



**UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**Control de la diferenciación del xilema por giberelinas a través  
de la interacción DELLA-AJAX3**

Presentada por:

**JUAN CAMILO ÁLVAREZ MAHECHA**

**Para optar al título de DOCTOR  
Por la Universidad Politécnica de Valencia**

Directores:

**Dr. MIGUEL ANGEL BLÁZQUEZ RODRIGUEZ  
Dr. DAVID ALABADÍ DIEGO**

**Valencia, 2014**



El **Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez**, Investigador Científico del CSIC, y el **Dr. David Pablo Alabadí Diego**, Científico Titular del CSIC, ambos pertenecientes al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC) de Valencia.

CERTIFICAN que **Juan Camilo Álvarez Mahecha**, ha realizado bajo su dirección en el instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, el trabajo titulado “**Control de la diferenciación del xilema por giberelinas a través de la interacción DELLA-AJAX3**”, y que autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que conste, firman el presente certificado en Valencia a 6 de Octubre de 2014.

**Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez**  
Investigador Científico CSIC

**Dr. David Pablo Alabadí Diego**  
Científico Titular CSIC



## **AGRADECIMIENTOS**

A continuación quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de distintas maneras contribuyeron al desarrollo de esta tesis doctoral y que me han acompañado durante este amplio recorrido de cuatro años.

En primer lugar agradezco a mis directores Dr. Miguel Ángel Blázquez y Dr. David Alabadí por permitirme la oportunidad de ampliar mis conocimientos y mi formación como profesional depositando toda su confianza, apoyo y profesionalismo en mí, los cuales fueron de gran utilidad al momento de abordar los distintos desafíos que se hicieron presentes a lo largo de esta investigación.

Agradezco a mis grandes y excelentes compañeros y amigos del laboratorio de señalización hormonal y plasticidad vegetal: Mohamad (Moe), Amelia, Eugenio, Nora, Antonella, Cristina, Berta, Federico, Rodrigo, Jorge, Noel, Iva y Javi por ayudarme a encarar con su sabiduría los desafíos que implica la biotecnología y por enseñarme lo importante de cada una de sus culturas y costumbres las cuales me fueron de gran ayuda en mi adaptación a la vida cotidiana en este hermoso país.

A Francisco Vera por su gran experiencia, guía y paciencia al enseñarme mis primeros pasos en la biología molecular. Al grupo "AJAX": Cristina Úrbez, Marta Pesquera y Juan Carbonell que gracias a su experiencia pude enfocar mis esfuerzos y analizar de manera objetiva cada uno de los aspectos presentes en este trabajo.

A todo el personal tanto científico como técnico del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas IBCMP por toda la ayuda prestada durante mi estancia ya que sin ellos hubiese sido imposible la finalización de esta investigación, en especial a M<sup>ª</sup> Angeles Argomániz y Marisol Gascón por su completa y amable atención e instrucción en las distintas técnicas que aprendí de su parte.

A todos los miembros de las *Naciones Unidas y 4 Labos* por su apoyo y amistad entre trabajo, cerveza y karaoke, con los que compartí momentos inolvidables que recordaré por siempre. A mis colegas y amigos compatriotas Alba Rocío, Carlos, Marcela, Danny, Oscar y Nancy los cuales me han enseñado que nuestros sueños no tienen fronteras y que todo es posible (*destino manifiesto colombiano*).

A mis padres Martha y Gustavo, a mis abuelos y a mi familia entera, que me ha apoyado a lo largo de toda mi formación como profesional y que desde la lejanía me ha dado fuerzas para alcanzar todas y cada una de mis metas. A la Dr. Pilar, mi compañera, amiga y apoyo incondicional que ha caminado junto a mí siendo mi guía espiritual y profesional durante todos estos años aprendiendo a ver y cuidar el oro que se esconde en cada elemento que rodea nuestras vidas.

Esta tesis se llevó a cabo gracias a una beca del programa Santiago Grisolí de la conselleria de educación de la comunitat valenciana.





# RESUMEN



El desarrollo xilemático es un aspecto fuertemente regulado por hormonas y otros factores de tipo endógeno. La caracterización del mutante *acaulis5 (acl5)* en *Arabidopsis thaliana*, deficiente en la síntesis de termoespermina, permitió asignar a esta poliamina una función como regulador de la maduración del xilema, impidiendo la muerte celular antes de que el proceso de diferenciación haya culminado. Aunque se desconoce el mecanismo molecular concreto, se ha identificado un grupo de factores de transcripción de la familia bHLH (SAC51/AJAX1, AJAX2, AJAX3 y AJAX4) cuya traducción es promovida por la termoespermina y es imprescindible para la correcta maduración del xilema, y que actúan como represores de la actividad de LONESOME HIGHWAY (LHW) con el fin de controlar temporalmente los eventos de diferenciación dirigidos por este factor de transcripción.

Aunque se sabe que la degradación de las proteínas DELLAs por parte de las giberelinas (GAs) es necesaria para el aumento de crecimiento secundario que acompaña la transición floral, se desconoce el mecanismo molecular concreto por el que esto sucede. En un rastreo de doble híbrido en levadura para la identificación de factores de transcripción que median la actividad de las proteínas DELLA se identificó AJAX3 como interactor de GAI, por lo que el objetivo de esta tesis ha sido el de comprobar si las giberelinas (GAs) regulan la maduración del xilema, y si lo hacen a través de esta interacción. El análisis genético, fisiológico y molecular ha demostrado que: (1) la deficiencia en GAs provoca un fenotipo en el xilema similar al de la falta de función de *ACL5*; (2) es posible localizar a las DELLAs en la vasculatura, solapando con la expresión de otros elementos necesarios para la diferenciación del xilema, como *ACL5* y *LHW*; y (3) la acumulación de DELLAs específicamente en el dominio de expresión de *ACL5* en la vasculatura dificulta la maduración del xilema. Además, AJAX3 inhibió la capacidad de LHW de activar a sus dianas en ensayos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, y la coexpresión de GAI alivió esta represión. En base a estos resultados, proponemos

que las GAs promueven la maduración del xilema al menos a través de la modulación de la actividad de AJAX3 para acomodar el proceso de diferenciación al aumento de crecimiento secundario durante la transición floral.

Xylem development is tightly regulated by hormones and other endogenous factors. The characterization of the *acaulis5* (*acl5*) mutant in *Arabidopsis thaliana*, defective in thermospermine biosynthesis, led to the establishment of a role for this polyamine in the regulation of xylem maturation, preventing cell death before xylem differentiation has finished. Although the precise molecular mechanism is still unknown, a group of bHLH transcription factors has been identified (SAC51/AJAX1, AJAX2, AJAX3 and AJAX4) whose translation is promoted by thermospermine, and is indispensable for correct xylem maturation. They have been proposed to restrict the activity of another transcription factor, LONESOME HYGHWAY (LHW) to provide temporal control to xylem differentiation.

Although it is known that the degradation of DELLA proteins induced by gibberellins (GAs) is necessary for the increase in secondary growth that accompanies floral transition, the mechanism that directs this switch in vascular development has not been elucidated. In a yeast-two hybrid screening for the identification of transcription factors that mediate the activity of DELLA proteins, AJAX3 was isolated as an interactor of GAI, and the purpose of this Thesis has been to check if GAs regulate xylem maturation, and if they do it through this interaction. The combination of genetic, physiological and molecular analyses has shown that: (1) GA deficiency provokes a xylem phenotype similar to the one caused by loss of *ACL5* function; (2) DELLA proteins accumulate in vasculature, overlapping with the expression of other elements necessary for xylem differentiation, such as *ACL5* and *LHW*; and (3) forced accumulation of DELLAs in the *ACL5* specific expression domain in the vasculature impairs xylem maturation. Moreover, AJAX3 inhibited the capacity of LHW to activate its targets in transient expression assays in *Nicotiana benthamiana*, while coexpression of GAI alleviated this repression.

Based on these results, we propose that GAs promote xylem maturation at least through the modulation of AJAX3 activity to accommodate the differentiation

program to the increase in secondary growth during the transition to reproductive development.

El desenvolupament del xilema està altament regulat per hormones i altres factors endogens. La caracterització del mutant *acaulis5 (acl5)* d'*Arabidopsis thaliana*, que és deficient en la síntesi de termoespermina, va permetre assignar a esta poliamina una funció com a regulador de la maduració del xilema, prevenint la mort cel·lular abans de que el procés de diferenciació haja conclòs. Encara que es desconeix el mecanisme concret, s'ha identificat un grup de factors de transcripció de la família bHLH (SAC51/AJAX1, AJAX2, AJAX3 i AJAX4) la traducció dels quals es promou per termoespermina i és imprescindible per la correcta maduració del xilema, i que actúen com a repressors de l'activitat de LONESOME HIGHWAY (LHW) per tal de controlar temporalment els esdeveniments de diferenciació dirigits per este factor de transcripció.

Encara que es coneix que la degradació de les proteïnes DELLA per part de les giberel·lines (GAs) és necessària per a l'aument de creixement secundari que acompanya a la transició floral, es desconeix el mecanisme concret pel que ocorreix. En un rastreig de doble híbrid de llevat per identificar factors de transcripció mitjançant els quals actúen les proteïnes DELLA es va identificar AJAX3 com a interactor de GAI, així que l'objectiu d'esta Tesi ha sigut comprobar si les GAs regulen la maduració del xilema i si ho fan mitjançant esta interacció. L'anàlisi genètic, fisiològic i molecular ha mostrat que: (1) la deficiència en GAs causa un fenotip al xilema paregut al de pèrdua de funció d'*ACL5*; (2) les DELLA es localitzen a la vasculatura, solapant amb altres elements necessaris, como *ACL5* i *LHW*; i (3) l'acumulació de DELLAs al domini d'expressió d'*ACL5* a la vasculatura compromet la maduració del xilema. A més, AJAX3 inhibeix la capacitat de LHW d'activar les seues dianes en assajos d'expressió transitoria a *Nicotiana benthamiana*, i la co-expressió de GAI alivia este efecte.

En base a estos resultats, proposem que les GAs promouen la maduració del xilema al menys mitjançant la modulació de l'activitat d'AJAX3 per acomodar el procés de diferenciació a l'augment de creixement secundari durant la transició floral.





# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>23</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
1.1 El tejido vascular.....	31
1.2 Formación del tejido vascular .....	32
1.3 Desarrollo de los elementos del xilema .....	35
1.4 Cambios celulares en el desarrollo vascular .....	37
1.5 Factores hormonales que afectan la diferenciación xilemática.....	40
1.6 Papel de las giberelinas en el desarrollo vascular .....	42
1.7 Ruta de señalización por giberelinas.....	46
1.8 Papel de la termoespermina en el desarrollo vascular .....	51
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>
3.1 Las proteínas DELLA GAI y RGA interaccionan con las proteínas de tipo HLH AJAX 67	
3.2 DELLA y AJAX co-localizan a nivel subcelular y tisular.....	71
3.3 Fenotipos relacionados con GAs en la maduración del xilema .....	78
3.4 Efecto de las DELLA en el desarrollo del xilema a través de la ruta de la termoespermina.....	80
3.5 Efecto de la expresión de las proteínas DELLA en tejidos vasculares .....	87
3.6 La sobreexpresión de AJAX3 restaura la maduración del xilema en mutantes deficientes en GAs.....	89
3.7 Las proteínas DELLA regulan la actividad de LHW inhibiendo la actividad de AJAX3 90	

<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>99</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>107</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>111</b>
6.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	113
6.2 Microscopía .....	115
6.3 Microorganismos.....	117
6.4 Amplificación y purificación y de ácidos nucleicos.....	118
6.5 Técnicas de clonación .....	119
6.6 Hibridación <i>in situ</i> .....	123
6.7 Análisis de la actividad $\beta$ -glucoronidasa (GUS).....	126
6.8 Transformación genética.....	127
6.9 Doble híbrido en levadura Y2H.....	130
6.10 Coinmunoprecipitación de proteínas (coIP).....	130
6.11 Extracción de elementos del xilema .....	131
6.12 Análisis estadístico.....	132
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>135</b>

# ***ABREVIATURAS***



---

<b><i>A. thaliana</i></b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b><i>A. tumefaciens</i></b>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<b>ABA</b>	ácido abscísico
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato
<b>cDNA</b>	ADN complementario
<b>CDS</b>	secuencia codificante
<b>cm</b>	centímetro
<b>Col-0</b>	Columbia 0
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ET</b>	Elementos Traqueales
<b>EMS</b>	metanosulfonato de etilo
<b>g</b>	gravedad
<b>GA<sub>3</sub></b>	Ácido giberélico
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente
<b>GTP</b>	guanosín trifosfato
<b>h</b>	hora
<b>IAA</b>	ácido indol acético
<b>IPTG</b>	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	kilobase
<b>La-0</b>	Landsberg 0
<b>La-er</b>	Landsberg erecta
<b>LB</b>	medio de cultivo Luria-Bertani
<b>m</b>	metro
<b>M</b>	molar
<b>Mb</b>	megabase
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mRNA</b>	ARN mensajero
<b>MCP</b>	Muerte Celular Programada
<b>MS</b>	medio de cultivo Murashige & Skoog
<b>MT</b>	microtúbulos
<b>ng</b>	nanogramo
<b>nm</b>	nanómetro
<b>OD</b>	densidad óptica

<b>ORF</b>	open reading frame (marco abierto de lectura)
<b>p/v</b>	ratio peso/volumen
<b>PAC</b>	paclobutrazol
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCS</b>	Pared Celular Secundaria
<b>qRT-PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>s</b>	segundo
<b>SAM</b>	shoot apical meristem (meristemo apical del tallo)
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>Spd</b>	espermidina
<b>SPDS</b>	espermidina sintasa
<b>Spm</b>	espermina
<b>SPMS</b>	espermina sintasa
<b>SSC</b>	cloruro sódico + citrato sódico
<b>Tm</b>	temperatura de semihibridación
<b>tRNA</b>	ARN de transferencia
<b>tSpm</b>	termoespermina
<b>tSPMS</b>	termoespermina sintasa
<b>uORF</b>	upstream open reading frame (marco abierto de lectura aguas arriba)
<b>UTP</b>	uridina trifosfato
<b>UTR</b>	untranslated region (región no traducible)
<b>V</b>	ratio volumen/volumen
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b><math>\mu</math>g</b>	microgramo
<b><math>\mu</math>l</b>	microlitro
<b><math>\mu</math>m</b>	micrómetro
<b><i>Z. elegans</i></b>	<i>Zinnia elegans</i>





# ***1. INTRODUCCIÓN***



El sistema vascular cumple dos funciones básicas en plantas, una es la distribución de recursos como agua, nutrientes minerales, azúcares y aminoácidos a varios tejidos de los órganos vegetales, y la otra es el soporte de tipo mecánico. Adicionalmente la vasculatura sirve como sistema de efectiva comunicación a larga distancia, con el xilema y floema como conectores de la información relacionada con las condiciones bióticas y abióticas dadas tanto dentro como fuera del suelo respectivamente. Esta combinación de suplemento de recursos y entrega de información incluida en hormonas, proteínas y ARN permite al sistema vascular coordinar diferentes tipos de procesos físicos y del desarrollo a nivel de todos los órganos de la planta.

