificar la identidad de los dos verticilos externos, actuando por ello como un gen de función A. El hecho de que, tanto el gen *AP1* de *Arabidopsis* como su homólogo en guisante *PEAM4*, pero no el gen de *Antirrhinum*, puedan realizar funciones de tipo A podría reflejar la mayor cercanía filogenética de guisante a *Arabidopsis* que a *Antirrhinum*. Es concebible que otros genes similares a *SQUA* puedan

existir en *Antirrhinum*, y que la ausencia de defectos en la identidad de los órganos florales en el mutante *squa* reflejen la existencia de redundancia genética en la especificación de los órganos del periantio. También podría considerarse la posibilidad de que los diferentes fenotipos de órgano floral causados por mutaciones en *AP1* o *SQUA* pudieran ser debidos a diferencias en los promotores de sus genes diana. Sería interesante testar si *SQUA* puede complementar los defectos en la identidad de los órganos florales de los mutantes *ap1*. Recientemente se ha descrito que la expresión constitutiva de *NtMADS11*, un gen de la subfamilia *SQUA* de tabaco, es capaz de rescatar parcialmente los defectos florales causados por la mutación *ap1-1* (Jang *et al.*, 2002).

El análisis de mutantes homeóticos florales de guisante también sugiere que *PEAM4* juega un papel en la función A de guisante. Las flores *brac* presentan una bráctea extra, con características sepaloides, y estambres que, ocasionalmente, muestran expansiones petaloides (Ferrándiz *et al.*, 1999). Se esperaría que genes de función A se estuvieran expresando en estos órganos, contribuyendo a la especificación de la identidad de sépalo y pétalo. *PEAM4* se expresa, de hecho, en las brácteas sepaloides y los estambres petaloides del mutante, apoyando la idea de que este gen juega un papel en la función A en guisante (Navarro, 2001). Recientemente, se ha demostrado que mutaciones en el gen *PEAM4* causan el fenotipo *pim*, donde las flores, además de presentar características de inflorescencia, muestran defectos en la especificación de sépalos y pétalos, con la conversión de sépalos en estructuras bracteoides, ausencia de pétalos y, ocasionalmente, fusión de estambres a carpelos, que recuerdan a los defectos atribuidos a la pérdida de la función A en los mutantes *ap1-1* (Singer *et al.*, 1994; S. Taylor, J. Hofer, J. Sollinger, M. Knox, S. Singer, N. Ellis and I. Murfet, comunicación personal).

### **3. ESTUDIO FUNCIONAL DE *PEAM6***

El gen *PEAM6* es un gen MADS de guisante, aislado previamente en nuestro laboratorio, que es similar en secuencia (Ferrándiz, 1996) a los genes *SEP1* y *SEP2* de *Arabidopsis* (previamente denominados *AGL2* y *AGL4*, Ma *et al.*, 1991). Existen evidencias experimentales que sugieren una posible correlación del gen *PEAM6* con la mutación *veg1* de guisante. La mutación *veg1* es recesiva, y en homocigosis, origina plantas que nunca florecen, bajo ninguna de las condiciones testadas, y en las que todas las inflorescencias laterales  $I_2$  son reemplazadas por ramas laterales vegetativas, con un hábito de crecimiento indeterminado, que producen a su vez ramas de orden superior en un patrón reiterativo (Gottschalk, 1979; Reid y Murfet, 1984). Hasta la fecha no se ha descrito en ninguna otra dicotiledónea una mutación simple que provoque un fenotipo de no floración tan extremo;

esto podría deberse a la particular arquitectura de la inflorescencia de guisante. *PEAM6* se localiza al final del cromosoma 5, estrechamente ligado al gen *VEG1* y, además, *PEAM6* está delecionado del genoma del mutante *veg1* (Ferrándiz, 1996). El mutante *veg1* fue generado mediante radiación por rayos X, que da lugar a deleciones de tamaño variable del genoma. El efecto no pleiotrópico de la mutación *veg1* se ha utilizado como argumento para sugerir que dicha mutación afecta a un único gen (Gottschalk, 1979). Aunque el argumento no resulta incontestable, la existencia en guisante de un segundo gen, *VEG2*, cuya mutación causa un fenotipo muy similar a *veg1* lo hace verosímil (Murfet, 1992; Murfet y Reid, 1993). Sin embargo, los intentos de establecer los límites de la deleción en el mutante *veg1* con el fin de comprobar si el gen *PEAM6* es el único afectado, han resultado fallidos (Navarro, 2001). Por otro lado, la falta de un sistema eficaz de transformación de guisante ha impedido llevar a cabo el ensayo de complementación del mutante *veg1* con el clon genómico de *PEAM6* (Navarro, 2001).

Se ha propuesto que *VEG1* no sería necesario para la transición del meristemo vegetativo a meristemo inflorescente primario ( $I_1$ ) sino para la formación de las inflorescencias secundarias (Singer *et al.*, 1994, 1999). No está, sin embargo, claramente determinada su verdadera implicación en el desarrollo de las mismas y se ha propuesto que sería necesario, bien para la iniciación de los meristemos  $I_2$  a partir del  $I_1$  o para la formación de los meristemos florales a partir de los  $I_2$ .

La expresión temprana de *PEAM6* en el meristemo floral, muy similar a la de genes como *LFY* o *AP1*, es coherente con la hipótesis de una posible implicación de este gen en la iniciación de flores en guisante, sugerida por su correlación con la mutación *veg1*. Aunque los experimentos de hibidación *in situ* no han permitido observar expresión de *PEAM6* en el  $I_2$  cabría la posibilidad de que este gen también se exprese en esos meristemos pero que su detección no halla resultado posible debido a su bajo nivel de expresión (Navarro, 2001).

La expresión constitutiva de *PEAM6* causa adelanto de la floración tanto en *Arabidopsis* como en tabaco lo que, como se ha discutido previamente, coincide con el fenotipo provocado por la expresión constitutiva en estas plantas de diferentes genes de identidad de meristemo floral. En *Arabidopsis*, las plantas 35S::*PEAM6* mostraron, en general, un fenotipo dosis-dependiente, de forma que las líneas con más de una copia y las líneas homocigotas son las que mostraron los fenotipos más severos.

No obstante, las plantas homocigotas de dos de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM6*, T-10 y T-44, mostraron un fenotipo que era similar al de las plantas control o si acaso, presentaban un ligero adelanto del tiempo de floración. El nivel del mensajero de *PEAM6* en las plantas homocigotas de estas líneas es inferior al mostrado en sus correspondientes plantas hemizigotas. Además, la atenuación del fenotipo 35S::*PEAM6* en

homocigosis, no sólo se mantuvo, sino que se acentuó aún más al pasar de una generación a la siguiente. Esta atenuación es, posiblemente, el resultado de un fenómeno de silenciamiento del transgén en homocigosis. El fenómeno del silenciamiento resultante de la introducción de transgenes expresados bajo el control del promotor fuerte 35S, ha sido descrito frecuentemente en los últimos años (Baulcombe, 1996; Flavell, 1994; revisado en Matzke y Matzke, 1995; Meyer, 1996; Vaucheret y Fagard, 2001) y puede afectar a la expresión del transgén o también a la de sus homólogos endógenos, fenómeno denominado como cosupresión. En nuestro caso, no se ha determinado el nivel de expresión de los genes endógenos homólogos a *PEAM6*; sin embargo, las plantas silenciadas no muestran características fenotípicas que, aunque sutiles, conlleven las mutaciones en los genes *SEP*.

Las plantas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM6*, tanto cultivadas bajo condiciones de fotoperiodo largo como de corto, muestran adelanto del tiempo de floración con reducción en el número de hojas de roseta y caulinares. La expresión constitutiva de *PEAM6* causa también la conversión de los ápices de inflorescencia en flores terminales, la aparición de flores solitarias en las axilas de las hojas caulinares y la curvatura de las hojas caulinares. Excepto la formación de flores terminales, que no se ha observado en día corto, estas características fenotípicas se han observado tanto en plantas cultivadas bajo condiciones de día largo como de día corto, aunque en estas últimas la incidencia fue mucho menor y sólo en las líneas de fenotipo severo. Como se ha comentado previamente, la expresión constitutiva de los genes de identidad de meristemo floral tales como *LFY*, *AP1* o *FUL*, y algunos de sus homólogos, además de causar floración temprana en diferentes especies, en *Arabidopsis* causan también la conversión de los meristemos inflorescentes en meristemos florales (Elo *et al.*, 2001; Ferrándiz *et al.*, 2000b; He *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 1999; Kozuka *et al.*, 1997; Mandel y Yanofsky, 1995b; Mouradov *et al.*, 1998; Nilsson y Weigel, 1997; Peña *et al.*, 2001; Rottmann *et al.*, 2000; Southerton *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999; Weigel y Nilsson, 1995).

El fenotipo de adelanto de las plantas 35S::*PEAM6* es similar al mostrado por las plantas que expresan constitutivamente el gen *PEAM4*, al que se le atribuye un papel en la iniciación floral de guisante. Sin embargo, se observan algunas diferencias entre la respuesta al fotoperiodo de las líneas 35S::*PEAM6* y las líneas 35S::*PEAM4*. Así, mientras que el fotoperiodo corto retrasa la floración de las plantas 35S::*PEAM4* en la misma proporción que la de las plantas control, las plantas 35S::*PEAM6*, que en día largo muestran mayor adelanto que las plantas 35S::*PEAM4*, así como alteraciones en la arquitectura más severas, parecen, sin embargo, ser relativamente insensibles a fotoperiodo y las condiciones de día corto retrasan poco su floración con respecto a los fotoperiodos inductivos. Así, mientras que en día largo las plantas 35S::*PEAM6* florecen con el 50% de las hojas con que florecen las plantas control, la reducción alcanza un 80% en condiciones de día corto. Esto

podría sugerir que, aunque el efecto causado por la expresión constitutiva de *PEAM4* y de *PEAM6* es básicamente similar, estarían afectando a factores que pertenecen a rutas distintas implicadas en promover la transición floral. La insensibilidad al fotoperiodo ha sido observada también en las plantas transgénicas 35S::*CO*, las cuales florecen más pronto que las plantas silvestres y son casi insensibles a la longitud del día ya que florecen con prácticamente el mismo número de hojas tanto bajo condiciones de día largo como de día corto (Onouchi *et al.*, 2000). También se han observado diferencias con respecto a la morfología de las flores terminales. En las plantas 35S::*PEAM6* la estructura terminal muestra con relativa frecuencia transformaciones homeóticas de los órganos florales que la componen, principalmente hacia estructuras de naturaleza carpeloide, aunque también son relativamente frecuentes las transformaciones de pétalos hacia estambres. Este tipo de transformaciones también se han observado con relativa frecuencia en la última flor producida antes de la flor terminal. Ninguna de estas alteraciones se han observado en las flores terminales de las plantas 35S::*PEAM4* analizadas en este trabajo.

El fenotipo de las plantas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM6* recuerda al fenotipo causado por la expresión constitutiva del gen *SEP3*, aunque el fenotipo de las plantas de *Arabidopsis* 35S::*PEAM6* fue menos severo que el descrito para la expresión constitutiva de *SEP3* (Pelaz *et al.*, 2001b). Recientemente, se ha descrito que los genes *SEPALLATA* representan una nueva clase de genes de identidad de órgano floral, definida como clase D, que proporcionan la actividad específica de flores a los genes de función B y C, siendo necesarios para la especificación de pétalos, estambres y carpelos. Puesto que se han descrito homólogos de los genes *SEP* en eudicotiledóneas (Angenent *et al.*, 1994; Buchner y Boutin, 1998; Davies *et al.*, 1996a; Flanagan y Ma, 1994; Kotilainen *et al.*, 2000; Mandel y Yanofsky, 1998; Pnueli *et al.*, 1994b; Savidge *et al.*, 1995), monocotiledóneas (Kang y An, 1997) y gimnospermas (Mouradov *et al.*, 1998) parece probable que las interacciones de los genes *SEP* con los genes ABC se hallen conservadas en especies de plantas filogenéticamente distantes. Aunque se ha descrito que la expresión constitutiva de los genes *SEP* causa un fenotipo similar al de la expresión constitutiva de genes implicados en el proceso de la iniciación floral, ocasionando floración temprana, con aparición de flores terminales, producción de flores axilares y curvatura de las hojas, hasta la fecha no se les ha atribuido un papel en la iniciación floral.

#### 4. INTERACCIÓN ENTRE LOS POLIPÉPTIDOS PEAM6 Y PEAM4

Nuestros resultados muestran que la proteína PEAM6 interacciona con PEAM4 en el sistema del doble híbrido en levadura. Por un lado se han aislado varios clones de *PEAM4*

mediante el rastreo de una librería de cDNA de ápices florales de guisante usando como cebo la proteína PEAM6. Por otro, se ha demostrado la interacción directa de estas dos proteínas en levaduras cotransformadas con una construcción en la que *PEAM6* se hallaba fusionado al dominio de unión del factor transcripcional GAL4 y otra en la que *PEAM4* está fusionado al dominio de activación.

Estos resultados son coherentes con los publicados recientemente por Pelaz *et al.*, (2001b) que describen la interacción en levadura entre los polipéptidos SEP3 y AP1 de *Arabidopsis* y que muestran que en el rastreo de una librería de doble híbrido en levadura usando como cebo una versión truncada del cDNA de *AP1* se rescatan clones de *SEP3*. Los resultados de Honma y Goto (2001) también muestran la interacción de ambas proteínas en levadura.

El aislamiento de un clon parcial de *PEAM4* al que le falta la región correspondiente a los 119 primeros aá, que equivale a la caja MADS, la región I, y 27 aá de la región K, apoya la hipótesis de que el dominio K es el principal mediador de la interacción PEAM6-PEAM4. Sin embargo, posiblemente como resultado de un artefacto del clonaje durante la construcción de la genoteca, este clon parcial contiene en la región 5' una secuencia, ausente de la secuencia de *PEAM4*, que codifica para 7 aá extra; dado que no se puede descartar de manera absoluta que ese fragmento extra pudiera contribuir a la interacción con PEAM6, nuestros datos no permiten afirmar de manera concluyente que la región de PEAM4 constituida por la caja K y la región C-terminal sean capaces por sí solas de interactuar con PEAM6.

En concordancia con esta hipótesis se ha visto que la capacidad de AP1 y CAL para interactuar con SEP3, SOC1, SVP y AGL24 está mediada principalmente por la caja K, incluso aunque falte parte de la primera  $\alpha$ -hélice, y que el dominio C-terminal parece estabilizar estas interacciones, tal y como se ha mostrado previamente entre AG y sus interactores (Davies *et al.*, 1996a; Egea-Cortines *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 1999; Pelaz *et al.*, 2001b).

Estudios previos han demostrado la importancia del dominio MADS y de la región I para la formación de homodímeros de AG y AP1 (Krizek y Meyerowitz, 1996b; Mizukami *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1996a), mientras que otros han mostrado que la región I y K son necesarias para la formación del heterodímero AP3/PI (Krizek y Meyerowitz, 1996b; Riechmann *et al.*, 1996a). Por otra parte se ha visto que el dominio K de AG es suficiente para mediar interacciones con SEP1, SEP2, SEP3 y AGL6 en levadura (Fan *et al.*, 1997).

Estudios genéticos en *Arabidopsis* apoyan la idea de que la interacción de AP1 con las proteínas SEP tiene un significado funcional. Así, se ha visto que el fenotipo de los pétalos, parcialmente transformados en sépalo en los mutantes *sep3*, es similar al mostrado por el

segundo verticilo de los mutantes intermedios de *ap1*, incluyendo *ap1-2*, *ap1-4* y *ap1-6* (Bowman *et al.*, 1993), lo que sugiere que algunas de las actividades del gen *AP1* requieren de la participación de *SEP3*. Un fenotipo similar se observa en plantas transgénicas que expresan la región 5' del gen *SEP3* en orientación antisentido bajo el promotor 35S, donde el fenotipo llegaba a ser incluso más severo que el del mutante simple *sep3*, probablemente por una disminución de la actividad de los otros genes relacionados, *SEP1* y *SEP2* (Pelaz *et al.*, 2001b).

En este trabajo hemos llevado a cabo un abordaje de ganancia de función, generando plantas que contenían simultáneamente los dos transgenes correspondientes, para buscar evidencias genéticas de que *PEAM4* y *PEAM6* interaccionan *in planta* y testar de este modo la interacción propuesta entre *PEAM6* y *PEAM4* que sugieren los resultados de doble híbrido en levadura. Las plantas hemizigotas para ambos transgenes simultáneamente, *35S::PEAM4 35S::PEAM6*, mostraron un fenotipo de adelanto de floración intensificado con respecto al mostrado por la expresión constitutiva de cada uno de ellos por separado. Bajo condiciones de fotoperiodo inductivo los dobles hemizigotos florecieron con un número inferior de hojas que las plantas hemizigotas y homocigotas para cada uno de los transgenes. Bajo condiciones de fotoperiodo no inductivo, los dobles hemizigotos de nuevo mostraron un fenotipo más severo que el de los hemizigotos para cada uno de los transgenes, sin embargo, florecieron con un número de hojas ligeramente superior al de las plantas homocigotas *35S::PEAM6*, aunque inferior al del homocigoto *35S::PEAM4*. En estos dobles hemizigotos se ha observado que el incremento en el número de hojas en plantas cultivadas en día corto frente a las cultivadas en día largo es de tres veces (frente a las seis de las plantas control), mientras que en las plantas homocigotas *35S::PEAM6* es de dos veces. Estos datos sugieren por lo tanto que, aunque el doble hemizigoto *35S::PEAM4 35S::PEAM6* muestra un comportamiento frente al fotoperiodo muy similar al mostrado por las plantas homocigotas *35S::PEAM6*, sin embargo, en éstos la insensibilidad al fotoperiodo no es tan acentuada como en las plantas homocigotas *PEAM6*, y esta pérdida de la insensibilidad podría estar causada por la presencia de *PEAM4*.

Además, en los dobles hemizigotos de fenotipo más severo se observó la aparición de rasgos fenotípicos nuevos, como la formación de flores en las axilas de las hojas de roseta, la determinación de todas las coflorescencias e inflorescencias secundarias, y ocasionalmente, la curvatura de los cotiledones, características fenotípicas que no fueron en ningún caso observadas en las plantas resultantes de la expresión constitutiva de sólo uno de los transgenes, ni siquiera en las plantas *35S::PEAM6* de fenotipo más severo. Estos datos indican la existencia de una sinergia entre el efecto causado por los transgenes

*PEAM4* y *PEAM6* en *Arabidopsis* y apoyan la idea de que sus productos interactúan “*in planta*”.

La intensificación del fenotipo en las plantas 35S::*PEAM6* 35S::*PEAM4* es similar al mostrado por las plantas que expresan constitutivamente *SEP3* y *AP1* (Pelaz *et al.*, 2001b) y donde se observó que la capacidad de cada transgén para promover la floración era considerablemente mayor cuando el otro transgén estaba presente, lo que se ha interpretado como una evidencia genética en apoyo a la idea de que *SEP3* y *AP1* interactúan durante el desarrollo floral. También se ha descrito que la mutación *tfl-1*, que provoca la expresión ectópica de *AP1* en los meristemas de inflorescencia (Bowman *et al.*, 1993; Gustafson-Brown *et al.*, 1994), en combinación con 35S::*SEP3* produce el mismo fenotipo que el de las plantas dobles transgénicas 35S::*AP1* 35S::*SEP3* (Pelaz *et al.*, 2001b).

Los patrones de expresión solapantes de los genes *PEAM4* y *PEAM6* observados mediante estudios de hibridación *in situ* (Navarro, 2001), son compatibles con la hipótesis de que estas dos proteínas también puedan interactuar *in planta* en guisante.

Como se comentó anteriormente, la expresión constitutiva de *PEAM6* en *Arabidopsis* causa la formación de flores terminales, en las que predominan los órganos con características carpeloides, y también de estructuras filamentosas de naturaleza carpeloide que se desarrollan en las axilas de las hojas caulinares que sustentan flores solitarias. El análisis de las flores terminales de los dobles hemizigotos 35S::*PEAM6* 35S::*PEAM4* reveló una disminución considerable en la frecuencia de formación de estructuras carpeloides con respecto a flores terminales de las plantas 35S::*PEAM6*, lo que sugiere que es la presencia de *PEAM4* la causante de esta disminución; no obstante, en la mayoría de los casos se conservan las estructuras filamentosas carpeloides que se forman en las axilas de las hojas caulinares. La formación de estructuras carpeloides se ha observado como una característica fenotípica asociada a la expresión constitutiva de los genes *SEP* (Pelaz, S. comunicación personal).

Además de las interacciones entre *SEP3* y *AP1*, estudios recientes de doble híbrido, así como datos genéticos, han mostrado que *SEP3* interactúa con los productos de los genes de identidad de órgano floral *AP3*, *PI* y *AG* (Fan *et al.*, 1997; Honma y Goto, 2001; revisado en Jack, 2001; Pelaz *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2001a). Así, la función específica de *SEP3* durante el desarrollo floral está determinada en parte por sus interacciones con otras proteínas MADS-box.

También se ha descrito que las proteínas *SEP3* y *AP1* contienen dominios de activación transcripcional, localizados primariamente en su dominio C (Cho *et al.*, 1999; Honma y Goto, 2001; Pelaz *et al.*, 2001b). En ensayos de la capacidad de transactivación en levaduras y en

células epidérmicas de cebolla de proteínas MADS, la proteína SEP3, al igual que AP1, muestra una alta actividad transcripcional, mientras que otras proteínas como PI, AP3 y AG no mostraban actividad detectable (Honma y Goto, 2001). Adicionalmente, en experimentos de transactivación en células epidérmicas de cebolla se mostró que las proteínas SEP1 y SEP2 muestran una actividad transcripcional moderada o muy débil, respectivamente (Honma and Goto, 2001). Este conjunto de datos, junto a otros de carácter genético, han conducido a la propuesta de que las proteínas SEP participan en el control del desarrollo floral formando complejos con las proteínas MADS-box responsables de la identidad de los órganos florales, aportando a dichos complejos la actividad de activación transcripcional (Honma y Goto, 2001; revisado en Jack, 2001; Pelaz *et al.*, 2001a, b; Theißen, 2001; Theißen y Saedler, 2001). Puesto que sólo los triples mutantes *sep1 sep2 sep3* muestran un fenotipo evidente, similar al de los dobles mutantes de genes de función B y C, mientras que los mutantes simples o dobles muestran fenotipos muy leves (Pelaz *et al.*, 2000), hay que asumir que no sólo SEP3, sino también SEP1 y SEP2 proporcionarían los dominios de activación a los complejos de proteínas MADS.

Nuestros resultados muestran que la construcción de *PEAM6* fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4, no activa los genes delatores en levadura, mostrando de esta forma un comportamiento más parecido al de *SEP2* que al de *SEP1* o *SEP3*, aunque en *SEP2* se haya podido detectar algo de actividad transcripcional; como se comentó anteriormente, *PEAM6* muestra más homología de secuencia con *SEP1* y *SEP2* que con *SEP3*.

Al igual que ocurre con AP1, la proteína completa *PEAM4* fusionada al dominio de unión a DNA de GAL4 fué capaz de activar los genes delatores en la levadura, y por ello no se ha podido usar esta construcción como cebo en el rastreo de la librería de cDNA. Queda pendiente, sin embargo, el ensayo de cuantificación de la actividad transcripcional de *PEAM4*, que resultaría interesante para hacer la comparación con esta actividad en AP1.

Por otro lado, la capacidad de activación transcripcional de SEP3 y AP1 en levadura es abolida por la delección del dominio C (Honma and Goto, 2001). Sobre la base de dicha observación podrían generarse versiones truncadas de la proteína *PEAM4* que carezcan de la función de activación transcripcional y que podrían ser empleadas como cebo en el rastreo de la librería de cDNA de ápices florales de guisante.