Evolutivamente el éxito de los organismos vegetales en la colonización de innumerables tipos de hábitat a lo largo de la superficie terrestre se debe al paso de estructuras unicelulares a multicelulares lo que genera una ventaja en lo referente a división de procesos tales como la especialización funcional de tejidos y órganos que permiten acceder y competir de una manera más efectiva a los recursos esenciales presentes en los ambientes acuáticos y terrestres. El posicionamiento de órganos en ambas zonas fue de gran importancia para desarrollar sus sistemas autotróficos. En concreto, para una adecuada eficiencia fotosintética se hacen necesarios elementos como luz y CO<sub>2</sub> presentes en el medio aéreo y tanto agua como minerales disponibles en el suelo. Así órganos aéreos y terrestres se convirtieron en estructuras interdependientes que estuvieron sujetas a una fuerte presión de selección y permitieron desarrollar organismos con acceso a un alto espectro de recursos esenciales para la conservación y el crecimiento celular (Lucas W. J. 2013).

### **1.1 El tejido vascular**

El sistema vascular vegetal está compuesto por tres elementos; xilema, floema y el procambium/cambium. El xilema es un tejido que sirve como conductor de agua y

está compuesto de elementos de tipo vaso llamados elementos traqueales, además de fibras y otras células de tipo metabólico llamadas parénquima. El floema es un tejido conductor de nutrientes compuesto de células de tipo criboso y células acompañantes. El procambium es un tejido meristemático el cual da origen tanto al xilema como al floema. El conjunto de células del xilema junto con las del floema separadas por filas de células de procambium es lo que se denomina haz vascular. Un gran número de plantas, en particular las especies de tipo leñoso presentan un crecimiento de tipo secundario que consiste en la ampliación radial del tallo y raíz dirigida por divisiones celulares provenientes del cambium cuya naturaleza meristemática se establece postembrionicamente.

### **1.2 Formación del tejido vascular**

Después de la fertilización, el cigoto se divide tres veces de manera isodiamétrica. Luego al alcanzar la fase globular un grupo de células de la zona inferior empieza a proliferar diferencialmente con respecto a la capa de células superior generando células de tipo elongado en la zona media inferior del embrión (Hardtke and Berleth 1998). Estas células elongadas se convertirán en las células del procambium las cuales se extenderán en la dirección apical hacia los futuros cotiledones del embrión en el estadio tipo corazón temprano y crearán una red simple de precursores vasculares. En algunas especies, tanto el xilema como el floema comienzan a diferenciarse a partir del procambium en embriones ya maduros, mientras que en otras la diferenciación solo comienza luego de que la semilla germina (Esau 1965, Sundberg 1983).

Aunque el tejido vascular se encuentra conectado postembrionicamente en el cuerpo vegetal, su organización es distintiva en cada órgano, en la raíz la vasculatura forma una estructura cilíndrica la cual está consecutivamente rodeada por los tejidos radiales, periciclo, endodermis, córtex y epidermis. El xilema se desarrolla en el centro del cilindro vascular y se expande hacia el periciclo cuyas

franjas de células alternan con las del floema. Esta organización tiende a ser única entre diferentes especies.

Tanto la especificación como la diferenciación de los tipos celulares del xilema en la raíz son procesos regulados temporal y espacialmente. Aunque las células precursoras del xilema se establecen en el meristemo radicular, su diferenciación no comienza hasta la fase donde las raíces elongan activamente y desarrollan pelos en la epidermis.

Los precursores de las células xilemáticas ubicadas en la periferia del eje xilemático se diferencian más temprano que aquellas de las capas más internas y se denominan protoxilema con paredes celulares secundarias de patrón espiral. En contraste, los precursores de células xilemáticas en las capas más internas se diferencian en metaxilema con paredes celulares secundarias de patrón reticulado o punteado (Figura 1). El desarrollo del floema en el meristemo radicular comienza con la división asimétrica celular de las células iniciales del floema, las cuales forman células cribosas floemáticas y células acompañantes. Tanto el xilema como el floema siempre se desarrollan en paralelo a lo largo de los bordes de las células meristemáticas vasculares del procambium/cambium.

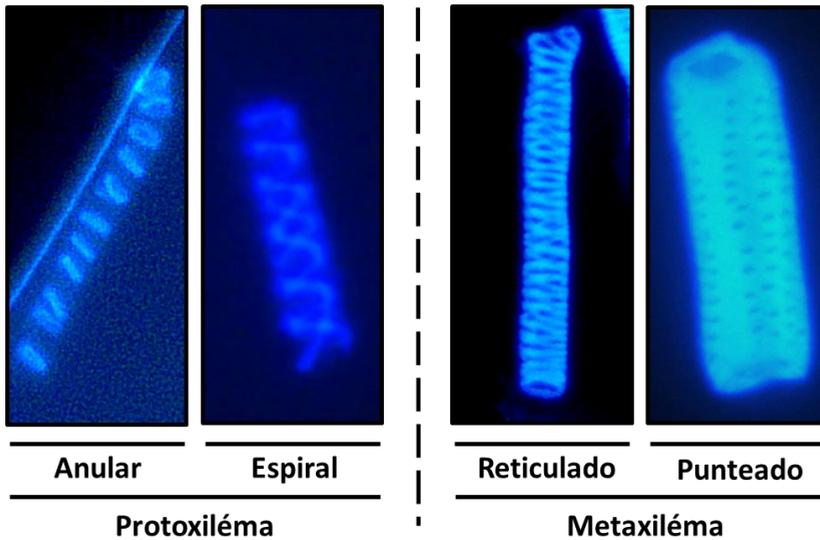


Figura1. Tipos celulares del xilema de *Arabidopsis* según su grado de maduración.

A diferencia de los tejidos vasculares de la raíz los cuales se organizan en una estructura cilíndrica, los de tallo se organizan colateral o bi-colateralmente según la especie. Por lo tanto, en la zona de transición que conecta el tallo con la raíz, se debe producir una reorganización de las franjas tanto del xilema como del floema. Caracterizaciones anatómicas muestran que dichas franjas en el cilindro vascular radicular se bifurcan en el área del hipocótilo para reorganizarse en el tallo y hojas (Busse & Evert 1999b).

En tallos y hojas con haces vasculares colaterales, el xilema se establece en las regiones adaxiales (próximo al meristemo) y el floema en las regiones abaxiales (lejos del meristemo). En tallos y hojas con haces vasculares de tipo bi-colateral el floema se forma tanto hacia afuera como hacia adentro del xilema. A medida que la planta crece apicalmente, los órganos laterales continúan desarrollándose a partir del meristemo apical del tallo (SAM). Conforme los órganos laterales emergen, los tejidos vasculares crecen hacia los primordios de los órganos y se ramifican en direcciones tanto apicales como laterales para formar las nervaduras

y venaciones. La organización temporal y espacial de estas venaciones es diversa y única para cada linaje de plantas (Nelson *et al.* 1997).

La mayoría de plantas vasculares crecen en dirección tanto apical como radial. El crecimiento radial o crecimiento secundario en tallos y raíz está promovido por la activa proliferación de las células vasculares en el cambium. En la raíz el procambium del periciclo deriva en cambium, en el tallo en cambium fascicular y en células que se encuentran entre los haces vasculares (cambium interfascicular).

De todas las células generadas en el cambium, solo aquellas ubicadas en la zona más distal del mismo se diferencian en células vasculares, aquellas localizadas en el centro de los tallos y raíces se diferencian en xilema, y aquellas células localizadas en la periferia de los tallos y raíces se diferencian en floema. Esta división celular asimétrica y diferencial ayuda a mantener la población de células meristemáticas pluripotentes en el cambium y la organización polar del xilema y floema. Aunque la actividad de división celular en el cambium es más pronunciada en especies vegetales perennes, también se da en plantas herbáceas, el único caso excepcional son las monocotiledóneas (Baum, Dubrovsky *et al.* 2002).

### **1.3 Desarrollo de los elementos del xilema**

La formación de las células del xilema es uno de los aspectos más estudiados de la diferenciación celular en plantas. Parte del interés se ha dirigido por la importancia económica del xilema como el mayor constituyente de la madera y cultivos de tipo forraje.

El xilema está compuesto de varios tipos celulares, pero las células altamente especializadas en tejido conductor conocidas como traqueidas o vasos, han sido las más intensamente estudiadas. Colectivamente estos dos tipos celulares son frecuentemente conocidos como elementos traqueales (ET) y han sido estudiados para analizar varios aspectos de la diferenciación celular los cuales incluyen la

muerte celular programada (MCP), polaridad, patrón de deposición de la pared celular, y el papel del citoesqueleto.

Los ET se caracterizan por su patrón de formación de la pared celular secundaria la cual se da en las zonas laterales de la célula. Esta pared celular secundaria es esencial para regular las presiones negativas generadas en el xilema durante la transpiración. Las fases finales de la diferenciación se caracterizan por una muerte celular programada, proceso por el cual se remueve el contenido celular y se obtiene una celular vacía lo que se conoce como cuerpo funcional. Los ET maduros se conectan en los extremos mediante zonas de perforación y forman un tubo especializado para el flujo de agua, proceso en el cual la comunicación entre células adyacentes es claramente vital. (Figura 2).

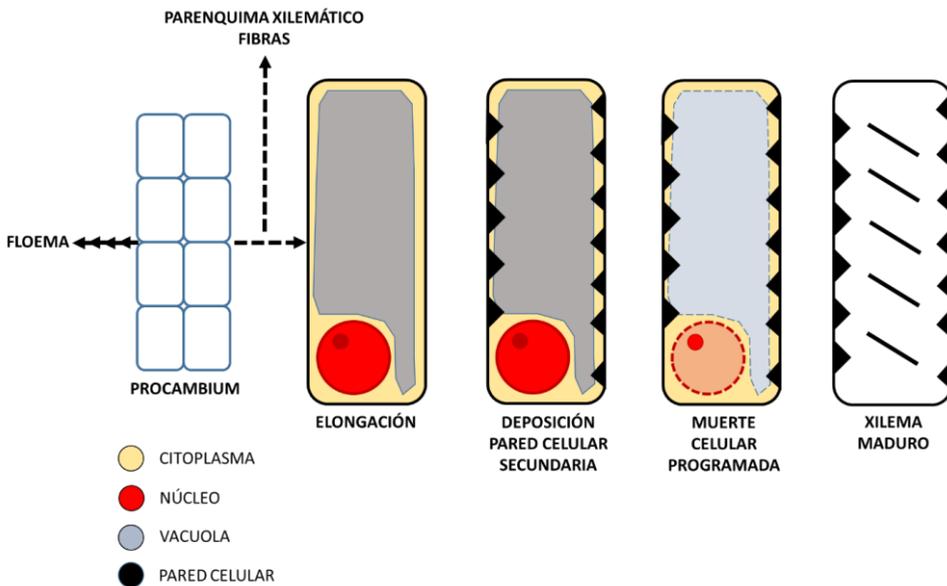


Figura 2. Diferenciación de los elementos traqueales del xilema. Adaptado de Turner et al. (2007).

#### 1.4 Cambios celulares en el desarrollo vascular

Las células xilemáticas exhiben un patrón de deposición de pared celular secundaria muy característico y relacionado con el patrón de distribución de los microtúbulos (MTs). Se ha visto que las bandas de MT en elementos traqueales en desarrollo no solo marcan el sitio de depósito de celulosa en las paredes celulares secundarias (PCS) sino también el sitio de deposición de otros componentes de la pared celular tales como lignina, hemicelulosa y proteínas (Hogetsu 1991). Tanto los complejos de celulosa sintasa y hemicelulosa al parecer son transportados por vesículas del complejo de Golgi que deben ser llevados a regiones específicas de la membrana plasmática. Más tarde otros componentes de la pared celular como la lignina serán incorporados en la pared de una manera localizada.

Durante el desarrollo de los vasos, la deposición de PCS se debe excluir de los extremos de las células debido a que allí se forman los platos de perforación. Esto refleja la polaridad del citoesqueleto y como consecuencia se restringe la formación de bandas de los MTs a las paredes laterales y se excluyen de los extremos (Turner, Gallois et al. 2007).