Tanto el fenotipo causado por la expresión constitutiva de *PEAM6*, como la capacidad que muestra el producto de dicho gen de interactuar con el del gen de identidad de meristemo floral de guisante *PEAM4*, están en concordancia con la idea de que *PEAM6* pudiese tener un papel relevante en la iniciación floral en guisante. Sin embargo, un comportamiento similar ha sido observado para los genes *SEP*, homólogos a *PEAM6* de *Arabidopsis*, que hasta el momento no han sido implicados en el proceso de iniciación floral

en dicha planta. Cabe la posibilidad de que en guisante, en el que el desarrollo de la inflorescencia es sustancialmente distinto al de *Arabidopsis*, *PEAM6* juegue, adicionalmente, un papel en la formación de los meristemos florales.

La transformación de plantas de *Medicago truncatula*, una leguminosa modelo cuya arquitectura de inflorescencia y ontogenia floral son básicamente idénticas a las de guisante, con construcciones que alteran la expresión de su correspondiente homólogo podría aportar datos de interés sobre la posible función de *PEAM6* en la iniciación floral.

## **5. UTILIDAD DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA COMO ABORDAJE AL ESTUDIO FUNCIONAL DE GENES MADS**

La demostración inequívoca de la función de un gen pasa, generalmente, por la obtención de un mutante correspondiente a ese gen y que muestre fenotipo. Sin embargo, existen numerosos ejemplos de redundancia génica que dificultan este tipo de análisis. Un ejemplo típico es el del gen *CAL*, funcionalmente redundante con *AP1*; de hecho, los mutantes *cal* no muestran fenotipo por sí solos, pero intensifican el fenotipo del mutante *ap1* (Bowman *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1995). Otro caso de redundancia génica es el de los genes *SEP1*, *SEP2* y *SEP3*; las mutaciones en cualquiera de ellos producen fenotipos muy débiles, casi imperceptibles y, sin embargo, el triple mutante *sep1 sep2 sep3* muestra un fenotipo severo y muy claro (Pelaz *et al.*, 2000).

Alternativamente al análisis de mutantes, se han llevado a cabo distintos tipos de aproximaciones al estudio de la funcionalidad de un gen, basadas en la modificación de su expresión mediante la generación de plantas transgénicas. En sistemas homólogos, los estudios han ido encaminados, con frecuencia, al silenciamiento específico de genes homólogos, bien mediante la obtención de líneas transgénicas con construcciones antisentido, por cosupresión, con construcciones diseñadas para la expresión constitutiva del gen, o más recientemente, mediante el uso de construcciones de tipo *ihpRNA* (Wang y Waterhouse, 2001).

Por otro lado, existen numerosos ejemplos de expresión constitutiva en sistemas homólogos como un método útil para estudiar el papel de genes relacionados con la regulación de distintos procesos del desarrollo. Este tipo de abordaje se ha utilizado, por ejemplo, para estudiar la función de genes de *Arabidopsis*, y de sus homólogos en otras especies, implicados en las diferentes etapas del proceso de floración y se ha documentado la expresión constitutiva de genes de tiempo de floración, entre los que se encuentra *CO* (Simon *et al.*, 1996) de iniciación floral, como *LFY* y *AP1* (Mandel y Yanofsky, 1995b; Weigel y Nilsson, 1995), así como de genes de identidad de órgano floral de función A, B, C y D,

como *AP1* (Mandel y Yanofsky, 1995b), *PI* y *AP3* (Krizek y Meyerowitz, 1996a), *AG* (Mizukami y Ma, 1992) y *SEP1*, *SEP2* y *SEP3* (Pelaz *et al.*, 2001a, b).

También se ha descrito la complementación de mutantes, con el gen completo o mediante expresión constitutiva de su cDNA, como método para llevar a cabo estudios de funcionalidad de genes en sistemas homólogos. Ejemplos de esto son la complementación del mutante *pi-1* con la construcción 35S::*PI* (Krizek y Meyerowitz, 1996a) así como el rescate de los fenotipos mutantes *ap3-1* y *ap3-3* con un clon genómico de *AP3* (Irish y Yamamoto, 1995; Okamoto *et al.*, 1994).

En los estudios de funcionalidad con sistemas transgénicos heterólogos el abordaje más comúnmente utilizado es la expresión constitutiva, ya que en esta situación conseguir el silenciamiento específico de genes homólogos resulta poco probable debido a la falta de homología suficiente. En este caso, también se han descrito numerosos ejemplos de expresión constitutiva heteróloga, principalmente en especies fácilmente transformables como *Arabidopsis* y tabaco, aunque también en otras especies. Ejemplos de esta aproximación son la expresión de genes de función C, como *DAL2* (*Picea abies*) y *SAG1b* (*Picea mariana*) en *Arabidopsis* (Tandre *et al.*, 1998), o de los genes *pMADS3* (petunia), *OsMADS3* (arroz) y *PLE* y *FAR* (*Antirrhinum*) en tabaco (Davies *et al.*, 1999a; Kang *et al.*, 1995; Mandel *et al.*, 1992a; Tsuchimoto *et al.*, 1993); genes de función B, como *GLO* y *DEF* (*Antirrhinum*) en tabaco (Davies *et al.*, 1996b); así como de genes que juegan un papel en la iniciación floral, como la expresión constitutiva de *LFY* (*Arabidopsis*) en álamo híbrido (*Populus tremula* x *Populus tremuloides* o *Populus tremula* x *Populus alba*; Rottmann *et al.*, 2000; Weigel y Nilsson, 1995) y en citrange híbrido (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *Poncirus trifoliata* L. Raf; Peña *et al.*, 2001) o la expresión constitutiva de los homólogos de *FUL* *MdMADS2* (manzano) y *BpMADS3*, *BpMADS4* y *BpMADS5* (*Betula pendula*) en tabaco (Elo *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1999).

En el presente trabajo, debido a que el guisante es una planta muy difícil de transformar, hemos empleado la expresión constitutiva en sistemas heterólogos como abordaje experimental para el estudio de la función de varios genes MADS de guisante aislados previamente en nuestro laboratorio (Ferrándiz, 1996).

La expresión constitutiva como herramienta para el estudio funcional de genes presenta diversas limitaciones. Una de ellas es que, debido a la existencia de familias de genes muy similares, la expresión constitutiva de genes de funciones distintas pueden producir fenotipos similares que, en ocasiones, pueden ser artefactuales. Un ejemplo es el de la expresión constitutiva conjunta de *PI* y *AP3*, genes MADS implicados en el control de la función B de identidad de órganos florales, pero que al ser expresados conjuntamente de forma constitutiva producen un fenotipo de adelanto de floración (Krizek y Meyerowitz,

1996a). Sin embargo, no todos los genes MADS producen adelanto de floración cuando son expresados constitutivamente. Por ejemplo, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan constitutivamente el gen *FLC* muestran retraso evidente del tiempo de floración y se ha descrito este gen como un represor de la floración (Koornneef *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994b; Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon *et al.*, 1999). Del mismo modo, la expresión constitutiva de los genes de *Arabidopsis* *FLM* (*FLOWERING LOCUS M*) o *MAF1*, que codifica una proteína homóloga a *FLC*, también provocan retraso en la floración (Ratcliffe *et al.*, 2001; Scortecci *et al.*, 2001).

La utilidad de los experimentos de expresión constitutiva heteróloga depende en gran medida de que se disponga de información suficiente acerca del gen estudiado, y de sus homólogos en otras especies, que permitan formular una hipótesis previa de funcionalidad con la que contrastar los resultados obtenidos. La expresión constitutiva nos permite analizar el efecto de la expresión ectópica de un gen cuyo homólogo endógeno posee un dominio de expresión muy delimitado. Además, en determinados casos, como cuando se expresan genes de identidad de órgano floral en plantas transgénicas, también es informativo el análisis del efecto de la expresión constitutiva sobre la expresión de los genes endógenos con los que se halla relacionado el transgén (Davies *et al.*, 1996b).

Además de la expresión heteróloga en plantas de genotipo silvestre, hemos utilizado las construcciones de expresión constitutiva para testar la capacidad de algunos de los genes de guisante para complementar mutaciones en genes de *Arabidopsis* que podrían ser los homólogos funcionales de los genes bajo estudio. La complementación heteróloga aporta gran especificidad a los estudios de homología funcional. Así, por ejemplo, *PEAM1* es capaz de rescatar el fenotipo causado por la mutación en el gen *PI* pero no el causado por la mutación en *AP3*, el otro gen de función B de *Arabidopsis*. Por otra parte, en el caso de la complementación de *ap1-1* por *PEAM4*, el hecho de que el gen de guisante sea capaz de rescatar el fenotipo floral del mutante de *Arabidopsis* no sólo apoya la idea de que este gen sea el homólogo funcional de *AP1* sino que además sugiere que *PEAM4* comparte con su homólogo de *Arabidopsis* la capacidad de especificar la identidad de sépalo y pétalo, capacidad que no está claro que posean todos los homólogos de *AP1*. Nuestro trabajo muestra, por tanto, que la complementación heteróloga de mutantes de *Arabidopsis*, una herramienta relativamente poco explotada en los estudios de genética del desarrollo en plantas, puede ser de gran utilidad para el análisis de la función de genes de especies en las que el aislamiento de mutantes o la transformación genética son tareas que implican una dificultad considerable.

## ***CONCLUSIONES***



Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis nos han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

**PRIMERA.** Los resultados de la expresión constitutiva de *PEAM1* en plantas silvestres de *Arabidopsis* y de tabaco apoyan la hipótesis de que *PEAM1* funciona como un gen de identidad de órgano floral de tipo B. Además, el hecho de que la construcción 35S::*PEAM1* sea capaz de complementar la mutación *pi-1* de *Arabidopsis*, pero no las mutaciones *ap3-1* o *ap3-3*, confirma que *PEAM1* es el homólogo funcional de guisante del gen *PI*.

**SEGUNDA.** La expresión constitutiva de *PEAM4* acelera la floración en *Arabidopsis* y tabaco, induce la conversión de las inflorescencias en flores en *Arabidopsis*, y reduce el grado de ramificación de las inflorescencias de tabaco. Todo esto sugiere que *PEAM4* podría estar implicado en el proceso de la iniciación floral de guisante. La expresión constitutiva de *PEAM4* en tabaco genera también un fenotipo de floración inhibida que podría deberse a un silenciamiento en los ápices del tallo de los genes de tabaco *NAP1-1* y *NAP2-2*, homólogos a *PEAM4*. El gen *PEAM4* es, además, capaz de restaurar los defectos florales del mutante *ap1-1* de *Arabidopsis*. Todos estos datos indican que *PEAM4* es el homólogo funcional de guisante del gen *AP1* de *Arabidopsis*. Nuestros resultados muestran además que *PEAM4*, a pesar de carecer de la secuencia del motivo de prenilación presente en *AP1*, comparte con éste tanto la capacidad de funcionar como un gen de identidad de meristemo floral como la de especificar la identidad de los órganos del periantio, pudiendo, por tanto, actuar como un gen de función A.

**TERCERA.** La expresión constitutiva de *PEAM6* acelera la floración en tabaco y *Arabidopsis*, y en esta última además provoca la conversión de las inflorescencias en flores. Esto concuerda con la hipótesis de que *PEAM6* pueda estar implicado en el proceso de la iniciación floral de guisante, sugerida previamente a partir de las evidencias genéticas que correlacionan a este gen con la mutación *veg1* de guisante, y también apoyada por la expresión temprana del gen en los meristemas florales. No obstante, el fenotipo resultante de la expresión constitutiva de *PEAM6* también es compatible con un papel como gen de tipo *SEP*, con los que comparte homología de secuencia. Los datos disponibles sugieren que tal vez *PEAM6* podría llevar a cabo una doble función en guisante, como gen de iniciación floral y como gen de identidad de órgano floral de tipo *SEP*.

**CUARTA.** El resultado positivo del ensayo de interacción entre PEAM4 y PEAM6 en el sistema del doble híbrido en levadura, así como el hecho de que *PEAM4* haya sido aislado repetidamente en el rastreo de una genoteca de cDNA de ápices florales de guisante, utilizando como cebo a PEAM6, muestran que estas dos proteínas poseen la capacidad de interaccionar. Por otra parte, la intensificación sinérgica del fenotipo de las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan constitutivamente, y de manera simultánea, *PEAM4* y *PEAM6* indica que estos dos genes interaccionan *in planta* durante la iniciación floral y apoya la hipótesis de la interacción entre sus productos génicos sugerida por los experimentos en levadura.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



- Ahmad, M. y Cashmore, A.R.** (1993). *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*. **366**, 162-166.
- Ahmad, M. y Cashmore, A.R.** (1996). The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant J.* **10**, 1103-1110.
- Ainsworth, C., Crossley, S., Buchanan-Wollaston, V., Thangavelu, M. y Parker, J.** (1995). Male and female flowers of the *dioecious* plant sorrel show different patterns of MADS-box genes expression. *Plant Cell*. **7**, 1583-1598.
- Allard, H.A.** (1919). Gigantism in *Nicotiana tabacum* and its alternative inheritance. *Am. Naturalist*. **53**, 218-223.
- Alonso-Blanco, C., El-Din El-Assal, S., Coupland, G. y Koornneef, M.** (1998). Analysis of natural variation at flowering time *loci* in the Landsberg *erecta* and Cape Verde island ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. **149**, 749-764.
- Alvarez, J., Guli, C.L., Yu, X.H. y Smyth, D.R.** (1992). *TERMINAL FLOWER*, a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2**, 103-116.
- Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Ribas de Pouplana, L., Martínez-Castilla, L. y Yanofsky, M.F.** (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *PNAS*. **97**, 5328-5333.
- Amaya, I., Ratcliffe, O.J. y Bradley, D.J.** (1999). Expression of *CENTRORADIALIS* (*CEN*) and *CEN*-like genes in tobacco reveals a conserved Mechanism controlling phase change in diverse species. *Plant Cell*. **11**, 1405-1417.
- Angenent, G.C., Franken, J., Busscher, M., Colombo, L. y van Tunen, A.J.** (1993). Petal and stamen formation in petunia es regulated by the homeotic gene *fbp1*. *Plant J.* **4**(1), 101-112.
- Angenent, G.C., Franken, J., Busscher, M., Weiss, D. y Van Tunen, A.J.** (1994). Co-suppression of the petunia homeotic gene *fbp2* affects the identity of the generative meristem. *Plant J.* **5**, 33-44.
- Araki, T.** (2001). Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 63-68.
- Arumingtyas, E.L. y Murfet, I.C.** (1994). Flowering in *Pisum*. A further gene controlling response to photoperiod. *J. Hered.* **85**, 12-17.
- Aubert, D., Chen, L., Moon, Y-H., Martin, D., Castle, L.A., Yang, C-H. y Sung, Z.R.** (2001). EMF1, a novel protein involved in the control of shoot architecture and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **13**, 1865-1875.
- Aukerman, M.J. y Amasino, R.M.** (1996). Molecular genetic analysis of flowering time in *Arabidopsis*. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **7**, 427-433.

- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. y Elledge, S.J.** (1996). *SKP1* connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*. **86**, 263-274.
- Bancroft, I., Jones, J.D.G. y Dean, C.** (1993). Heterologous transposon tagging of the *DRL1* locus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **5**, 631-638.
- Barber, H.N.** (1959). Physiological genetics of *Pisum*. II. The genetics of photoperiodism and vernalisation. *Heredity*. **13**, 33-60.
- Bartel, P. L., Chien, C.-T., Sternglanz, R y Fields, S.** (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques*. **14**, 920-924.
- Bateson, W.** (1894). Materials for the study of variation. Cambridge: Cambridge University Press.
- Batley, N.H. y Lyndon, R.F.** (1990). Reversion of flowering. *Bot. Rev.* **56**, 162-189.
- Baulcombe, D.C.** (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **32**, 79-88.
- Baulcombe, D.C. y English, J.J.** (1996). Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 173-180.
- 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. Paris, Life Sci.* **316**, 1194-1199.
- Beltrán, J.P., Ferrándiz, C., Gómez, M.D., Rodríguez-Concepción, M., Pérez, A., Navarro, C. y Cañas, L.** (1996). The use of homeotic mutants to study flower development in *Pisum sativum* (L.). *Flowering Newsl.* **22**, 41-48.
- Benfey, P.N., Ren, L. y Chua, N.H.** (1990). Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.* **9** (6), 1685-1696.
- Berbel, A., Navarro, C., Ferrándiz, C., Cañas, L.A., Madueño, F. y Beltrán, J.P.** (2001). Analysis of *PEAM4*, the pea *AP1* functional homologue, supports a model for *AP1*-like genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *Plant J.* **25**, 441-452.
- Bevan, M.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nuc. Acids. Res.* **12**, 8711-8721.
- Beveridge, C.A. y Murfet, I.C.** (1996). The *gigas* mutant in pea is deficient in the floral stimulus. *Physiol. Plant.* **96**, 637-645.
- Beveridge, C.A., Ross, J.J. y Murfet, I.C.** (1992). Mutant *dn* influences dry matter distribution, assimilate partitioning and flowering in *Lathyrus odoratus* L. *J. Exp. Bot.* **43**, 55-62.

- Beveridge, C.A., Badge, S.L., Ross, J.J. y Murfet, I.C.** (2001). Hormone physiology of pea mutants prevented from flowering by mutations *gi* or *veg1*. *Physiol. Plant.* **113**, 285-291.
- Blázquez, M.A.** (2000). Flower development pathways. *J. Cell Sci.* **113**, 3547-3548.
- Blázquez, M.A. y Weigel, D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature.* **404**, 889-892.
- Blázquez, M.A., Koornneef, M. y Putterill, J.** (2001). Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO reports.* **21**, 1078-1082.
- Blázquez, M., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R. y Weigel, D.** (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LFY* promoter. *Plant Cell.* **10**, 791-800.
- Blázquez, M., Soowal, L.N., Lee, I. y Weigel, D.** (1997). *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development.* **124**, 3835-3844.
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M. y Smyth, D.R.,** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development.* **119**, 721-743.
- 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.** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **1**, 37-52.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. y Meyerowitz, E.M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development.* **112**, 1-20.
- Bradley, D.J., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C.A., Rothstein, S. y Coen, E.S.** (1996). Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature.* **379**, 791-797.
- Bradley, D.J., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N. y Coen, E.** (1993). Complementary phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell.* **72**, 85-95.
- Bradley, D.J., Ratcliffe, O.J., Vincent, D., Carpenter, R. y Coen, E.** (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science.* **275**, 80-83.
- Breeden, L. y Nasmyth, K.** (1985). Regulation of the Yeast HO Gene. *Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol.* **50**, 643-650.
- Buchner, P. y Boutin, J-P.** (1998). A MADS box transcription factor of the *AP1/AGL9* subfamily is also expressed in the seed coat of pea (*Pisum sativum*) during development. *Plant Mol. Biol.* **38**, 1253-1255.

- Burgeff, C., Liljegren, S.J., Tapia-López, R., Yanofsky, M.F. y Alvarez-Buylla, E.R.** (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*. **214**, 365-372.
- Busch, M.A., Bomblies, K. y Weigel, D.** (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*. **285**, 585-587.
- Byzova, M.V., Franken, J., Aarts, M.G.M., de Almeida-Engler, J., Engler, G., Mariana, C., Van Lookeren Campagne, M.M. y Angenent, G.C.** (1999). *Arabidopsis* *STERILE APETALA*, a multifunctional gene regulating inflorescence, flower and ovule development. *Genes Dev.* **13**, 1002-1014.
- Carpenter, R. y Coen, E.** (1990). Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev.* **4**, 1483-1493.
- Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Doyle, S., Magrath, R. y Coen, E.** (1995). Control of flower development and phyllotaxy by meristem identity genes in *Antirrhinum*. *Plant Cell*. **7**, 2001-2011.
- Chandler, J., Wilson, A. y Dean, C.** (1996). *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J.* **10**, 637-644.
- Chen, X. y Meyerowitz, E.M.** (1999). *HUA1* y *HUA2* are two members of the floral homeotic *AGAMOUS* pathway. *Mol. Cell.* **3**, 349-360.
- Chen, L., Cheng, J.C., Castle, L. y Sung, Z.R.** (1997). *EMF* genes regulate *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell*. **9**, 2011-2024.
- Cho, S., Jang, S., Chae, S., Chung, K.M., Moon, Y.H., An, G. y Jang, S.K.** (1999). Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* *APETALA1* as a transcription activation domain. *Plant Mol. Biol.* **40**, 419-429.
- Church, G.M. y Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**, 1991-1995.
- Clough, S.J. y Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Coen, E.S. y Carpenter, R.** (1993). The metamorphosis of flowers. *Plant Cell*. **5**, 1175-1181.
- Coen, E.S. y Meyerowitz, E.M.** (1991). The war of the whorls: genetics interactions controlling flower development. *Nature*. **353**, 31-37.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliot, R., Murphy, G. y Carpenter, R.** (1990). *FLORICAULA*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell*. **63**, 1311-1322.

- Conner, J. y Liu, Z.** (2000). *LEUNIG*, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 12902-12907.
- Coupland, G.** (1995). Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis*. *Trends Genet.* **11**, 393-397.
- Davies, B. y Schwarz-Sommer, Z.** (1994). Control of floral organ identity by homeotic MADS-box transcription factors. In *Plant Promoters and Transcription factors*, L. Nover, ed. (Berlin, Germany: Springer-Verlag). 235-258.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H. y Sommer, H.** (1996a). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO J.* **15**, 4330-4343.
- Davies, B., Motte, P., Keck, E., Saedler, H., Sommer, H., y Schwarz-Sommer, Z.** (1999a). *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factor controlling flower development. *EMBO J.* **18**, 4023-4034.
- Davies, B., Rosa, A.D., Eneva, T., Saedler, H. y Sommer, H.** (1996b). Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of *Antirrhinum* MADS-box genes. *Plant J.* **10**, 663-677.
- Davies, B., Sommer, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1999b). Flower development: genetics views and molecular views. En: "*Development: Genetics and Environmental Regulation*". Eds. Russo et al. Springer Verlag, Berlin. pp 167-183.
- De Carvalho Niebel, F., Frendo, P., Van Montagu, M. y Cornelissen, M.** (1995). Post-transcriptional cosuppression of  $\beta$ -1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. *Plant Cell.* **7**, 347-358.
- Delaet, J., Clinckemillie, D., Jansen, S. y Smets, E.** (1995). Floral ontogeny in the *Plumbaginaceae*. *J. Plant Res.* **108**, 289-304.
- Del Pozo, J.C. y Estelle, M.** (2000). F-box proteins and protein degradation: An emerging theme in cellular regulation. *Plant Mol. Biol.* **44**, 123-138.
- Devereux, J., Haeberli, P. and Smithies, O.** (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for de vax. *Nucleic Acids. Res.* **12**, 387-395.
- Devlin, P.F. y Kay, S.A.** (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell.* **12**, 2499-2509.
- Deyholos, M.K. y Sieburth, L.E.** (2000). Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. *Plant Cell.* **12**, 1799-1810.
- Dorlhac de Borne, F., Vincentz, M., Chupeau, Y. y Vaucheret, H.** (1994). Cosuppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 613-621.

**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.

**Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. y Elledge, S. J.** (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Devel.* **7**, 555-569.

**Egea-Cortines, M. y Davies, B.** (2000). Beyond the ABCs: ternary complex formation in the control of floral organ identity. *Trends Plant Sci.* **11**, 471-476.

**Egea-Cortines, M., Saedler, H. y Sommer, H.** (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins *SQUAMOSA*, *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **18**, 5370-5379.

**Elhai, J. y Wolk, P.** (1988). A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene*. **68**, 119-138.

**Elliot, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Perez, P., y Smyth, D.R.** (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*. **8**, 155-168.

**Elmayan, T. y Vaucheret, H.** (1996). Single copies of a strongly expressed 35S-driven transgene undergo post-transcriptional silencing. *Plant J.* **9**, 282-292.

**Elo, A., Lemmetyinen, J., Turunen, M-L., Tikka, L. y Sopanen, T.** (2001). Three MADS-box genes similar to *APETALA1* and *FRUITFULL* from silver birch (*Betula pendula*). *Physiol. Plant.* **112**, 95-103.