Se ha confirmado por análisis celulares *in vivo* que el patrón de bandas inicial de los MTs forma ramificaciones complejas que se aprecian en células xilemáticas de tipo reticulado y punteado (Oda, Mimura et al. 2005). Algunos trabajos sugieren la importancia de los cambios transcripcionales en el patrón de distribución de los MTs en el desarrollo de los TEs. Kubo y colaboradores (Kubo, Udagawa et al. 2005) usando cultivos xilogénicos de *Arabidopsis* identificaron una familia de siete factores de transcripción tipo NAC, que incluyen *VND6* y *VND7*, que se expresan durante la diferenciación de los TEs. Plantas *35S:VND6* desarrollan ectópicamente células de tipo reticulado y punteado características de metaxilema, mientras que plantas *35S:VND7* generan ectópicamente células de tipo espiral y anular propias de protoxilema. Esto indica que estos dos factores de transcripción

independientemente regulan aspectos del desarrollo del protoxilema y metaxilema.

Estudios en *Arabidopsis* han demostrado que tres proteínas celulosa sintasas (*CESA*) [*IRREGULAR XYLEM (IRX)1*, *IRX3*, and *IRX5*] son necesarias para la síntesis de celulosa en las PCS (Taylor, Howells et al. 2003). Al parecer esta organización es conservada en *Arabidopsis*, arroz y varias especies leñosas. *IRX1*, *IRX3*, e *IRX5* inicialmente co-localizan dentro de la célula y las bandas de MTs preceden su localización a la membrana plasmática. En los estadios finales del desarrollo de los TEs las tres proteínas co-localizan en la membrana plasmática con las bandas de los MTs (Gardiner, Taylor et al. 2003), lo que concuerda con trabajos donde por microscopía electrónica localizan los complejos de celulosa sintasa hacia las regiones de engrosamiento de las PCS (Turner, Gallois et al. 2007). La ausencia de una sola de las proteínas IRX ocasiona que las unidades restantes se retengan dentro de la célula probablemente por la imposibilidad de formar un complejo de celulosa sintasa intacto. Aun así la organización de los MTs permanece intacta (Gardiner, Taylor et al. 2003).

La lignina es un polímero fenólico complejo esencial para la estructura de la PCS y se genera por el entrecruzamiento oxidativo de monolignoles. La lignificación posee una estrecha relación entre vasos y el parénquima xilemático circundante. Según datos obtenidos de experimentos en *zinnia* la lignificación procede luego de la muerte celular programada. Los TEs pueden usar monolignoles o dilignoles aportados por todas células al medio y estos son incorporados en las paredes celulares de los TEs que han desarrollado muerte celular [(Hosokawa, Suzuki et al. 2001) (Tokunaga, Sakakibara et al. 2005)].

Durante la MCP las paredes celulares que conectan células adyacentes son eliminadas para formar zonas de perforación mientras que áreas de la pared celular que no han sido cubiertas por las PCS son extensamente modificadas. Esto es

particular del protoxilema en donde las regiones de deposición de la PCS están bien espaciadas. En el protoxilema, los vasos encaran un problema particular para mantener la integridad necesaria para el transporte de agua, mientras son pasivamente presionadas por la elongación de la planta en crecimiento. Durante la muerte celular muchos de los componentes de la pared celular primaria son digeridos quedando solo los microfilamentos de celulosa y un material denso electrónicamente denominado como proteínas ricas en lisina (GRPs) que estabilizan la pared celular primaria hidrolizada permitiendo el transporte de agua en el protoxilema durante el crecimiento vegetal (Ringli, Keller et al. 2001).

Adicionalmente a *VND6* y *VND7* descritos anteriormente, existe otro factor de transcripción de tipo NAC que al parecer posee un papel en la regulación de la deposición de la PCS llamado *NST1* el cual pertenece a una subfamilia de los NAC diferente a la de los genes *VND* y cuya sobreexpresión resulta en la formación de PCS ectópica (Mitsuda, Seki et al. 2005). En la epidermis la sobreexpresión de *NST1* resulta en las paredes celulares propias de los TEs, mientras que no sucede lo mismo cuando se sobreexpresa en células del mesófilo y otros tipos celulares, sugiriendo que *NST1* regula la deposición de la pared celular de una forma independiente a el patrón de pared celular (Mitsuda, Seki et al. 2005).

La muerte celular programada ocurre entre células vivas en un patrón predecible que indica la regulación por parte de un programa del desarrollo. Es un proceso activo por medio del cual una célula de tipo traqueal regula genes que disparan su destrucción (Kuriyama 1999). La característica más notable de la muerte celular del xilema es el colapso de la vacuola que coincide con la digestión del núcleo (Fukuda 1996). El colapso vacuolar activa o libera enzimas hidrolíticas incluyendo proteasas (Funk, Kositsup et al. 2002), ADNasas (Ito and Fukuda 2002) y ARNsas (Lehmann, Hause et al. 2001), dentro de la célula, algunas de las cuales causan su degradación.

Algunas enzimas hidrolíticas detectadas pueden ser citosólicas y activadas por la acidificación del citosol como consecuencia del colapso vacuolar.

### **1.5 Factores hormonales que afectan la diferenciación xilemática**

Mutantes que presentan un bloqueo en la señalización por auxinas han permitido demostrar el papel esencial de estas hormonas en los primeros estadios del patrón vascular donde las células del procambium se desarrollan (Birnbaum, Shasha et al. 2003) (Sieburth and Deyholos 2006). Al menos 8 genes de la familia de genes *Auxina/ácido-3-indolacético (AUX/IAA)* se expresan durante el desarrollo secundario de *Populus*. La expresión de algunos está específicamente correlacionada con los altos niveles de auxina en las células en división del cambium y las células madre del xilema, donde las auxinas deben ser requeridas para mantener la población de células en división. En contraste alguno de los genes *Aux/IAA* se expresan en xilema maduro donde probablemente tendrá un papel en las fases finales del desarrollo del xilema y responderá a niveles bajos de auxina (Moyle, Schrader et al. 2002). Se ha propuesto que las auxinas actúan como morfógeno para definir el destino de distintos tejidos. En este modelo las concentraciones de auxina se traducen como información posicional vía genes *Aux/IAA*, y la expresión individual de estos está regulada por diferentes concentraciones de auxina. Consecuentemente, la expresión de genes *Aux/IAA* en el meristemo cambial donde la concentración de auxinas es alta contribuiría a mantener la población de células cambiales, mientras que otros genes *Aux/IAA* que se expresan a bajas concentraciones de auxina facilitan los últimos estadios del desarrollo del xilema (Bhalerao and Bennett 2003).

Los mutantes de *Arabidopsis wooden leg (wol)* contienen menos capas celulares en el cilindro vascular de la raíz primaria y todas las células se diferencian en xilema. *wol* es alélico a *cre1*, un receptor de citoquininas (Inoue, Higuchi et al. 2001). La ruta de señalización por citoquininas actúa a través de los miembros de la familia

*ARR (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR)* que actúan aguas abajo del receptor. La sobreexpresión de uno de estos ARR resulta en un cilindro vascular de la raíz primaria compuesta exclusivamente de xilema fenocopiando al mutante *wol* (Kiba, Aoki et al. 2004). De igual manera la sobreexpresión de una citoquinina oxidasa ocasiona la disminución de la concentración de la hormona específicamente en el procambium fenocopiando la mutación *wol* y aportando evidencia de su papel esencial en la conservación de las células del procambium previniendo su diferenciación a xilema (Mahonen, Bishopp et al. 2006). Si se bloquea la señal por citoquininas como en el caso del mutante *wol* o el triple mutante para el receptor de citoquininas *ahk2 ahk3 ahk4 (Arabidopsis histidine kinase)*, o si sus niveles son reducidos como en el caso de plantas que sobre expresan una citoquinina oxidasa, el efecto es siempre un incremento en el número de filas de células de protoxilema y la pérdida de otros tipos celulares en la vasculatura de la raíz [(Bishopp, Lehesranta et al. 2011) (Bishopp, Help et al. 2011)].

La adición de uniconazol un inhibidor de la biosíntesis de brasinosteroides (BRs) y giberelinas (GAs) en el sistema de *Zinnia elegans* bloquea la transdiferenciación de los ET de una manera que puede ser revertida aplicando exógenamente las hormonas (Yamamoto, Demura et al. 1997). Consistente con la idea de que los BRs se requieren en los estadios finales de la diferenciación de los ET es la identificación de cinco BRs diferentes que se acumulan tanto en las células como en el medio de cultivo donde estas se diferencian (Yamamoto, Fujioka et al. 2001). Una confirmación independiente de este papel proviene del estudio en *Arabidopsis* de los mutantes defectivos en los genes de biosíntesis *CPD*, *DWF7* y *DET2*. Los mutantes *cdp* y *dwarf7* poseen menos haces vasculares, con la misma cantidad de floema que el tipo silvestre pero con el xilema reducido mientras que *det2* tiene más floema por haz vascular a expensas del xilema (Choe, Noguchi et al. 1999).

*BRI1* codifica una proteína de membrana plasmática que actúa como receptor de BRs. Los mutantes *bri1* exhiben un fenotipo similar a los mutantes de biosíntesis, con un incremento en el floema relativo al xilema, mientras que plantas sobre-expresantes de *BRI1* poseen un incremento en el xilema (Cano-Delgado, Yin et al. 2004). Otras tres proteínas *BRL1*, 2 y 3, se han identificado por su similaridad con *BRI1*. Tanto *BRL1* y *BRL3* pero no *BRL2* se unen a los BRs y pueden funcionar como receptores de BR. Los mutantes *brl1* poseen igualmente un defecto de aumento vascular. El mutante triple de *bri1 brl1 brl3* presenta una reducción en el tejido vascular tanto en xilema como floema. Estos resultados sugieren que en adición a promover el desarrollo xilemático a expensas del floema, los BRs también promueven la división celular en las células del procambium para proveer los precursores de las células vasculares (Cano-Delgado, Yin et al. 2004).

### **1.6 Papel de las giberelinas en el desarrollo vascular**

En varias especies la ruta de señalización por GAs ha sido implicada en la promoción de la xilogénesis en combinación con la señalización por auxinas, así como en la inducción de la diferenciación de las fibras (Digby and Wareing, 1966; Eriksson et al., 2000; Biemelt et al., 2004; Mauriat and Moritz, 2009; Dayan et al., 2010). Sin embargo, en estos estudios las GAs también ejercieron un efecto promotor del crecimiento, sugiriendo que una elevada señalización por GAs puede inducir la producción xilemática a lo largo de todo el crecimiento a medida que la planta incrementa su tamaño. Un ejemplo de esto viene dado en arboles de *Populus* que sobre-expresan genes de biosíntesis de GAs los cuales producen más fibras totales que los arboles control (Eriksson et al., 2000).

En *Arabidopsis* se ha establecido que la transición hacia lo que es llamado expansión xilemática está inducida por la floración e involucra una señal móvil derivada del tallo (Sibout et al., 2008). Un estudio realizado previamente sugiere

que esta señal son las GAs, y que su señalización junto con *ERECTA (ER)* actúan localmente para regular la expansión del xilema (Ragni, Nieminen et al. 2011).

La aplicación de GAs a tallos decapitados que reducen el aporte de auxinas ocasiona la estimulación de la división celular en la zona cambial (Björklund et al., 2007). Sin embargo la identidad de las células formadas por medio de las divisiones inducidas por GAs se caracterizó por tener un aspecto más esférico que las células planas y con paredes celulares delgadas que en el cambium no tratado. Más aun, estas células fallaron en su diferenciación a células xilemáticas y en cambio preservaron su fenotipo parenquimático. Cuando se aplicó GAs más auxinas, tanto las divisiones de las células del cambium y la diferenciación xilemática se estimuló llegando a la conclusión que la señalización por GAs tiene un papel en la inducción de las divisiones de las células cambiales pero funciona junto con las auxinas en promover la diferenciación del xilema. Esta idea encaja con una investigación en donde se reportó concentraciones de GAs en tallos de *Populus* en los cuales se encontraron cantidades trazas en células en división del cambium activo, mientras que los niveles mas altos fueron detectados en células xilemáticas en diferenciación (Israelsson et al., 2005). Consistente con estos resultados, este estudio adicionalmente mostró una baja expresión de genes que codifican enzimas de biosíntesis y señalización de GAs en células cambiales en división y una alta expresión de ambos tipos de genes tanto en floema como xilema en diferenciación.

En contraste, un estudio reciente indica que los genes que codifican los receptores de GAs están expresados a un nivel alto tanto en floema como en células cambiales en división (Mauriat and Moritz, 2009). Al parecer, se hace necesario un adecuado análisis de los genes de biosíntesis y señalización de GAs a través de la zona cambial, hace falta determinar cuándo y dónde exactamente la señalización por GAs es activa en el crecimiento secundario. El sinergismo observado entre la aplicación de GAs y auxinas en *Populus* parece estar acompañado por un incremento en la

concentración de auxinas en tejidos del tallo. Combinado con el hallazgo de que el tratamiento con GAs induce la expresión de un gen de flujo de auxinas en el cambium, estos resultados indican que la acción de las GAs puede promover el transporte de auxinas (Björklund et al., 2007). Recíprocamente el tratamiento con auxinas estimuló la expresión de genes de biosíntesis de GAs e inhibió la expresión de genes que codifican enzimas de degradación de las mismas (Björklund, Antti et al. 2007), sugiriendo una regulación por retroalimentación que promovería la actividad cambial.