**Evans, M.M.S. y Barton, M.K.** (1997). Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* **48**, 673-701.

**Evans, R.C. y Dickinson, T.A.** (1996). North-American black-fruited hawthorns. 2. Floral development of 10-stamen and 20-stamen morphotypes in *Crataegus* section *Douglasii* (*Rosaceae*, *Maloideae*). *Am. J. Bot.* **83**, 961-978.

**Fan, H.-Y., Hu, Y., Tudor, M. y Ma, H.** (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J.* **12**, 999-1010.

**Feilotter, H. E., Hannon, G. J., Ruddel, C. J. y Beach, D.** (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1502-1503.

**Feinberg, A. P. y Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Annal. Biochem.* **132**, 6-13.

**Ferrándiz, C.** (1996). Morfogénesis floral de mutantes homeóticos de *Pisum sativum*. L. Aislamiento y caracterización molecular de genes de la familia MADS. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. y Yanofsky, M.F.** (2000a). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1*, and *CAULIFLOWER*. *Development*. **127**, 725-734.
- Ferrándiz, C., Liljegren, S.J. y Yanofsky, M.F.** (2000b). *FRUITFULL* negatively regulates the *SHATTERPROOF* genes during *Arabidopsis* fruit development. *Science*. **289**, 436-438.
- Ferrándiz, C., Navarro, C., Gómez, M.D., Cañas, L.A. y Beltrán, J.P.** (1999). Flower development in *Pisum sativum*: from the war of the whorls to the battle of the common primordia. *Dev. Genet.* **25**, 280-290.
- Fields, S.** (1993). The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *METHODS: A Companion to Meth. Enzymol.* **5**, 116-124.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J. y Dennis, E.S.** (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 8449-8454.
- Fisher, D.K. y Guiltinan, J.** (1995). Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed to seed protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 278-289.
- Flanagan, C.A. y Ma, H.** (1994). Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene *AGL2* in wild-type and mutants *Arabidopsis* flowers. *Plant Mol. Biol.* **26**, 581-595.
- Flavell, R.B.** (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Mol. Gen. Genet.* **209**, 596-606.
- Flick, J. S. y Johnston, M.** (1990). Two systems of glucose repression of the *GAL1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**(9), 4757-4769.
- Gaudin, V., Libault, M., Pouteau, S., Juul, T., Zhao, G., Lefebvre, D. y Grandjean, O.** (2001). Mutations in *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development*. **128**, 4847-4858.
- Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A. y Dean, Caroline.** (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell*. **107**, 525-535.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A. y Schiestl, R. H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.
- Gocal, G.F.W., King, R.W., Blundell, C.A., Schwartz, O.M., Andersen, C.H. y Weigel, D.** (2001). Evolution of floral meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to *APETALA1* and *LEAFY* of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **125**, 1788-1801.
- Goethe, J. W.** (1790). Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären. Gotha, Germany: W. Ettinger.

**Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M. y Coupland, G.** (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature*. **386**, 44-48.

**Goto, K. y Meyerowitz, E.M.** (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* **8**, 1548-1560.

**Goto, K., Kotake, T., Ohto, M., Kainou, T. y Kuroda, N.** (2001). *Arabidopsis TFL2* gene, encoding a novel polycomb protein, makes a complex with CO-like protein and represses *FT* expression during floral transition. 12<sup>th</sup> International Conference on *Arabidopsis* Research. Madison Wisconsin. 23-27 June.

**Gottschalk, W.** (1963). Die morphologischen und genetischen Verhältnisse vergrünerter Formen von *Verbascum* und *Pisum*. En: "*Beiträge zur Biologie der Pflanzen*" Dunker and Humblot. Berlin.

**Gottschalk, W.** (1964). Die Wirkung mutierter Gene auf die Morphologie und Funktion pflanzlicher Organe. *Bot. Stud. Heft.* **14**, 1-359.

**Gottschalk, W.** (1967). Die Beziehungen zwischen der Expressivität mutierter Gene und inneren Entwicklungsbedingungen. *Biol. Zentralbl.* **86 Supl.**, 221-237.

**Gottschalk, W.** (1975). Investigations on the co-operation of mutated genes. I. Polymeric genes. *Egypt. J. Genet. Cytol.* **4**, 336-344.

**Gottschalk, W.** (1979). A *Pisum* gene preventing transition from the vegetative stage. *Pisum Newsl.* **11**, 10.

**Grandy, D.K., Hanneman, E., Bunzow, J., Shih, M., Machida, C.A., Bidlack, J.M. y Civelli, O.** (1990). Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1370-1376.

**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.

**Guerineau, F. y Mulleneaux, P.** (1993). Plant transformation and expression vectors. *Plant Molecular Biology Labfax*. Ed. R. R. D. Croy. BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp. 121-148.

**Guerineau, F., Lucy, A. y Mulleneaux, P.** (1992). Effect of two consensus sequences preceding the translation initiator codon on gene expression in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.* **18**, 815-818.

**Guo, H., Yang, H., Mockler, T. y Lin, C.** (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science.* **279**, 1360-1363.

**Gustafson-Brown, C., Savidge, B. y Yanofsky, M. F.** (1994). Regulation of the floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell.* **76**, 131-143.

- Halfter, U., Ali, N., Stockhaus, J., Ren, L., y Chua, N.-H.** (1994). Ectopic expression of a single homeotic gene, the *Petunia* gene *green petals*, is sufficient to convert sepals to petaloid organs. *EMBO J.* **13**, 1443-1449.
- Halliday, K., Devlin, P.F., Whitelam, G.C., Hanhart, C. y Koornneef, M.** (1996). The *ELONGATED* gene of *Arabidopsis* acts independently of light and gibberellins in the control of elongation growth. *Plant J.* **9**, 305-312.
- Hanahan, D.** (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-560.
- Hansen, G., Estruch, J.J., Sommer, H. y Spena, A.** (1993). *NTGLO*: a tobacco homologue of the *GLOBOSA* floral homeotic gene of *Antirrhinum majus*: cDNA sequence and expression pattern. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 310-312.
- Hardenack, S., Ye, D., Saedler, H. y Grant, S.** (1994). Comparison of MADS-box genes expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *Plant Cell.* **6**, 1775-1787.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. y Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* **75**, 805-816.
- Haughn, G. W., Schultz, E.A. y Martínez-Zapater, J.M.** (1995). The regulation of flowering in *Arabidopsis thaliana*: meristems, morphogenesis and mutants. *Can J. Bot.* **73**, 959-981.
- Haupt, W.** (1958). Die Blütenbildung bei *Pisum sativum*. *Z. Bot.* **46**, 242-256.
- He, Z., Zhu, Q., Dabi, T., Li, D., Weigel, D. y Lamb, C.** (2000). Transformation of rice with the *Arabidopsis* floral regulator *LEAFY* causes early heading. *Transgenic Res.* **9**(3) 223-227.
- Heard, J., Caspi, M. y Dunn, K.** (1997). Evolutionary diversity of symbiotically induced nodule MADS box genes: characterization of *nmhC5*, a member of a novel subfamily. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**, 665-676.
- Hempel, F. D. y Feldman, L.J.** (1994). Bi-directional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*: acropetal initiation of flowers and 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 and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development.* **124**, 3845-3853.
- Hewitt, Y. M.** (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Hicks, K.A., Millar, A.J., Carré, I.A., Somers, D.E., Straume, M., Meeks-Wagner, R. y Kay, S.** (1996a). Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* *early-flowering 3* mutant. *Science.* **274**, 790-792.

**Hicks, K.A., Sundas, A. y Meeks-Wagner, R.** (1996b). *Arabidopsis* early-flowering mutants reveal multiple levels of regulation in the vegetative-to-floral transition. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **7**, 409-418.

**Hill, J., Donald, K. A. y Griffiths, D. E.** (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5791.

**Hill, J.P. y Lord, E.M.** (1989). Floral development in *Arabidopsis thaliana*: comparison of the wild type and the homeotic *pistillata* mutant. *Can. J. Bot.* **67**: 2922-2936.

**Hill, T.A., Day, C.D., Zondio, S.C., Thackeray, A.G. y Irish, V.F.** (1998). Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3*. *Development.* **125**, 1711-1721.

**Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. y Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* ti-plasmid. *Nature.* **303**, 179-180.

**Hofer, J.M.I., Turner, L., Hellens, R., Ambrose, M., Matthews, P., Michael, A. y Ellis, T.H.N.** (1997). *UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea. *Curr. Biol.* **7**, 581-587.

**Hoffman, C.S. y Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* **57**, 267-272.

**Hole, C.C. y Hardwick, R.C.** (1976). Development and control of the number of flowers per node in *Pisum sativum*. *London Ann. Bot.* **40**, 707-722.

**Honma, T. y Goto, K.** (2000). The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete *cis*-elements responsive to induction and 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.

**Horsch, R.B., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Sanders, P.R., Lloyd, A. y Hoffmann, N.** (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science.* **223**, 496-498.

**Howell, S.H.** (1998). *Molecular Genetics of Plant Development*. Cambridge University Press.

**Huala, E. y Sussex, I.M.** (1992). *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell.* **4**, 901-913.

**Huang, H., Mizukami, Y., Hu, Y. y Ma, H.** (1993). Isolation and characterization of the binding sequences for the product of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 549-567.

- Huang, H., Tudor, M., Weiss, C.A., Hu, Y. y Ma, H. (1995). The *Arabidopsis* MADS-box gene *AGL3* is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol.Biol.* **28**, 549-567.
- Huang, H., Tudor, M., Su., T., Zhang, Y., Hu, Y. y Ma, H. (1996). DNA binding properties of two *Arabidopsis* MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell.* **8**, 81-94.
- Huijser, P., Klein, J., Lönning, W.E., Meijer, H., Saedler, H. y Sommer, H. (1992). Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *SQUAMOSA* in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal.* **11**, 1239-1249.
- Immink, R.G.H., Hannapel, D.J., Ferrario, S., Busscher, M., Franken, J., Lookeren Campagne, M.M. y Angenent, G.C. (1999). A petunia MADS-box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. *Development.* **126**, 5117-5126.
- Ingram, G.C., Doyle, S., Carpenter, R., Schultz, E.A., Simon, R., Haughn, G. y Coen, E.S. (1997). Dual role for *fimbriata* in regulating floral homeotic genes and cell division in *Antirrhinum*. *EMBO J.* **16**, 6521-6534.
- Ingram, G.C., Goodrich, J., Wilkinson, M.D., Simon, R., Haughn, G.W. y Coen, E.S. (1995). Parallels between *UNUSUAL FLORAL ORGANS* and *FIMBRIATA*, genes controlling flower development in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell.* **7**, 1501-1510.
- Irish, V.F. y Yamamoto, Y.T. (1995). Conservation of floral homeotic gene function between *Arabidopsis* y *Antirrhinum*. *Plant Cell.* **7**, 1635-1644.
- Irish, V.F. y Kramer, E.M. (1998). Genetic and molecular analysis of angiosperm flower development. *Advances in Botanical Research.* **28**, 197-230.
- Irish, V.F. y Sussex, I.M. (1990). Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell.* **2**, 741-753.
- Ito, H., Fukada, Y., Murata, K. y Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with álcali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. y Fields, S. (1993). Use of the two hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene.* **8**, 1693-1696.
- Jack, T. (2001). Relearning our ABCs: new twists on an old model. *TRENDS in Plant Science.* **6** (3), 310-316.
- Jack, T., Brockman, L.L. y Meyerowitz, E.M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell.* **68**, 683-697.
- Jack, T., Fox, G.L. y Meyerowitz, E.M. (1994). *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: Transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell.* **76**, 703-716.

**James, P., Haliaday, J. y Craig, E. A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*. **144**, 1425-1436.

**Jang, S., Hong, M.Y., Chung, Y.Y. y An, G.** (1999). Ectopic expression of tobacco MADS-box genes modulates flowering time and plant architecture. *Mol. Cells*. **9**, 576-586.

**Jang, S., An, K., Lee, S. y An G.** (2002). Characterization of tobacco MADS-box genes involved in floral initiation. *Plant Cell Physiol*. **43** (1), 230-238.

**Jofuku, K.D., den Boer, B.G.W., Van Montagu, M. y Okamura, J.K.** (1994). Control of the *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*. **6**, 1211- 1225.

**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**, 344-347.

**Johnston, M., Flick, J. S. y Pexton, T.** (1994). Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. **14**, 3834-3841.

**Kaiser, P. y Auer, B.** (1993). Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to *E. coli*. *BioTechniques*. **14**, 552.

**Kamenetsky, R. y Akhmetova, M.** (1994). Floral development of *Eremurus-Altaiicus* (*Liliaceae*). *Israel J. Plant Sci*. **42**, 227-233.

**Kang, H-G. y An, G.** (1997). Isolation and characterization of a rice MADS box gene belonging to the *AGL2* family. *Mol. Cells*. **7**, 45-51.

**Kang, H-G., Noh, Y.-S., Chung, Y.-Y., Costa, M.A., An, K. y An, G.** (1995). Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS box gene in tobacco. *Plant Mol. Biol*. **29**, 1-10.

**Kelly, A.J., Bonnlander, M.B. y Meeks-Wagner, D.R.** (1995). *NFL*, the tobacco homolog of *FLORICAULA* and *LEAFY*, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell*. **7**, 225-234.

**Kempin, S.A., Mandel, M.A. y Yanofsky, M.F.** (1993). Conversion of perianth into reproductive organs by ectopic expression of the tobacco floral homeotic gene *NAG1*. *Plant Physiol*. **103**, 1041-1046.

**Kempin, S.A., Savidge, B. y Yanofsky, M.F.** (1995). Molecular basis of the *cauliflower* phenotype in *Arabidopsis*. *Science*. **267**, 522-525.

**King, W.M. y Murfet, I.C.** (1985). Flowering in *Pisum*: a six locus *Dne*. *Ann. Bot*. **56**, 835-846.

- Kirchoff, B.K.** (1997). Inflorescence and flower development in the *Hedychae* (*Zingibereaceae*)-*Hedychium*. *Can. J. Bot.* **75**, 581-594.
- Köhler, G.D.** (1965). Die physiologie der Blütenbildung bei *Pisum sativum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **53**, 429-451.
- Koncz, C. y Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Koornneef, M. y Peeters, A.J.M.** (1997). Floral transition mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* **20**, 779-784.
- Koornneef, M., Rolff, E. y Spruitt, C.J.P.** (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* L. *Heynh. Z. Pflanzenphysiol.* **100**, 147-160.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J. y Van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 57-66.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C.J. y Peeters, A.J.M.** (1998a). Genetic interactions among late flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics.* **148**, 885-892.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., y Soppe, W.** (1998b). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 345-370.
- Koornneef, M., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C.J., Soppe, W. y Peters, T.** (1994). The phenotype of some late-flowering mutants is enhanced by a locus on chromosome 5 that is not effective in the Landsberg *erecta* wild type. *Plant J.* **6**, 911-919.
- Kotilainen, M., Elomaa, P., Uimari, A., Albert, V.A., Yu, D. y Teeri, T.H.** (2000). *GRCD1*, an *AGL2*-like MADS box gene, participates in the C function during stamen development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell.* **12**, 1893-1902.
- Krizek, B.A. y Meyerowitz, E.M.** (1996a). The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development.* **122**, 11-22.
- Krizek, B.A. y Meyerowitz, E.M.** (1996b). Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the *Arabidopsis* MADS domain organ identity proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 4063-4070.
- Krizek, B.A., Prost, V. y Macías, A.** (2000). *AINTEGUMENTA* promotes petal identity and acts as a negative regulator of *AGAMOUS*. *Plant Cell.* **12**, 1357-1366.
- Kunst, L., Klenz, J.E., Martínez-Zapater, J.M. y Haughn, G.W.** (1989). *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **1**, 1195-1208.

**Künz, C., Schöb, H., Stam, M., Kooter, J.M. y Meins, F.** (1996). Developmentally regulated silencing and reactivation of tobacco chitinase transgene expression. *Plant J.* **10**, 437-450.

**Kyozuka, J., Harcourt, R., Peacock, W.J. y Dennis, E.S.** (1997). Eucalyptus has functional equivalents of the *Arabidopsis AP1* gene. *Plant Mol. Biol.* **35**, 573-584.

**Lee, I., Aukerman, M.J., Gore, S.L., Lohman, K.N., Michaels, S.D., Weaver, L.M., John, M.C., Feldmann, K.A. y Amasino, R.M.** (1994a). Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **6**, 75-83.

**Lee, I., Michaels, S.D., Masshardt, A.S. y Amasino, R.M.** (1994b). The late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and mutations in *LUMINIDEPENDENS* is suppressed in the Landsberg *erecta* strain of *Arabidopsis*. *Plant J.* **6**, 903-909.

**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**, 2366-2376.

**Lee, I., Wolfe, D.S., Nilsson, O. y Weigel, D.** (1997). A *LEAFY* coregulator encoded by *UNUSUAL FLORAL ORGANS*. *Curr. Biol.* **7**, 95-104.

**Levin, J.Z. y Meyerowitz, E.M.** (1995). *UFO*: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell.* **7**, 529-5548.

**Levy, Y.Y. y Dean, C.** (1998). The transition to flowering. *Plant Cell.* **10**, 1973-1989.

**Li, B. y Fields, S.** (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957-963.

**Li, J., Jia, D. y Chen, X.** (2001). *HUA1*, a regulator of stamen and carpel identities in *Arabidopsis*, codes for a nuclear RNA binding protein. *Plant Cell.* **13**, 2269-2281.

**Li, L., Elledge, S.J., Peterson, C.A., Bales, E.S. y Legerski, R.J.** (1994). Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 5012-5016.

**Liljegren, S., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. y Yanofsky, M.F.** (1999). Interactions among the meristem identity genes *APETALA1*, *LEAFY* and *TERMINAL FLOWER* specify meristem fate. *Plant Cell.* **11**, 1007-1018.

**Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J. y Cashmore, A.R.** (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 2686-2690.

**Liu, Z. y Meyerowitz, E.M.** (1995). *LEUNIG* regulates *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development.* **121**, 975-991.

**Lohmann, J.U., Ray, H., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R. y Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell.* **105** (6), 793-803.

- Longemann, J., Schell, J. y Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Annal. Biochem.* **163**, 16-20.
- Louret, O. F., Doignon, F. y Crouzet, M.** (1997). Stable DNA binding yeast vector allowing high bait expression for use in the two-hybrid system. *BioTechniques.* **23**, 816-819.
- Ma, H.** (1998). To be, or not to be, a flower-control of floral meristem identity. *Trends Genet.* **14**, 26-32.
- Ma, H. y Pamphilis, C.** (2000). The ABCs of floral evolution. *Cell.* **101**, 5-8.
- Ma, H., Yanofsky, M.F. y Meyerowitz, E.M.** (1991). *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* **5**, 484-495.
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Westphal, L., Murphy, G., Sherson, S., Cobbett, C. y Dean, C.** (1997). *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell.* **89**, 737-745.
- Maes, T., Van de Steene, N., Zethof, J., Karimi, M., D'Hauw, M., Mares, G., Van Montagu, M. y Gerats, T.** (2001). Petunia *Ap2*-like genes and their role in flower and seed development. *Plant Cell.* **13**, 229-244.
- Maki, S.L., Horan, A.D. y Singer, S.R.** (1993). Characterisation of a floral mutant in pea affecting the transition from inflorescence to flower development. *Plant Physiol.* **102 Supl.**, 124.
- Mandel, A.M. y Yanofsky, M.F.** (1995a). The *Arabidopsis AGL8* MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1*. *Plant Cell.* **7**, 1763-1771.
- Mandel, A.M. y Yanofsky, M.F.** (1995b). A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature.* **377**, 522-524.
- Mandel, M.A. y Yanofsky, M.F.** (1998). The *Arabidopsis AGL9* MADS-box gene is expressed in young flower primordia. *Sex. Plant Reprod.* **11**, 22-28.
- Mandel, M.A., Bowman, J.L., Kempin, S.A., Ma, H., Meyerowitz, E.M. y Yanofsky, M.F.** (1992a). Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. *Cell.* **71**, 133-143.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. y Yanofsky, M.F.** (1992b). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature.* **360**, 273-277.
- Martínez-Zapater, J.M., Coupland, G., Dean, C. y Koornneef, M.** (1994). The transition to flowering in *Arabidopsis*. En: "*Arabidopsis*". Eds. E.M. Meyerowitz, C. R. Somerville. Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 403-433.

**Martínez-Zapater, J.M., Jarillo, J.A., Cruz-Álvarez, M., Roldán, M. y salinas, J.** (1995). *Arabidopsis* late-flowering *five* mutants are affected in both vegetative and reproductive development. *Plant J.* **7**, 543-551.

**Marx, G.A.** (1987). A suite of mutants that modify pattern formation in pea leaves. *Pl. Molec. Biol. Reporter.* **5**, 311-335.

**Masters, M.T.** (1869). *Vegetable teratology: An Account of the Principal Deviations from the Usual Construction of Plants.* London: RAY Society.

**Matzke, M.A. y Matzke, A.J.M.** (1995). How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* **107**, 679-685.

**Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. y Laux, T.** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell.* **95**, 805-815.

**McGonigle, B., Bouhidel, K. y Irish, V.F.** (1996). Nuclear localization of the *Arabidopsis* *APETALA3* and *PISTILLATA* homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes Dev.* **10**, 1812-1821.

**Medford, J.I., Behringer, F.J., Callos, J.D. y Feldman, K.A.** (1992). Normal and abnormal development in the *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *Plant Cell.* **4**, 631-643.

**Meyer, P.** (1995). Understanding and controlling transgene expression. *Tibtech.* **13**, 332-337.

**Meyer, P.** (1996). Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 23-48.

**Meyerowitz, E.M., Bowman, J.L., Brockman, L.L., Drews, G.N. Jack, T., Sieburth, L.E y Weigel, D.** (1991). A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* **1 Supl.**, 157-167.

**Meyerowitz, E.M., Smyth, D.R. y Bowman, J.L.** (1989). Abnormal flowers and pattern formation in floral development. *Development.* **106**, 209-217.

**Michaels, S.D. y Amasino, R.M.** (1999a). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS-box domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* **11**, 949-956.

**Michaels, S.D. y Amasino, R.M.** (1999b). The gibberellic acid biosynthesis mutant *gai-3* of *Arabidopsis thaliana* is responsive to vernalization. *Dev. Genet.* **25**, 194-198.

**Miller, J.H.** (1972). *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

**Mizukami, Y. y Ma, H.** (1992). Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell.* **71**, 119-131.

- Mizukami, Y. y Ma, H.** (1997). Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell*. **9**, 393-408.
- Mizukami, Y., Huang, H., Tudor, M., Hu, Y. y Ma, H.** (1996). Functional domains of the floral regulator *AGAMOUS*: characterization of the DNA binding domain and analysis of dominant negative mutations. *Plant Cell*. **8**, 831-845.
- Monti, L.M. y Devreux, M.** (1969). *Stamina pistilloida*: a new mutation induced in pea. *Theor. Appl. Genet.* **39**, 17-20.
- Moon, Y.H., Kang, H.G., Jung, J.Y., Jeon, J.S., Sung, S.K. y An, G.** (1999). Determination of the motif responsible for interaction between the rice *APETALA1/AGAMOUS-LIKE9* family proteins using two-hybrid system. *Plant Physiol.* **120**, 1193-1203.
- Motte, P., Saedler, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1998a). *STILOSA* and *FISTULATA*: regulatory components of the homeotic control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *Development*. **125**, 71-84.
- Motte, P., Wilkinson, M. y Schwarz-Sommer, Z.** (1998b). Floral meristem identity and the A function in *Antirrhinum*. *Flowering Newsl.* **25**, 41-43.
- Mouradov, A., Glassick, T., Hamdorf, B., Murphy, L., Fowler, B., Marla, S. y Teasdale, R.D.** (1998). *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6537-6542.
- Müller, B.M., Saedler, H. y Zachgo, S.** (2001). The MADS-box gene *DEFH28* from *Antirrhinum* is involved in the regulation of floral meristem identity and and fruit development. *Plant J.* **28**(2), 169-179.
- Murfet, I.C.** (1971a). Flowering in *Pisum*: reciprocal grafts between known genotypes. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**, 1089-1101.
- Murfet, I.C.** (1971b). Flowering in *Pisum*: three distinct phenotypic classes determined by the interaction of a dominant early and a dominant late gene. *Heredity.* **26**, 243-257.
- Murfet, I.C.** (1973a). Flowering in *Pisum*: *Hr*, a gene for high response to photoperiod. *Heredity.* **3**, 157-164.
- Murfet, I.C.** (1973b). Flowering in *Pisum*: the effect of cotyledon removal on genotypes *If E Sn hr* and *If e Sn hr*. *Aust. J. Biol. Sci.* **26**, 669-673.
- Murfet, I.C.** (1985). *Pisum sativum*. In "Handbook of Flowering" (Halevy, A.H., ed. CRC Press. **4**, 97-126.
- Murfet, I.C.** (1989). Flowering genes in *Pisum*. En "*Plant Reproduction*": *From Floral Induction to Pollination*". Eds. E.M. Lord and G. Bernier. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. pp. 10-18.