De hecho, existen varios ejemplos en los que la ruta de GAs interacciona con la ruta de las auxinas. En uno de ellos, la señalización por auxinas en raíz induce la degradación de RGA (Fu and Harberd, 2003), por lo tanto promoviendo el crecimiento radicular, y se ha mostrado que las auxinas pueden promover la biosíntesis de GAs (Frigerio et al., 2006). Sin embargo la relación entre GAs y auxinas parece ser más compleja y específica de contexto. En el meristemo radicular por ejemplo, mientras que las auxinas inducen la degradación de RGA, la señalización de GAs a su vez disminuye la señalización y el transporte de auxinas a través de muchos pasos que involucran componentes de señalización de otra hormona vegetal, las citoquininas (Moubayidin et al., 2010).

Según *Ragni et al.* (Ragni, Nieminen et al. 2011), el efecto estimulador de las GAs no parece depender del transporte o señalización de auxinas lo que apunta a que las auxinas son indispensables para el desarrollo vascular (Berleth et al., 2000), pero no un factor limitante para la observada aceleración cuantitativa de la xilogénesis.

Previos estudios que consistieron en la aplicación externa de GAs marcadas, han sugerido que las GAs tienen la capacidad de moverse dentro de la planta. Por ejemplo, tanto en *Populus* como en *Arabidopsis* se pudo observar que las GAs aplicadas fueron transportadas desde las hojas hacia las zonas del tallo (Eriksson et al., 2006; Björklund et al., 2007), mientras que en tallos de *Pisum sativum* este

movimiento se realizaba hacia las zonas apicales demostrado mediante complementación implementando técnicas de micro-injertación combinando estructuras mutantes con las del genotipo silvestre (Proebsting et al., 1992). En *Arabidopsis* experimentos de micro-injertación enfrentando al mutante *ga1-3* vs el genotipo silvestre confirmaron esta hipótesis (Ragni, Nieminen et al. 2011). Esta misma investigación también demostró que las GAs endógenas son capaces de moverse dentro de la planta tanto en direcciones acropétalas como basipétalas debido a que la producción de GAs tanto en tallo como raíz era suficiente para compensar la biosíntesis bloqueada tanto en las estructuras donantes como patrón injertadas. Este hallazgo es resaltado en el hecho en que los tallos del mutante *ga1-3* al ser injertados con patrones silvestres enraizados rescataban el fenotipo aunque con un retraso de dos semanas con respecto a otro tipo de microinjertos al parecer debido a que la ausencia en el suplemento de GAs por parte de las zonas aéreas hacia la raíz causa una disminución en la inhibición por retroalimentación de la biosíntesis de GAs en la raíz por lo tanto elevando su capacidad de exportación. Estos experimentos también sugieren que en un genotipo silvestre las GAs en si misma son la señal de tipo móvil derivada de las zonas aéreas de la planta y que son transportadas a la zona cambial del hipocótilo luego de la iniciación de la floración para disparar la expansión xilemática.

Esta idea es consistente con la regulación por retroalimentación de los niveles de GAs en el ápice caulinar tras la inducción de la floración (Eriksson et al., 2006). En particular, la concentración de GAs se incrementa dramáticamente incluso antes de la iniciación floral y mantiene niveles constantes en adelante (Eriksson et al., 2006). Combinado con la inducción de la enzima del último paso de biosíntesis de GAs GA3ox1 en el tallo, esto sugiere que las GAs pueden disparar inicialmente la expansión del xilema. En un contexto ontogénico, esta secuencia de eventos tendría sentido: se incrementa la capacidad de transporte de agua del hipocótilo

en anticipación a un sustancial incremento del peso asociado con la formación de la inflorescencia.

### 1.7 Ruta de señalización por giberelinas

Las proteínas DELLA hacen parte de un subconjunto de la familia de potenciales factores de transcripción específicos de plantas llamada GRAS y actúan como represores de la respuesta a GAs [(Peng, Carol et al. 1997) (Silverstone, Ciampaglio et al. 1998) (Ogawa, Kusano et al. 2000) (Ikeda, Ueguchi-Tanaka et al. 2001) (Chandler, Marion-Poll et al. 2002)]. Entre los procesos regulados por las DELLA están la germinación de la semilla, el crecimiento, la desetiología, respuestas gravitrópicas floración y fructificación [(Achard and Genschik 2009) ]. Consistente con su papel negativo en la vía, la completa supresión de DELLAs confiere a la planta un crecimiento y desarrollo independiente de la GAs [(Dill, Jung et al. 2001) (Cheng, Qin et al. 2004) (Tyler, Thomas et al. 2004)]. Como todas las proteínas tipo GRAS, las DELLA comparten un dominio C-terminal GRAS que se encuentra involucrado en la regulación transcripcional y se caracteriza por poseer dos repeticiones de cremalleras de leucinas (LHRI y LHRII) y tres motivos conservados, VHIID, PFYRE y SAW (Bolle 2004). Las DELLA se distinguen del resto de miembros de la familia GRAS por tener una secuencia específica N-terminal que contiene dos dominios conservados: el dominio DELLA y el dominio TVHYNP (Figura 3A).

Estas proteínas están altamente conservadas entre diferentes especies vegetales como maíz, trigo, arroz y cebada [(Peng, Carol et al. 1997) (Ikeda, Ueguchi-Tanaka et al. 2001) (Chandler, Marion-Poll et al. 2002)]. En el genoma de *Arabidopsis* se codifican cinco DELLAs; *GA-INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF ga1-3 (RGA)*, *RGA-LIKE1 (RGL1)*, *RGL2* y *RGL3* las cuales poseen papeles solapantes en la represión de la respuesta a GAs [(Peng, Carol et al. 1997) (Ikeda, Ueguchi-Tanaka et al. 2001) (Silverstone, Jung et al. 2001) (Lee, Cheng et al. 2002) (Wen and Chang 2002) (Tyler, Thomas et al. 2004)] pero con cierta especificidad hacia algunos procesos

concretos. *RGA* y *GAI* reprimen el crecimiento vegetativo y la inducción floral [(Dill, Jung et al. 2001) (King, Moritz et al. 2001)], *RGL2* inhibe la germinación de la semilla (Lee, Cheng et al. 2002), *RGA*, *RGL1* y *RGL2* juntos modulan el desarrollo floral [(Cheng, Qin et al. 2004) (Tyler, Thomas et al. 2004)], y *RGL3* contribuye al vigor vegetal durante estrés abiótico [(Achard, Renou et al. 2008) (Wild, Daviere et al. 2012)] (Figura 3B).

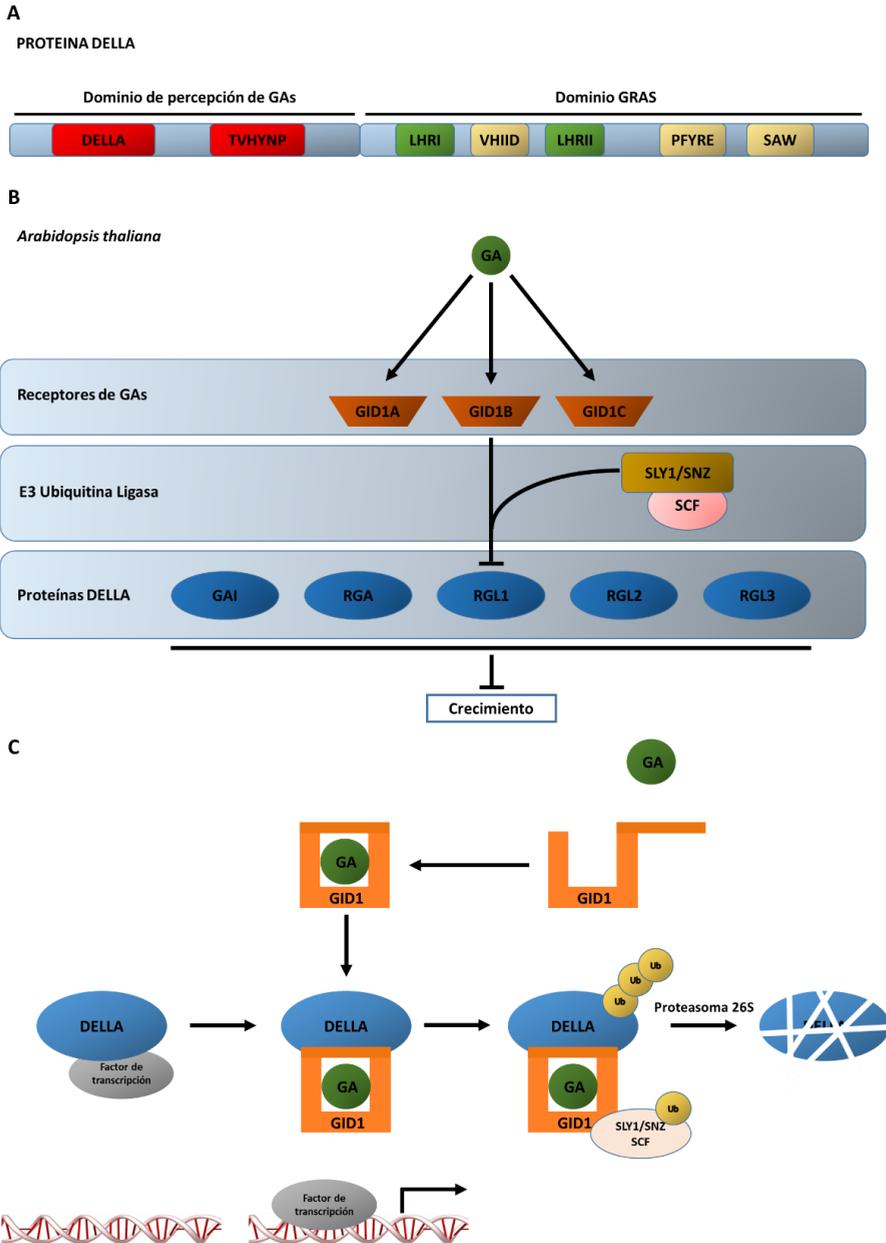
La señal de las GAs es percibida por el receptor *GID1* (Ueguchi-Tanaka, Ashikari et al. 2005). Mientras que en arroz solo existe un solo gen que codifica este receptor, en *Arabidopsis* hay tres ortólogos con funciones solapantes, *GID1a*, *GID1b* y *GID1c* (Nakajima, Shimada et al. 2006). Análisis de cristalografía han logrado plantear al modelo de actividad de este receptor [(Murase, Hirano et al. 2008) (Shimada, Ueguchi-Tanaka et al. 2008)]. *GID1* contiene una estructura similar a un bolsillo que sirve como lugar de unión de las GAs y adicionalmente presenta una extensión de tipo flexible N-terminal. Al unirse la GA bioactiva al bolsillo del receptor, el grupo C3-hidroxilo de la GA genera un puente de hidrogeno con el residuo Tyr31 de *GID1*, induciendo un cambio conformacional en la extensión N-terminal y cerrando así el bolsillo donde se encuentra la GA [(Murase, Hirano et al. 2008) (Shimada, Ueguchi-Tanaka et al. 2008)]. La cara superior de esta nueva estructura ahora es capaz de reconocer y unirse a las regiones DELLA y TVHYNP de las proteínas DELLA, generando el complejo *GA-GID1-DELLA* [(Griffiths, Murase et al. 2006) (Ueguchi-Tanaka, Nakajima et al. 2007) (Willige, Ghosh et al. 2007)] (Figura 3C).

Un segundo paso en este proceso de señalización involucra a las proteínas F-box de los complejos E3 ubiquitina ligasa SCF (*SKP1*, *CULLIN*, *F-BOX*) los cuales catalizan la unión de cadenas de poliubiquitinas a proteínas diana ocasionando su siguiente degradación por el proteosoma 26S (Lechner, Achard et al. 2006). Se ha propuesto que el complejo *GA-GID1-DELLA* induce cambios conformacionales en el dominio GRAS de la proteína DELLA y esto aumenta el reconocimiento de los motivos VHIID

y LHR1 de la DELLA por la proteína F-box SLY1/GID2 (Hirano, Asano et al. 2010). A su vez el complejo SCF<sup>SLY1/GID2</sup> promueve la poli-ubiquitinación y subsecuente destrucción de la DELLA por el proteosoma 26S (McGinnis, Thomas et al. 2003) (Sasaki, Itoh et al. 2003) (Dill, Thomas et al. 2004) (Fu, Richards et al. 2004). El esquema general consiste en que las GAs promueven sus respuestas fisiológicas mediante la desestabilización de las proteínas DELLA (Figura 3C). Se ha postulado recientemente que el efecto de las GAs sobre la degradación de las DELLA depende de un contexto específico a nivel celular para asegurar un adecuado desarrollo de los órganos. Por ejemplo, la endodermis es el tipo celular que presenta la respuesta primaria a GAs en la raíz (Ubeda-Tomas, Swarup et al. 2008).

En los últimos años se ha venido esclareciendo el mecanismo mediante el cual las proteínas DELLA conectan la señal hormonal con las respuestas transcriptómicas. Una característica que resalta de las DELLA es su habilidad para interactuar con diversas clases y tipos de proteínas reguladoras (Marin-de la Rosa, Sotillo et al. 2014). Ejemplos de esto incluyen la regulación de la elongación del hipocótilo mediante la interacción de la DELLA con los *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (PIFs) [(de Lucas, Daviere et al. 2008) (Feng, Martinez et al. 2008, Gallego-Bartolomé J. 2010)] y *BRASSINAZOLE RESISTANT1* (BZR1) [(Bai, Shang et al. 2012) (Gallego-Bartolomé J. 2012)], el control de la transición floral por su interacción con los factores *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE* (SPL) y *ALCATRAZ* (ALC) [(Yu, Galvao et al. 2012) (Arnaud, Girin et al. 2010)], la defensa ante patógenos a través de la interacción con las proteínas *JASMONATE ZIM-DOMAIN* (JAZ) [(Hou, Lee et al. 2010) (Yang, Yao et al. 2012) (Wild, Daviere et al. 2012)]. A través de estas interacciones las DELLA bloquean la capacidad de unión al ADN de los factores de transcripción como en el caso de los PIFs, o inhiben la actividad de reguladores transcripcionales como los JAZs. A través de este mecanismo la señal por GAs controla la expresión de un gran número de genes diana los cuales funcionan en distintas rutas desencadenando las respuestas fisiológicas.

Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se han enriquecido fracciones de regiones promotoras de genes diana asociados a DELLA [(Zentella, Zhang et al. 2007), (Zhang, Ogawa et al. 2011), (Marín de la Rosa 2014)], estos datos asociados a la carencia de dominios de unión al ADN y a su naturaleza nuclear sugieren que la asociación de las DELLA con los promotores de sus genes diana podría involucrar factores adicionales.



**Figura 3. Esquema parcial que representa la ruta de señalización por giberelinas. A)** Las Proteínas DELLA comparten un dominio GRAS C-terminal que participa en la regulación transcripcional y un dominio en N-terminal responsable de la percepción del complejo GA-GID1. **B)** Cuatro grupos de elementos que componen la ruta de señalización de GAs en *Arabidopsis thaliana*; giberelinas, receptores GID1, el complejo E3 ubiquitina ligasa y las proteínas DELLA. **C)** Esquema que representa una de las formas de regulación (mecanismo por secuestro) de procesos del desarrollo mediante la degradación de las DELLA inducida por GAs. Basado en el esquema de Davière y Achard 2013.

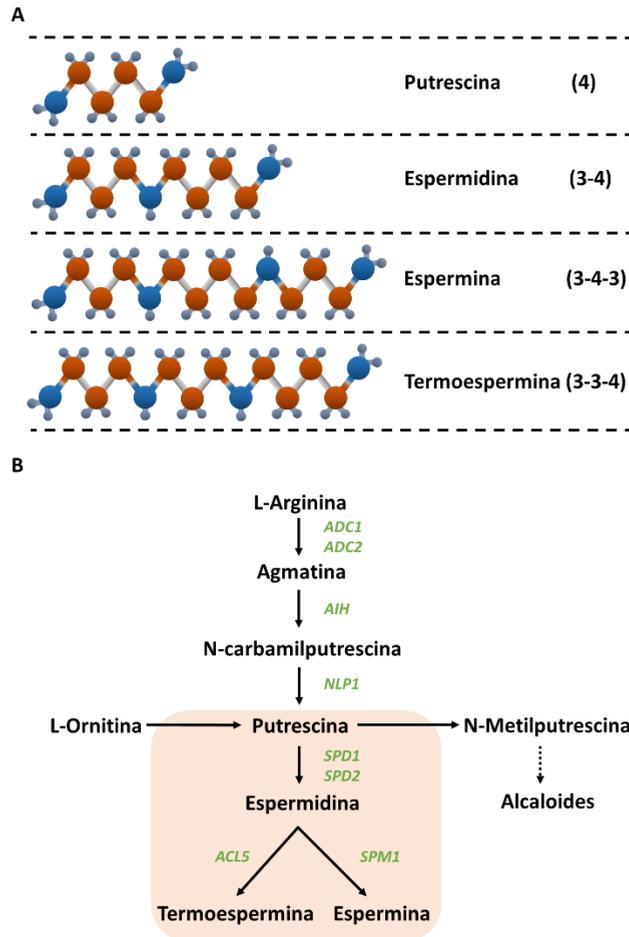
### 1.8 Papel de la termoespermina en el desarrollo vascular

Biologicamente se conoce como poliaminas a un grupo de compuestos alifáticos de bajo peso molecular que se caracterizan por tener tanto grupos amino primarios (-NH<sub>2</sub>) como secundarios (-NH). Las poliaminas con mayor presencia entre los organismos de los distintos reinos son; la putrescina, la espermidina y la espermina (Figura 4A). Existen en plantas y bacterias, otras poliaminas menos comunes, como la cadaverina, el diaminopropano o la termoespermina. La biosíntesis de las poliaminas se inicia con la descarboxilación de la L-ornitina para formar la diamina putrescina. En plantas y algunos procariontes existe una ruta alternativa que se inicia con la descarboxilación de la L-arginina para mediante reacciones posteriores dará origen a la putrescina. A partir de la putrescina se genera la espermidina, mediante la adición de un grupo aminopropilo a uno de los grupos amino. Las tetraminas alifáticas se sintetizan mediante la adición a la espermidina de otro grupo aminopropilo proveniente del AdoMet<sup>dc</sup>; según se produzca en un extremo u otro de la espermidina, se formarán dos tetraminas distintas: la tetramina simétrica espermina, cuya generación es catalizada por la espermina sintasa (SPMS), o su isómero asimétrico, la termoespermina, catalizada por la termoespermina sintasa (tSMPS) (Figura 4B).

Las poliaminas tales como la termoespermina y espermina están involucradas en una variedad de procesos fisiológicos que incluyen embriogénesis, crecimiento, maduración del fruto y respuestas a estrés en plantas [(Igarashi and Kashiwagi 2010) (Kusano, Yamaguchi et al. 2007) (Alcazar, Altabella et al. 2010)]. Las poliaminas tienen la capacidad de interactuar con ácidos nucleicos y membranas además de poder influenciar muchas reacciones enzimáticas. Se ha generado evidencia de como las poliaminas estabilizan la estructura de ciertos ARN, promueven la asociación con subunidades ribosomales y como pueden afectar la

tasa o la eficiencia de la elongación de los polipéptidos en formación (Igarashi and Kashiwagi 2011)

La termoespermina es un isómero estructural de la espermina y su diferencia radica en que la primera presenta una configuración de las cadenas carbonadas de tipo 3-3-4 mientras que la última posee uno de tipo 3-4-3. La termoespermina es producida a partir de la espermidina por la acción de la termoespermina sintasa que en *Arabidopsis* está codificada por el gen *ACAULIS5* (*ACL5*). Todos los alelos del mutante *acl5* se caracterizan por la ausencia en la síntesis de termoespermina y por presentar un fenotipo enano severo indicando la importancia de esta poliamina en la elongación de la planta (Takehi, Kuwashiro et al. 2008). Se ha visto que *ACL5* se expresa predominantemente durante la formación del xilema desde las células del procambium hasta los vasos diferenciados del xilema [(Clay and Nelson 2005), (Muniz, Minguet et al. 2008) y su ausencia genera una sobreproliferación de células de tipo xilema como se evidencia en el mutante *acl5* (Hanzawa, Takahashi et al. 1997). Su fenotipo enano se atribuye al exceso de diferenciación de células xilemáticas y al parecer la termoespermina actúa como un represor de la diferenciación de las mismas. La termoespermina se encuentra ampliamente distribuida a lo largo del reino vegetal, esto se basa en la presencia de ortólogos de *ACL5* en diferentes especies vegetales) [(Knott, Romer et al. 2007), (Minguet, Vera-Sirera et al. 2008), (Takano, Takehi et al. 2012)].

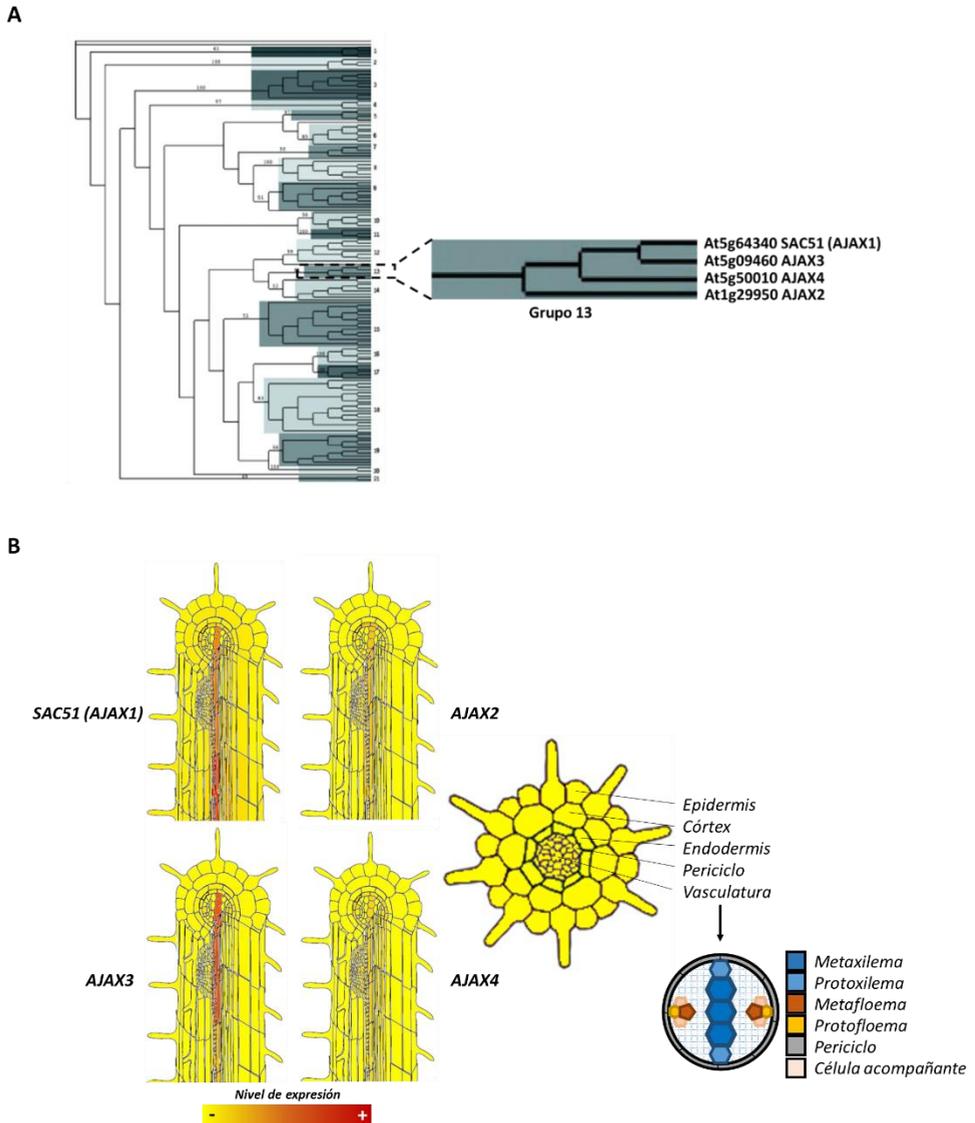


**Figura 4. Estructura y biosíntesis de las poliaminas en *Arabidopsis*** **A)** Estructura química de las principales poliaminas de interés biológico. En blanco se representan los átomos de hidrógeno, en gris átomos de carbono y en azul átomos de nitrógeno. Los números representan la configuración de las cadenas carbonadas **B)** Ruta de biosíntesis de poliaminas. En verde se destacan los genes identificados en *Arabidopsis* responsables de cada actividad.

Imai *et al* (Imai A. 2006) realizaron un rastreo en búsqueda de mutantes supresores del mutante *ac15* a los cuales denominaron SAC (*SUPRESOR OF ACAULISS*); uno de ellos, *SAC51*, resultó ser un gen que codifica una proteína de la familia de factores de transcripción tipo básico hélice-lazo-hélice (bHLH) que presenta como peculiaridad un pequeño marco de lectura abierta (uORF) ubicado en la región 5'

no traducida. La mutación *sac51* se localizó precisamente en el uORF, indicando que es importante para la regulación de SAC51.

En un trabajo paralelo realizado en nuestro laboratorio también se realizó una búsqueda de supresores extragénicos del mutante *ac15-4* (Vera-Sirera 2011). De los 40 supresores dominantes aislados, 11 de ellos presentaron mutaciones en la región uORF presente en cuatro genes pertenecientes a la misma familia de factores de transcripción bHLH a los que pertenece SAC51 y que se denominaron *AJAX*; *AJAX1* [At5g64340 descrito previamente como *SAC51* (Imai A. 2006)], *AJAX2* (At1g29950), *AJAX3* (At5g09460) y *AJAX4* (At5g50010). Estos cuatro genes se agrupan como la subfamilia número trece del grupo de factores de transcripción bHLH según la clasificación realizada por Toledo-Ortiz *et al* (Toledo-Ortiz G. 2003) Figura 4A. La característica más importante de este grupo de elementos es la ausencia de un dominio básico bien definido, lo que los convertiría realmente en proteínas HLH, que probablemente no unan ADN y que podrían regular procesos a través de su interacción física con otras proteínas.



**Figura 5. Clasificación y patrón de expresión hipotética de los genes AJAX. A)** Árbol filogenético que muestra en detalle la subfamilia número trece de las proteínas bHLH de *Arabidopsis thaliana* constituida por AJAX 1, 2, 3 y 4. (Toledo-Ortiz G. 2003). **B)** Patrón de expresión de los genes SAC51 (AJAX1), AJAX2, AJAX3 y AJAX4 en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Según la base de datos Arabidopsis eFP browser <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>. (Cartwright, Brady et al. 2009).

Las conclusiones que aportan ambos trabajos radican en que las mutaciones que suprimen el fenotipo enano de *ac15* se encuentran en las 5' uORF y que esto les otorga un carácter dominante lo que apunta a que la uORF ejerce un papel negativo sobre la traducción del marco de lectura (ORF) principal que codifica a las proteínas SAC51/AJAX. Las mutaciones anularían el posible efecto supresor permitiendo la correcta traducción de estos HLH.