**Murfet, I.C.** (1992). Garden pea and allies—an update from Hobart. *Flowering Newsl.* **13**, 10-20.

**Murfet, I.C. y Reid, J.B.** (1973). Flowering in *Pisum*: evidence that gene *Sn* controls a graft-transmissible inhibitor. *Aust. J. Biol. Sci.* **26**, 675-677.

**Murfet, I.C. y Reid, J.B.** (1974). Flowering in *Pisum*: the influence of photoperiod and vernalising temperatures on the expression of genes *Lf* y *Sn*. *Z.Pflanzenphysiol.* **71**, 323-331.

**Murfet, I.C. y Reid, J.B.** (1993). Developmental mutants, En: “*Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*”. Eds. R. Casey and D.R. Davies. CAB International. U.K. pp. 165-216.

**Murfet, I.C., Taylor, S.A. y Singer, S.R.** (1995). Double mutants for inflorescence meristem identity genes in pea. Poster IPGSA 15th International Conference on Plant Growth Substances, Minneapolis.

**Napoli, C., Lemieux, C. y Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell.* **2**, 279-289.

**Napp-Zinn, K.** (1957). Untersuchungen zur genetik des kältebedürfnisses bei *Arabidopsis thaliana* (L.). *Heynh. Z. Indukt. Abstammungs Vererbungsl.* **88**, 253-258.

**Navarro, C.** (2001). Genes reguladores del desarrollo floral en guisante (*Pisum sativum* L.). Tesis doctoral. Univesidad de Valencia.

**Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A. y Bartel, B.C.** (2000). *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell.* **101**, 331-340.

**Ng, M. y Yanofsky, M. F.** (2000). Three ways to learn the ABCs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 47-52.

**Ng, M. y Yanofsky, M.F.** (2001). Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by *APETALA1*. *Plant Cell.* **13**, 739-753.

**Nicholas, K. B. y Nicholas, H. B. Jr.** (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating múltiple séquence alignments. Distributed by the author.

**Nilsson, E.** (1932). Erblchkeitsversuche mit *Pisum*. III-V. *Hereditas.* **17**, 71-99.

**Nilsson, O. y Weigel, D.** (1997). Modulating the timing of flowering. *Current Opinion in Biotechnology.* **8**, 195-199.

**Nilsson, O., Lee, I., Blázquez, M.A. y Weigel, D.** (1998). Flowering-time genes modulate the response to *LEAFY* activity. *Genetics.* **150**, 403-410.

- O'Neill, S.D.** (1992). The photoperiodic control of flowering: progress towards understanding the mechanism of induction. *Photochem. Photobiol.* **56**, 789-801.
- Ohshima, S., Murata, M., Sakamoto, W., Ogura, Y. y Motoyoshi, F.** (1997). Cloning and analysis of the *Arabidopsis* gene *TERMINAL FLOWER1*. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 186-194.
- Okamoto, H., Yano, A., Shiraishi, H., Okada, K. y Shimura, Y.** (1994). Genetic complementation of a floral homeotic mutation, *apetala3*, with an *Arabidopsis thaliana* gene homologous to *DEFICIENS* of *Antirrhinum majus*. *Plant Mol. Biol.* **26**, 465-472.
- Okamoto, J.K., den Boer, B.G.W., Lotys-Prass, C. y Jofuku, K.D.** (1996). Flowers into shoots: photo and hormonal control of a meristem identity switch in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13831-13836.
- Onouchi, H., Igeño, M.I., Périlleux, C., Graves, K. y Coupland, G.** (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell.* **12**, 885-900.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. y Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature.* **395**, 561-566.
- Paton, D.M. y Barber, H.N.** (1955). Physiological genetics of *Pisum*. I. Grafting experiments between early and late varieties. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**, 231-240.
- Peeters, A.J.M. y Koornneef, M.** (1996). Genetic variation in flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **7**, 381-389.
- Pelaz, S., Ditta, G., Baumann, E., Wisman, E. y Yanofsky, M.** (2000). B and C organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature.* **405**, 200-203.
- Pelaz, S., Gustafson-Brown, C., Kohalmi, S.E., Crosby, W.L. y Yanofsky, M.F.** (2001b). *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. *Plant J.* **26** (4), 385-394.
- Pelaz, S., Tapia-Lopez, R., Alvarez-Buylla, E.R. y Yanofsky, M.F.** (2001a). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **11**(3), 182-184.
- Pellegrini, L., Tan, S. y Richmond, T.J.** (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature.* **376**, 490-498.
- Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L. y Martínez-Zapater, J.M.** (2001). Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnol.* **19**, 263-267.
- Perry, S.E., Nichols, K.W. y Fernández, D.E.** (1996). The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. *Plant Cell.* **8**, 1977-1989.
- Pidkowich, M.S., Klenz, J. y Haughn, G.** (1999). The making of a flower: control of floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **4**, 64-70.

**Piñeiro, M. y Coupland, G.** (1998). The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**, 1-8.

**Piñeiro, M., Gómez-Mena, C., Martínez-Zapater, J.M. y Coupland, G.** (2001). The role of *EBS* in the repression of flowering in *Arabidopsis*. EMBO Workshop The Molecular basis of the floral transition. John Innes Centre, Norwich, England. July, 11th-14th.

**Pnueli, L., Hareven, D., Broday, L., Hurwitz, C. y Lifschitz, E.** (1994b). The *TM5* MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell.* **6**, 175-186.

**Pnueli, L., Hareven, D., Rounsley, S.D., Yanofsky, M.F. y Lifschitz, E.** (1994a). Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell.* **6**, 163-173.

**Purugganan, M.D., Rounsley, S.D., Schmidt, R.J. y Yanofsky, M.F.** (1995). Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics.* **140**, 345-356.

**Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. y Coupland, G.** (1995). The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell.* **80**, 847-857.

**Ratcliffe, O.J., Amaya, I., Vincent, C.A., Rothstein, S., Carpenter, R, Coen, E.S. y Bradley, D.J.** (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development.* **125**, 1609-1615.

**Ratcliffe, O.J., Bradley, D.J. y Coen, E.S.** (1999). Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development.* **126**, 1109-1120.

**Ratcliffe, O.J., Nadzan, G.C., Reuber T.L. y Riechmann, J.L.** (2001). Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* homologue. *Plant Physiology.* **126**, 122-132.

**Reeves, P.H. y Coupland, G.** (2000). Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 37-42.

**Reeves, P.H. y Coupland, G.** (2001). Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiology.* **126**, 1085-1091.

**Reid, J.B.** (1979). Flowering in *Pisum*: the effect of age on gene *Sn* and the site of action of the gene *Hr*. *Ann. Bot.* **44**, 163-173.

**Reid, J.B. y Murfet, I.C.** (1977). Flowering in *Pisum*: the effect of light quality on genotype *Sn Hr*. *J. Exp. Bot.* **28**, 1357-1364.

**Reid, J.B. y Murfet, I.C.** (1984). Flowering in *Pisum*: A fifth locus, *veg*. *Ann. Bot.* **53**, 369-382.

- Reid, J.B., Murfet, I.C., Singer, S.R., Weller, J.L. y Taylor, S.A. (1996). Physiological genetics of flowering in *Pisum*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **7**, 455-463.
- Riechmann, J.L. y Meyerowitz, E.M. (1997a). MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* **378**, 1079-1101.
- Riechmann, J.L. y Meyerowitz, E.M. (1997b). Determination of floral organ identity by *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI y AG is independent of their DNA-binding specificity. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 1243-1259.
- Riechmann, J.L., Krizek, B.A. y Meyerowitz, E.M. (1996a). Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA* and *AGAMOUS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 4793-4798.
- Riechmann, J.L., Krizek, B.A. y Meyerowitz, E.M. (1996b). DNA binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA* y *AGAMOUS*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3134-3141.
- Rodríguez-Concepción, M., Yalovsky, S. y Gruissem, W. (1999). Protein prenylation in plants: old friends and new targets. *Plant Mol. Biol.* **39**, 865-870.
- Rottmann, W.H., Meilan, R., Sheppard, L.A., Brunner, A.M., Skinner, J.S., Ma, C., Cheng, S., Jouanin, L., Pilate, G. y Strauss, S.H. (2000). Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J.* **22**(3), 235-245.
- Ruiz-García, L., Madueño, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J. y Martínez-Zapater, J.M. (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. **9**, 1921-1934.
- 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.
- Samach, A. y Coupland, G. (2000). Time measurement and the control of flowering in plants. *BioEssays.* **22**, 38-47.
- Samach, A., Klenz, J.E., Kohalmi, S.E., Risseuw, E., Haughn, G.W. y Crosby, W.L. (1999). The *UNUSUAL FLORAL ORGANS* gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J.* **20**, 433-445.
- Samach, A., Kohalmi, S.E., Motte, P., Datla, R. y Haughn, G.W. (1997). Divergence of function and regulation of class B floral organ identity genes. *Plant Cell.* **9**, 559-570.
- 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. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Sanger, F., Nicklen, S. y Coulso, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.

**Sattler, R.** (1967). Petal inception and the problem of pattern detection. *J. Theor. Biol.* **17**, 31-39.

**Savidge, B., Rounsley, S.D. y Yanofsky, M.F.** (1995). Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell.* **7**, 721-733.

**Schafer, W.R. y Rine, J.** (1992). Protein prenylation: Genes, enzymes, targets and functions. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 209-237.

**Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I.A. y Coupland, G.** (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell.* **93**, 1219-1229.

**Schiestl, R.H. y Gietz, R. D.** (1989). High efficiency transformation of intact cells using stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**, 339-346.

**Schmidt, R.J., Veit, B., Mandel, M.A., Mena, M., Hake, S. y Yanofsky, M.F.** (1993). Identification and molecular characterization of *ZAG1*, the maize homolog of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Plant Cell.* **5**, 729-737.

**Schoentgen, F. y Jolles, P.** (1995). From structure to function: Possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Lett.* **369**, 22-26.

**Schultz, E.A. y Haughn, G. W.** (1991a). *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **3**, 771-781.

**Schultz, E.A. y Haughn, G.W.** (1993). Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development.* **119**, 745-765.

**Schultz, E.A., Pickett, F.B. y Haughn, G.W.** (1991b). The *FLO10* gene product regulates the expression domain of homeotic genes *AP3* and *PI* in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell.* **3**, 1221-1237.

**Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P.J., Hanse, R., Telens, F., Lönning, W-E., Saedler, H. y Sommer, H.** (1992). Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J.* **11**, 251-263.

**Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. y Sommer, H.** (1990). Genetic control of flower development: homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science.* **250**, 931-936.