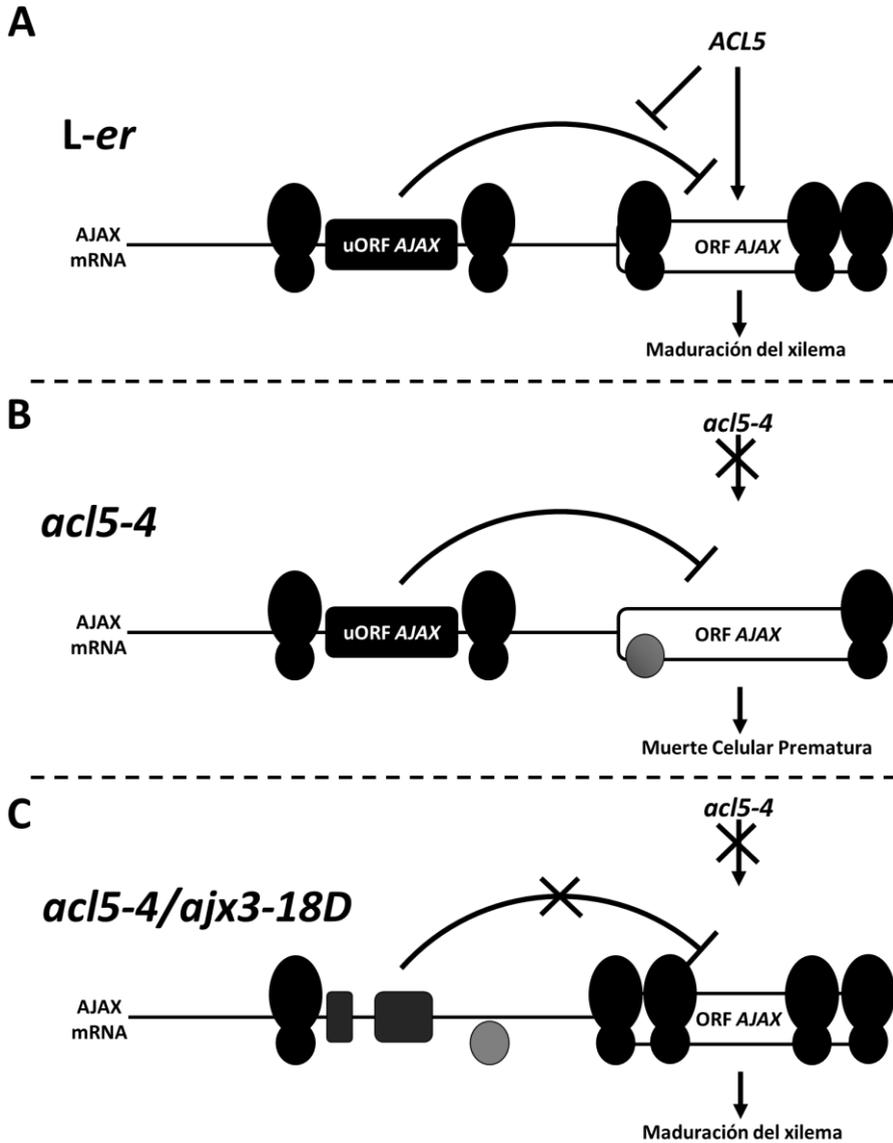
La hipótesis que se baraja es que en un contexto silvestre la termoespermina estaría inhibiendo la actividad de las secuencias 5' uORF, ya sea modulando algún tipo de estructura secundaria de esa zona del ARN mensajero o bloqueando la actividad del pequeño péptido codificado por esta secuencia, lo que resultaría en la correcta traducción de la ORF principal.

La expresión de varios genes vinculados a procesos de muerte celular programada que codifican proteínas tales como proteasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas, y genes del metabolismo de pared celular como hidrolasas, lacasas y celulosa sintasas están alterados en el mutante *ac15* (Tong, Yoshimoto et al. 2014). En particular, se evidenció que la expresión de estos genes se reprimía en el mutante *ac15* tratado con termoespermina y en una línea con expresión de *ACL5* inducible por calor (*HS::ACL5*) en fondo *ac15*. Todo esto apunta que la importancia de los SAC51/AJAX radicaría en la inhibición de los procesos de muerte celular que se podrían dar en fases tempranas de la formación de las células del xilema (protoxilema) permitiendo el adecuado crecimiento y formación de pared secundaria de las mismas para la generación de un tejido xilemático de tipo maduro (metaxilema) (Figura 6A).

En el mutante *ac15* la ausencia de síntesis de termoespermina impediría la adecuada traducción de los SAC51/AJAX y por lo tanto se desencadenarían procesos de PCD en fases tempranas del desarrollo del xilema generando células inmaduras que no tendrían las características estructurales necesarias para cumplir

funciones como transporte de agua y minerales, soporte mecánico y resistencia a las presiones negativas generadas por el intercambio gaseoso (Figura 6B).

Las mutaciones supresoras del genotipo *acl5* ocasionadas en las 5' uORF de los *SAC51/AJAX* como es el caso de *acl5-4 ajx3-18D* presentan un carácter dominante debido a que la correcta traducción de estos genes no es dependiente de la disponibilidad de termoespermina ya que la mutación inhibe la capacidad inhibitoria de la pequeña secuencia. Esto es suficiente para aliviar el fenotipo enano de *acl5* y recapitular el fenotipo silvestre (Figura 6C).



**Figura 6. Modelo del control traduccional mediado por uORF de la expresión de SAC51/AJAX a través de la función de ACL5. A)** Regulación por termoesperman en una planta silvicultural. **B)** Bloqueo del proceso de regulación en el mutante *acl5-4*. **C)** Restauración de la actividad de AJAX3 en el mutante supresor de *acl5-4*, *ajax3-18*. Los transcritos de AJAX se representan en líneas horizontales. Las cajas negras son las 5' uORF de los AJAX. Las cajas blancas la ORF principal de los AJAX. Los círculos grandes y pequeños negros representan las subunidades ribosomales 60S y 40S respectivamente.





## **2. OBJETIVOS**



Debido a la relevancia del papel previamente visto tanto de las GAs como de la tSpm en los procesos de formación del tejido vascular y a la interacción entre sus componentes principales de regulación, las proteínas DELLA y los AJAX obtenidos mediante un rastreo de doble híbrido en levadura. El objetivo perseguido durante la realización de esta tesis es:

- Determinar la relevancia biológica de la interacción DELLA-AJAX3 en el desarrollo del xilema *Arabidopsis thaliana*.



### **3. *RESULTADOS***



### 3.1 Las proteínas DELLA GAI y RGA interaccionan con las proteínas de tipo HLH AJAX

Para identificar el interactoma de factores de transcripción de la proteína *DELLA GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI)* se realizó en nuestro laboratorio un rastreo por doble híbrido en levadura de una genoteca ordenada compuesta por 1200 factores de transcripción de *A. thaliana* (Castrillo G. 2011) utilizando como cebo el dominio GRAS de la proteína *GAI (M5GAI)* (Marin-de la Rosa, Sotillo et al. 2014). Entre los 57 factores de transcripción identificados se encontró una proteína codificada por el gen At5g09460 previamente denominada como AtbHLH143 según la clasificación de Toledo-Ortiz (Toledo-Ortiz G. 2003), y que de aquí en adelante se denominará *AJAX3*. Este gen pertenece al grupo 13 de la familia bHLH junto con otros tres miembros: At5g64340 descrito como *SAC51* (Imai A. 2006), At1g29950 (bHLH 144) y At5g50010 (bHLH 145). En adelante denominaremos a estos genes como *AJAX1*, *AJAX2* y *AJAX4* respectivamente.

Para comprobar si la capacidad de interacción se extendía a otras proteínas DELLA y a los otros AJAX, se procedió a realizar ensayos de doble híbrido en levadura utilizando como cebo las versiones truncadas en el N-terminal (*M5GAI* y *RGA52*), y como presa los genes *AJAX*. Según este ensayo, *GAI* y *RGA* interaccionan con *AJAX1*, *AJAX3* y *AJAX4*, siendo en ambos casos la interacción más fuerte con estos dos últimos (Figura 7A).

Se ha visto que algunas proteínas bHLH tienen la capacidad de formar homodímeros o restringen su actividad de heterodimerización a miembros muy cercanos de la familia (Littlewood and Evan, 1998). El análisis de doble híbrido también evidenció que *AJAX3* tiene la capacidad de interaccionar consigo mismo y con otros dos miembros de su grupo, *AJAX2* y *AJAX4* (Figura 7B).

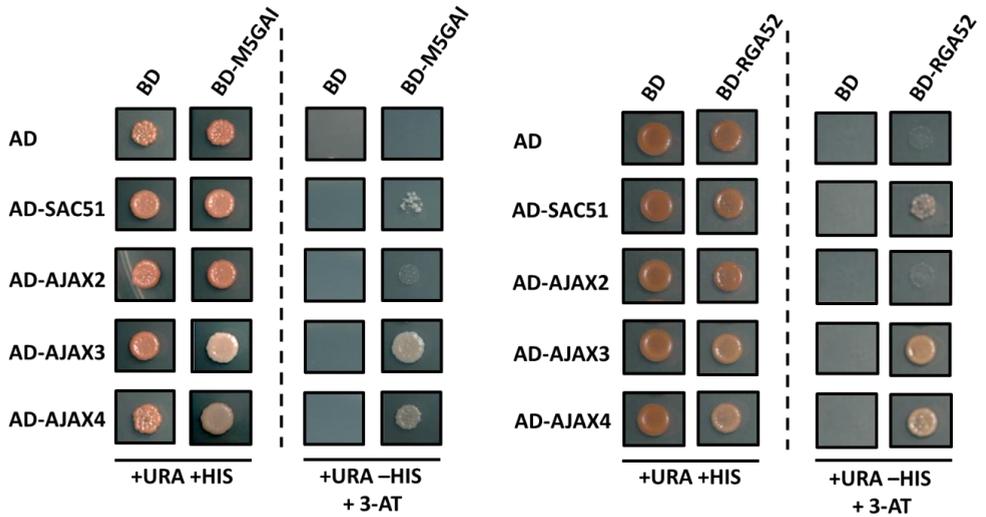
Debido a la fuerte interacción de las dos DELLA probadas con AJAX3 se decidió seguir trabajando con este AJAX en particular. Para confirmar que la interacción también ocurría en plantas se decidió realizar una co-inmunoprecipitación de proteínas en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello se introdujeron las secuencias codificantes de M5GAI y AJAX3 en los plásmidos pEarleyGate 203 y pEarleyGate 104 y conseguir de esta manera las fusiones traduccionales Myc-M5GAI y YFP-AJAX3, respectivamente. Una vez extraídas las proteínas estas se inmunoprecipitaron utilizando columnas con microbolas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-GFP y, las proteínas eluidas se analizaron por western blot. La proteína Myc-M5GAI se co-inmunoprecipitó eficientemente sólo de extractos procedentes de las hojas que expresaban además YFP-AJAX3 (Figura 7C). Estos resultados demuestran que las proteínas GAI y AJAX3 interaccionan físicamente in vivo, tanto en levadura como en planta.

Con el fin de obtener información mas detallada sobre los dominios implicados en la interacción se emplearon tres versiones truncadas de GAI previamente generadas en el laboratorio (Gallego-Bartolomé J. 2012). La delección de la primera repetición de leucinas (LHR1) denominada del1 fue suficiente para eliminar la interacción con AJAX3, mientras que le versión del3 (que incluye el dominio completo N-terminal DELLA y la región LHR1) sí interaccionó (Figura 7D). Este resultado sugiere que la región LHR1 es importante para para la interacción con AJAX3. Sin embargo, la interacción resultante fué más débil que utilizando la versión completa de la proteína. Esto sugiere que se necesita otra zona de la región C-terminal, probablemente para alcanzar un correcto plegamiento que facilite la interacción con AJAX3.

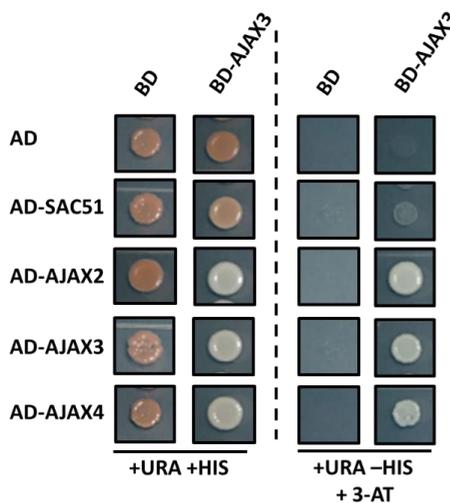
Para analizar el dominio de AJAX3 que interacciona con GAI se generaron tres versiones truncadas de la proteína: del2 ajax3 (aminoácidos 119-326) la cual elimina completamente la zona N-terminal, C-ter ajax3 que sólo posee el dominio

HLH (aminoácidos 226-236) y N-ter ajax3 (aminoácidos 1-226), la cual elimina sólo el dominio HLH. El análisis reveló que sólo la versión del2 ajax3 pudo interactuar, lo que significa que la región C-terminal que incluye el dominio HLH es necesaria para la interacción con GAI (Figura 7E).