- Scortecci, K.C., Michaels, S.D. y Amasino, R.M.** (2001). Identification of a MADS-box gene, *FLOWERING LOCUS M*, that represses flowering. *Plant J.* **26** (2), 229-236.
- Shannon, S. y Meeks-Wagner, D.R.** (1991). A mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell.* **3**, 877-892.
- Shannon, S. y Meeks-Wagner, D.R.** (1993). Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **5**, 639-655.
- Sharma, B.** (1975). "Cabbage leaf" and "leafy flower" mutations in *Pisum sativum*. *Pisum Newsl.* **7**, 53.
- Sharrock, R.A. y Quail, P.H.** (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* **3**, 1745-1757.
- 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 and methylation. *Plant Cell.* **11**, 445-458.
- Sheldon, C.C., Finnegan, E.J., Rouse, D.T., Tadege, M., Bagnall, D.J., Helliwell, C.A., Peacock, W.J. y Dennis, E.S.** (2000a). The control of flowering by vernalization. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 418-422.
- Sheldon, C.C., Rouse, D.T., Finnegan, E.J., Peacock, W.J. y Dennis, E.S.** (2000b). The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **97**, 3753-3758.
- Shiraishi, H., Okada, K. y Shimura, Y.** (1993). Nucleotide sequences recognized by *AGAMOUS* MADS domain of *Arabidopsis thaliana* *in vitro*. *Plant J.* **4**, 385- 398.
- Shore, P. y Sharrocks, A.D.** (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* **229**, 1-13.
- Sieburth, L.E. y Meyerowitz, E.M.** (1997). Molecular dissection of *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell.* **9**, 355-365.
- Simon, R., Carpenter, R., Doyle, S. y Coen, E.** (1994). *FIMBRIATA* controls flower development by mediating between meristem and organ identity genes. *Cell.* **78**, 99-107.
- Simon, R., Igeño, M.I. y Coupland, G.** (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature.* **384**, 59-62.
- Simpson, G.G., Gendall, A.R. y Dean, C.** (1999). When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **99**, 519-550.
- Singer, S.R., Hsiung, L.P. y Huber, S.C.** (1990). *Determinate (det)* mutant of *Pisum sativum* (Fabaceae: Papilionoideae) exhibits an indeterminate growth pattern. *Amer. J. Bot.* **77**, 1330-1335.

**Singer, S.R., Maki, S.L., Horan, A.D. y Mullen, H.J.** (1995). Specification of meristem identity in pea is distinct from regulation of determinancy. Poster IPGSA 15th International Conference on Plant Growth Substances, Minneapolis.

**Singer, S.R., Maki, S.L. y Mullen, H.J.** (1994). Specification of meristem identity in *Pisum sativum* inflorescence development. *Flowering Newsl.* **18**, 26-32.

**Singer, S.R., Sollinger, J., Maki, S., Fishbach, J., Short, B., Reinke, C., Fick, J., Cox, L., McCall, A. y Mullen, H.** (1999). Inflorescence architecture: a developmental genetics approach. *Bot. Rev.* **65**, 385-410.

**Smirnov, M.N., Smirnov, V.N., Budowsky, E.I., Inge-Vechtsov, S.G. y Serebrjakov, N.G.** (1967). Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 299-304.

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

**Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M. y Kay S.A.** (2000). *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell.* **101**, 319-329.

**Somers, D.E., Webb, A.A.R., Pearson, M. y Kay S.A.** (1998). The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* **125**, 485-494.

**Sommer, H., Beltrán, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W., 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.

**Sommer, H., Nacken, W., Beltrán, J.P., Huijser, P., Pape, Hansen, R., Flor, P., Saedler, H., y Schwarz-Sommer, Z.** (1991). Properties of *deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*. *Development Supplement.* **1**, 169-175.

**Southerton, S.G., Strauss, S.H., Olive, M.R., Harcourt, R.L., Decroocq, V., Zhu, X., Llewellyn, D.J., Peacock, W.J. y Dennis, E.S.** (1998). Eucalyptus has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Mol. Biol.* **37**, 897-910.

**Stebbins, G.L.** (1974). *Flowering Plants. Evolution above the Species Level.* MA. USA: Harvard University Press.

**Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. y Coupland, G.** (2001). *CONSTANS* mediated between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature.* **410**, 1116-1120.

**Sundberg, M.D.** (1982). Floral ontogeny in *Cyclamen persicum* "F-1 Rosemunde rose" (Primulaceae). *Amer. J. Bot.* **69**, 380-388.

- Sung, Z.R., Belachew, A.T., Shunong, B. y Bertrand-García, R.** (1992). *EMF*, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science*. **258**, 1645-1647.
- Sung, S.-K., Yu, G.-H. y An, G.** (1999). Characterization of *MdMADS2*, a member of the *SQUAMOSA* subfamily of genes in apple. *Plant Physiol.* **120**, 969-978.
- Tandre, K., Svensson, M.E. y Engström, P.** (1998). Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant J.* **15**, 615-623.
- Taylor, S. y Murfet, I.C.** (1994). A short day mutant in pea is deficient in the floral stimulus. *Flowering Newsl.* **18**, 39-43.
- Taylor, S. y Murfet, I.C.** (1996). Flowering in *Pisum*. Identification of a new *ppd* allele and its physiological action as revealed by grafting. *Physiol. Plant.* **97**, 719-723.
- Taylor, S., Hofer, J.M.I. y Murfet, I.C.** (2001). *Stamina pistilloida*, the pea ortholog of *Fim* and *UFO*, is required for normal development of flowers, inflorescences and leaves. *Plant Cell.* **13**, 31-46.
- Theißen, G.** (2001). Development of floral organ identity; stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 75-85.
- Theißen, G. y Saedler, H.** (1995). MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's "biogenetic law" revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 628-639.
- Theißen, G. y Saedler, H.** (2001). Floral quartets. *Nature.* **409**, 469-471.
- Theißen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T. y Saedler, H.** (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* **42**, 115-149.
- Theißen, G., Kim, J.T. y Saedler, H.** (1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **43**, 484-516.
- Thomas, B. y Vince-Prue, D.** (1997). *Photoperiodism in Plants*, 2nd ed. (San Diego, CA: Academic Press).
- Tilly, J.J., Allen, D.W. y Jack, T.** (1998). The *CarG* boxes in the promoter of *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects. *Development.* **125**, 1647-1657.
- Tröbner, W., Ramirez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönning, W-E., Saedler, H., Sommer, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1992). *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO J.* **11**, 4693-4704.
- Tsuchimoto, S., van der Krol, A.R. y Chua, N.H.** (1993). Ectopic expression of *pMADS3* in transgenic petunia phenocopies the petunia *blind* mutant. *Plant Cell.* **5**, 843-853.

**Tucker, S.C.** (1984). Unidirectional organ initiation in leguminous flowers. *Amer. J. Bot.* **75**, 1584-1597.

**Tucker, S.C.** (1987). Floral initiation and development in legumes. En: "Advances in Legume Systematics" (Voll). Ed. C.H. Stirton. Royal Botanical Garden, Kew.

**Tucker, S.C.** (1989). Overlapping organ initiation and common primordia in flowers of *Pisum sativum* (Leguminosae: Papilionoidae). *Am. J. Bot.* **76**, 714-729.

**Van Blokland, R., Vandergeest, N., Mol, J.N.M. y Kooter, J.M.** (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* **6**, 861-877.

**van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M. y Stuitje, A.R.** (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell.* **2**, 291-299.

**Vaucheret, H. y Fagard, M.** (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *TRENDS in Genet.* **17**(1), 29-35.

**Vaucheret, H., Nussaume, L., Palauqui, J.-C., Quilléré, I. y Elmayer, T.** (1997). A transcriptionally active state is required for post-transcriptional silencing (cosuppression) of nitrate reductase host genes and transgenes. *Plant Cell.* **9**, 1495-1504.

**Wagner, D., Sablowski, R.W.M. y Eyerowitz, E.M.** (1999). Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science.* **285**, 582-584.

**Wang, Z.Y. y Tobin, E.M.** (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell.* **93**, 1219-1229.

**Wang, M-B. y Waterhouse, P.M.** (2001). Application of gene silencing in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 146-150.

**Weberling, F.** (1989). Morphology of flowers and inflorescences (trans. R.J. Pankhurst). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Weigel, D. y Meyerowitz, E.M.** (1993). Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Science.* **261**, 1723-1726.

**Weigel, D. y Meyerowitz, E.M.** (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell.* **78**, 203-209.

**Weigel, D. y Nilsson, O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature.* **377**, 495-500.

**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.

- Weisman, L.S., Bacallao, R. y Wickner, W.** (1987). Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *J. Cell Biol.* **105**, 1539-1547.
- Weller, J.L. y Reid, J.B.** (1993). Photoperiodism and photocontrol of stem elongation in two photomorphogenic mutants of *Pisum sativum* L. *Planta.* **198**, 15-23.
- Weller, J.L., Reid, Murfet, I.C. y Reid, J.B.** (1997a). Pea mutants with reduced sensitivity to far-red light define an important role for phytochrome A in daylength detection. *Plant physiol.* **114**, 1223-1236.
- Weller, J.L., Reid, J.B., Taylor, S.A. y Murfet, I.C.** (1997b). The genetic control of flowering in pea. *Trends Pl. Sci.* **2**, 1360-1385.
- Wen-jun, S. y Forde, B. G.** (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**, 4415.
- Whitelam, G.C. y Devlin, P.F.** (1997). Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant Cell Environ.* **20**, 752-758.
- Wiering, H., de Vlaming, P., Cornu, A. y Maizonnier, D.** (1979). *Petunia* genetics. I-List of genes. *Ann. Amélior. Plantes.* **29**, 611-622.
- Wilkinson, M.D. y Haughn, G.W.** (1995). *unusual floral organs* controls meristem identity and organ primordia fate in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **7**, 1485-1499.
- 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.
- Yalovsky, S., Rodríguez-Concepción, M. y Gruissem, W.** (1999). Lipid modification of proteins-Slipping in and out of membranes. *Trends Plant Sci.* **4**, 429-438.
- Yalovsky, S., Rodríguez-Concepción, M., Bracha, K., Toledo-Ortiz, G. y Gruissem, W.** (2000). Prenylation of the floral transcription factor *APETALA1* modulates its function. *Plant Cell.* **12**, 1257-1266.
- Yang, C.H., Chen, L.J. y Sung, Z.R.** (1995). Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: role of the *EMF* genes. *Dev. Biol.* **169**, 421-435.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G., Feldmann, K. y Meyerowitz, E.M.** (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature.* **346**, 35-39.
- Ye, Q., y Worman, H. J.** (1995). Protein-peptide interactions analysed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acid. Res.* **23**(7), 1152-1156.
- Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D.W., Mischak, H., Sedivy, J.M. y Kolch, W.** (2000). Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3079-3085.

**Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K.D., Rose, D.W., Mischak, H., Sedivy, J.M. y Kolch, W.** (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*. **401**, 173-177.

**Yoshida, N., Yanai, Y., Chen, L., Kato, Y., Hiratsuka, J., Miwa, T., Sung, R. y Takahashi, S.** (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **13**, 2471-2481.

**Yu, D., Kotilainen, M., Pöllänen, E., Mehto, M., Elomaa, P., Helariutta, Y., Albert, V.A. y Teeri, T.H.** (1999). Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J.* **17**(1), 51-62.

**Yun, J-Y, Weigel, D. y Lee, I.** (2002). Ectopic expression of *SUPERMAN* suppresses development of petals and stamens. *Plant Cell Physiol.* **43**(1): 52-57.

**Zachgo, S., Saedler, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1997). Pollen-specific expression of *DEFH125*, a MADS-box transcription factor in *Antirrhinum* with unusual features. *Plant J.* **11**, 1043-1050.

**Zachgo, S., de Silva, E.A., Motte, P., Tröbner, W., Saedler, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1995). Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic *DEFICIENS* gene *in vivo* and *in vitro* by using a temperature-sensitive mutant. *Development*. **121**, 2861-2875.

**Zagotta, M.T., Shannon, S., Jacobs, C. y Meeks-Wagner, D.R.** (1992). Early-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 411-418.

**Zhang, F.L. y Casey, P.J.** (1996). Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241-269.

**Zhao, D., Yang, M., Solava, J. y Ma, H.** (1999). The *ASK1* gene regulates development and interacts with the *UFO* gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Dev. Genet.* **25**, 209-223.

**Zhao, D., Yu, Q., Chen, M y Ma, H.** (2001). The *ASK1* gene regulates B function gene expression in cooperation with *UFO* and *LEAFY* in *Arabidopsis*. *Development*. **128**, 2735-2746.