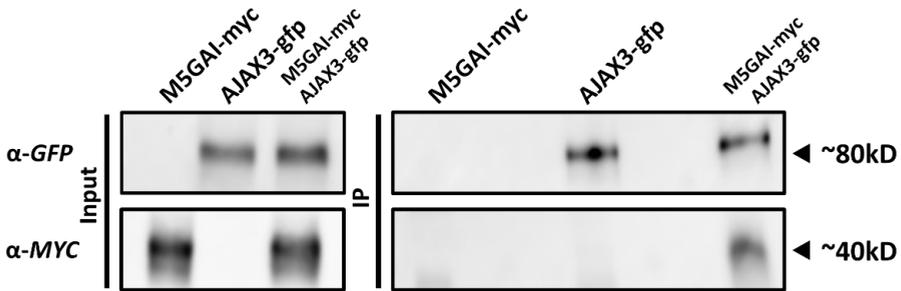
**A**



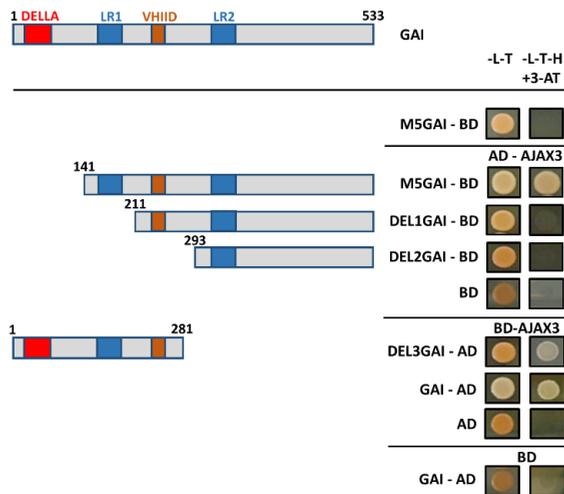
**B**



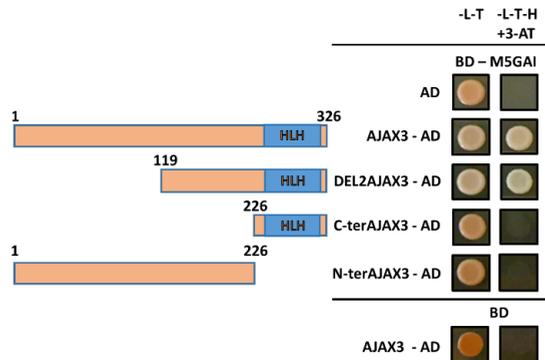
C



D



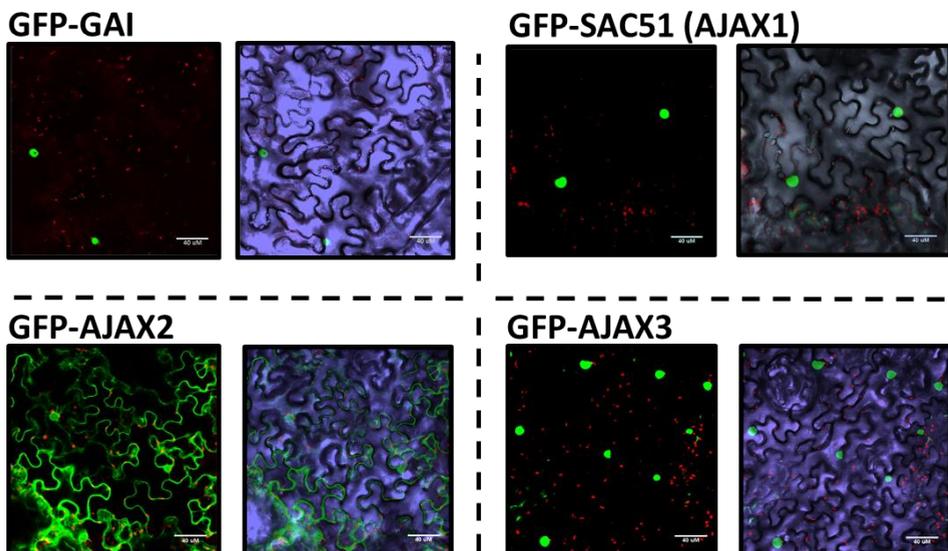
E



**Figura 7. Las proteínas DELLA interactúan con las proteínas AJAX.** **A)** Ensayo de doble híbrido en levadura analizando la interacción entre *M5GAI*, *RGA52* y *SAC52* (*AJAX1*), *AJAX2*, *AJAX3* y *AJAX4*. **B)** Co-inmunoprecipitación de proteínas en hojas de *Nicotiana benthamiana* expresando la fusión de *M5GAI* con la etiqueta *MYC* y la fusión *AJAX3* con la etiqueta *GFP*. **C)** Análisis de la interacción de *AJAX3* con distintas versiones truncadas de la proteína *GAI*. **D)** Análisis de la interacción de *GAI* con distintas versiones truncadas de *AJAX3*.

### 3.2 DELLA y AJAX co-localizan a nivel subcelular y tisular

Para analizar la co-localización a nivel subcelular, las secuencias codificantes de los genes *AJAX* y *GAI* se introdujeron en el vector *pEARLEY GATE 104* basado en el promotor 35S para generar una fusión traduccional con la proteína fluorescente amarilla YFP en el extremo N-terminal y se expresaron transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*. El análisis en el microscopio confocal mostró la presencia de *GAI*, *AJAX1* y *AJAX3* en el núcleo, mientras que *AJAX2* se detectó tanto en núcleo como citoplasma, no se logró detectar señal para *AJAX4* (Figura 8).

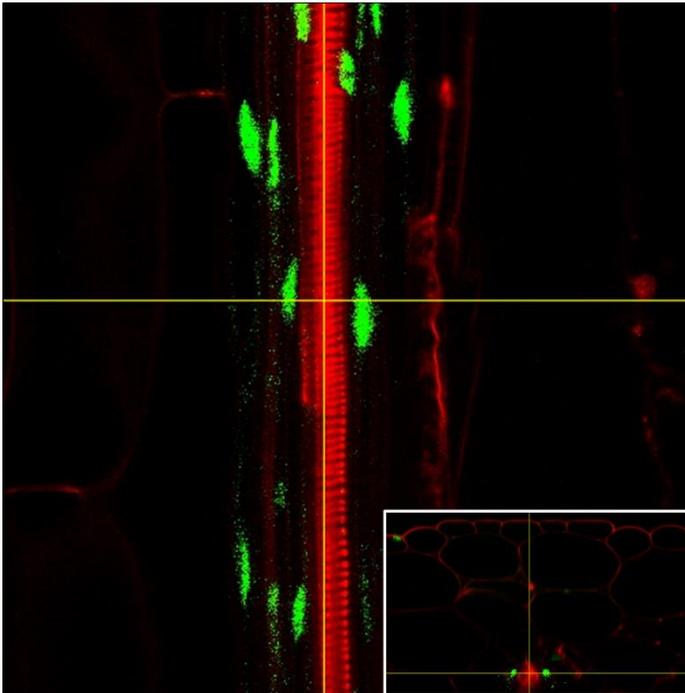


**Figura 8.** Localización subcelular de las proteínas *GAI*, *AJAX1*, *AJAX2* y *AJAX3* en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Imágenes de microscopía confocal que muestran la señal generada por las fusiones traduccionales de GFP con *GAI* y *AJAX1*, 2 y 3. Barra de escala = 40 µM.

El papel desempeñado por las GAs en el desarrollo vascular descrito previamente por distintos autores hace suponer que las proteínas DELLA pueden estar expresándose en este tipo de tejidos. Para comprobarlo se analizó el patrón de expresión de la línea de referencia *proRGA::GFP::RGA* (Silverstone, Jung et al. 2001) por microscopía confocal. Plántulas de 4 días germinadas en la oscuridad se

trataron con el inhibidor de la biosíntesis de giberelinas paclobutrazol (PAC) para propiciar la estabilización de la proteína RGA.

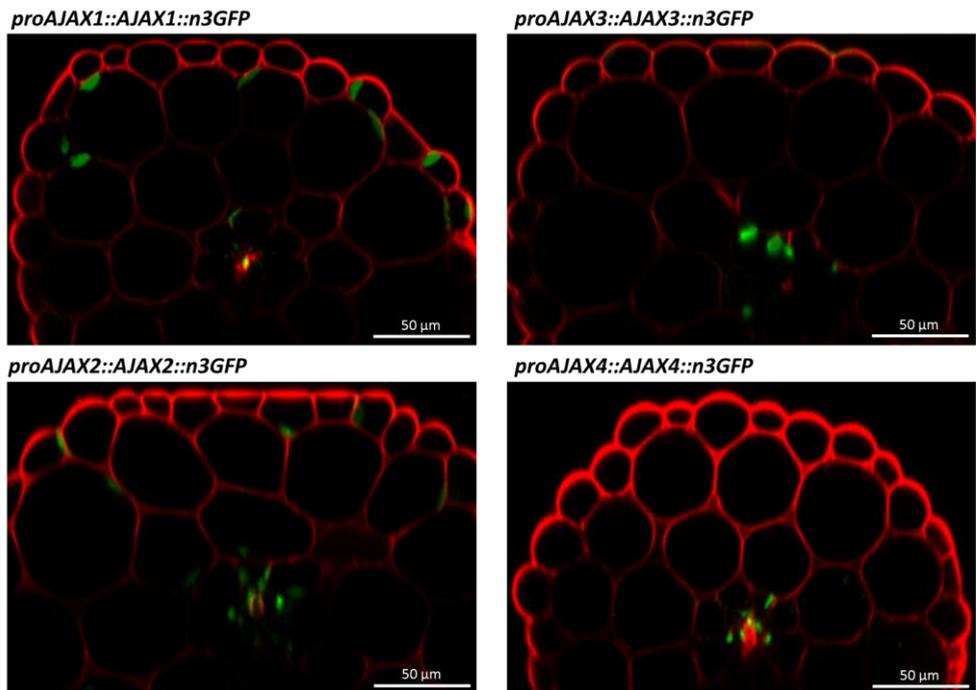
El análisis reveló la presencia de la proteína *RGA* en los núcleos de todas las capas de tejido del hipocótilo (epidermis, córtex, endodermis, periciclo y vasculatura) observándose adicionalmente señal en los núcleos de las células proximales del xilema (**Figura 9**).



**Figura 9.** Hipocotilos de plantas transgénicas (fondo *L-er*) que expresan la fusión *proRGA::GFP-RGA* en presencia de 1  $\mu$ M de PAC y observadas mediante el uso del microscopio confocal de fluorescencia.

Con el fin de obtener datos acerca del posible patrón de expresión de los genes *AJAX* se utilizaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan tres copias de proteína fluorescente verde con una señal de localización celular (*n3GFP*) bajo el control de 2 Kb de los promotores propios de cada uno de los *AJAX* (cedidas por Dolf weijers, U. de Wageningen, Holanda)

Las semillas de estas líneas se germinaron en luz durante un día y luego se sometieron durante 3 días a condiciones de oscuridad para generar plántulas etioladas. Al observar los hipocotilos de estas plantas en el microscopio confocal de fluorescencia se pudieron observar distintos patrones de expresión. Tanto para el gen *AJAX1* como para *AJAX2* se observó expresión en todos los tejidos del hipocotilo incluyendo la vasculatura, mientras que *AJAX3* y *AJAX4* presentaron patrones de expresión específicos de la zona vascular (Figura 10).



**Figura 10. Análisis *in vivo* del patrón de expresión de los cuatro genes *AJAX* en hipocotilos de plántulas de 4 días crecidas en oscuridad.** Líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la fusión traduccional *AJAX-GFP* dirigida por 2 Kb de sus promotores propios. Barra de escala = 50 µM.

Debido a la ausencia de líneas mutantes nulas para los *AJAX*, en particular para *AJAX3*, que permitan validar la funcionalidad de las construcciones por complementación y por tanto confirmar que el patrón observado debe corresponderse con el de los genes endógenos, se planteó la posibilidad de

solventar este problema estudiando la expresión endógena por la metodología de hibridación *in situ*.

Para este fin se generaron dos fragmentos de 782 pb y 598 pb a partir de ADN genómico para *GAI* y *AJAX3*, respectivamente, pertenecientes a las regiones más variables. Ambos fragmentos se ligaron dentro del plásmido *pGEMT* y posteriormente se amplificaron por PCR las secuencias molde incluyendo los sitios T7 y SP6 propios del vector que flanquean el inserto lo que más adelante permitiría generar tanto la sonda sentido como antisentido (*ver Materiales y Métodos*).

El análisis se realizó sobre hipocotilos de plántulas de Col-0 de 5 días después de haberse producido la floración (plántulas de 20 días), debido a que es la fase donde se da lugar el mayor crecimiento xilemático. Se pudo observar que tanto las sondas de *GAI* como *AJAX3* generaron señal en distintas capas celulares pero con mayor intensidad en el tejido vascular, concretamente en la zona donde se ubica el protoxilema (Figura 11).

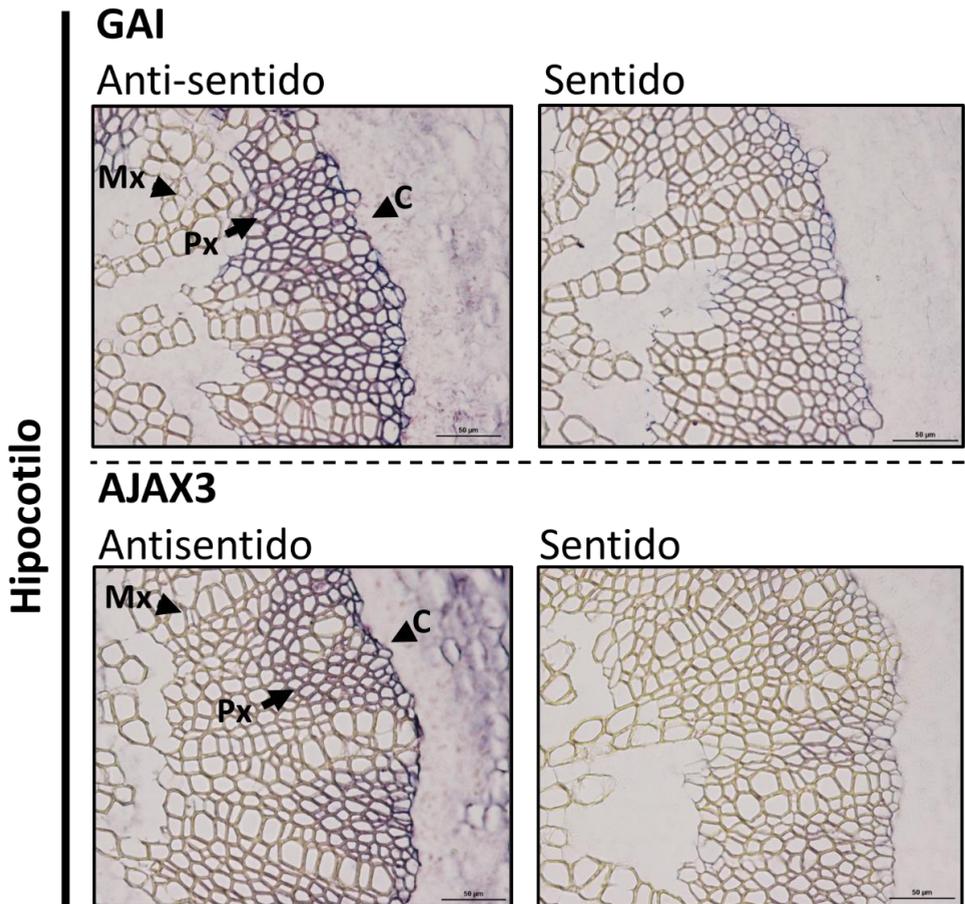


Figura 11. *GAI* y *AJAX3* se expresan en el xilema. Hibridación *in situ* de ambos genes en cortes transversales de hipocotilos de *Arabidopsis* de 20 días. C: cambium, Px: Protoxilema, Mx: Metaxilema, Sentido: sonda marcada de ARN control en el mismo sentido de lectura del gen, antisentido: sonda de ARN antisentido a la lectura del gen. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

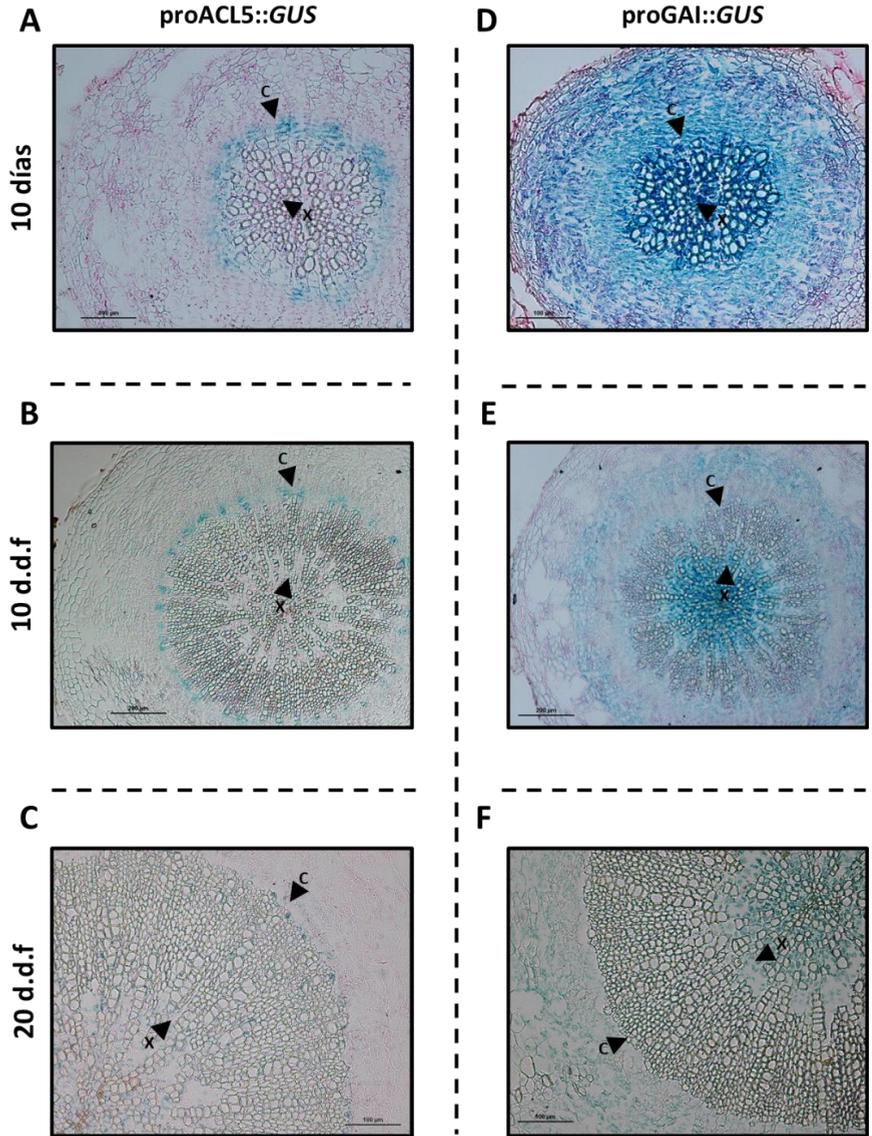
Adicionalmente se comprobó el patrón de expresión mediante ensayos de  $\beta$ -glucoronidasa en líneas transgénicas estables de *Arabidopsis*. Teniendo en cuenta que el mensajero de los AJAX solo se traduce en las células que producen termoespermina a través de *ACL5*, se puede suponer que el patrón de expresión de *ACL5* corresponderá aproximadamente con el patrón traduccional de los AJAX. Para este análisis se hizo uso de la línea *proACL5::GUS* descrita previamente (Muniz,

Minguet et al. 2008). Para el gen *GAI* se utilizaron líneas *proGAI::GUS* (Gallego-Giraldo, Hu et al. 2014).

Las líneas *proGAI::GUS* presentaron un patrón de coloración tanto en hipocótilo como en tallo. Antes de la floración se pudo observar señal en varios tejidos de este órgano, con una fuerte coloración en la zona vascular específicamente en xilema y procambium (Figura 12D). Una vez se produjo la floración, la señal fué más localizada en los órganos vasculares del hipocotilo (Figura 12E), mientras que en el tallo la señal se observó en varios tejidos sobre todo en las zonas más apicales (Figura 12 I, J).

El patrón de coloración en las líneas GUS de *ACL5* fue bastante localizado, específicamente en la zona del cambium y el protoxilema tanto en hipocótilo como en tallo (Figura 12 A-C). Se pudo evidenciar que esta señal fue más débil en los mismos tejidos después de la floración (Figura 12 G, H).

HIPOCOTILO



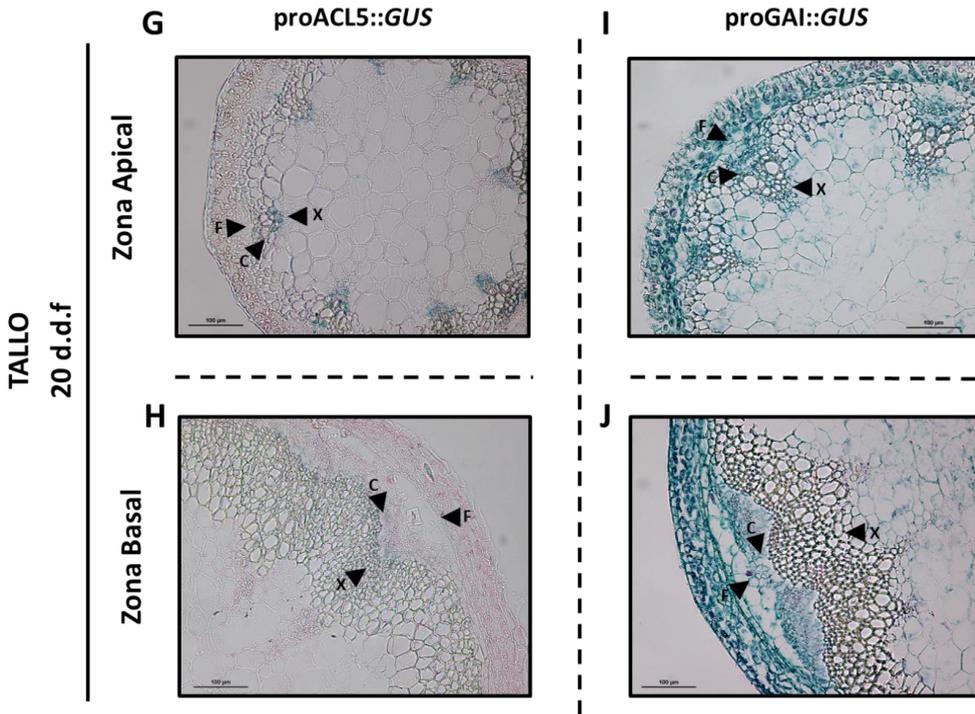


Figura 12. Patrón de expresión de líneas *proACL5::GUS* y *proGAI::GUS* en hypocotilos (A-F) y tallos (G-J) de *Arabidopsis thaliana* tanto antes como después de la floración (d.d.f). F: floema, X: xilema, C: cambium. Barra de escala = 100 μm.

### 3.3 Fenotipos relacionados con GAs en la maduración del xilema

Una vez confirmado que la expresión de los genes *DELLA* solapa con la de los *AJAX* en la vasculatura, la hipótesis de que la interacción física entre las proteínas correspondientes fuese relevante para el desarrollo del xilema ganó fuerza, y se decidió realizar análisis funcionales que pusieran de manifiesto un papel de GAs en este proceso. Debido a la información previamente obtenida acerca de la importancia de los *AJAX* en el contexto de maduración del xilema primero se decidió analizar si la ruta de señalización por GAs juega un papel notorio en este proceso. Para esto se realizaron conteos celulares de células traqueales de tipo xilema pertenecientes a hypocotilos de plantas de *Arabidopsis* ecotipo *L-er* de 20

días después de la floración. Se analizaron tanto plantas de genotipo silvestre y del mutante de la termoespermina sintasa *acl5-4* (L-*er*) como control y tratadas con el inhibidor de la biosíntesis de GAs (PAC), además del mutante de biosíntesis de GAs *ga1-3* siguiendo el método de Muñiz *et al.* (Muniz, Minguet *et al.* 2008) (*ver Materiales y Métodos 6.11*).

Tal y como se esperaba, la línea control L-*er*, presentó un enriquecimiento de células del metaxilema (94%), del cual el 76 % pertenecen al tipo celular punteado y el 18% al tipo reticulado, y una proporción muy baja de células de protoxilema (6%), de las cuales; el 5% son células de tipo espiral y el 1% de tipo anular (Figura 13); esto representaría la distribución del patrón de lignificación de las células xilemáticas en condiciones normales. Sin embargo, en el mutante *acl5-4* se observó una casi total desaparición del tipo celular más maduro, con solo un 3% de metaxilema punteado y la mayoría de células metaxilemáticas fueron del tipo menos maduro, es decir células reticuladas (72%). Además, se pudo apreciar un incremento en las células protoxilemáticas de tipo espiral (25%) respecto al silvestre (Figura 13).

En el mutante *ga1-3*, que acumula DELLAs, se pudo apreciar una reducción de elementos de tipo punteado (45%) en paralelo al incremento de células reticuladas menos lignificadas (48%), mostrando una tendencia similar a la de *acl5-4*. Algo similar ocurrió cuando se trataron las plantas silvestres con 10  $\mu$ M de PAC, aunque el efecto no fue tan fuerte se evidenció la misma tendencia de reducción de células de tipo punteado; el tratamiento no tuvo efecto destacable en el mutante *acl5-4* (Figura 13).

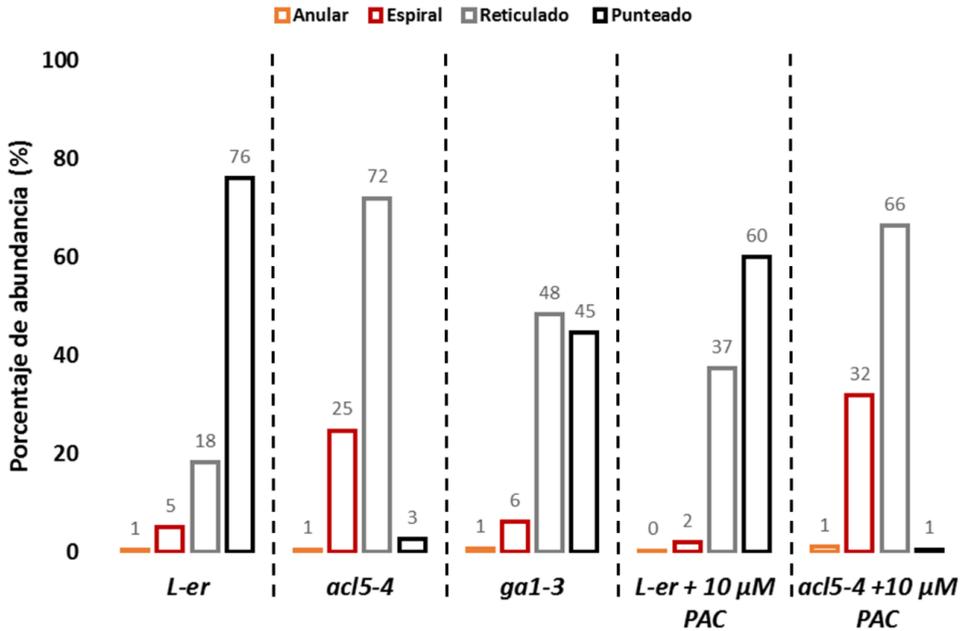


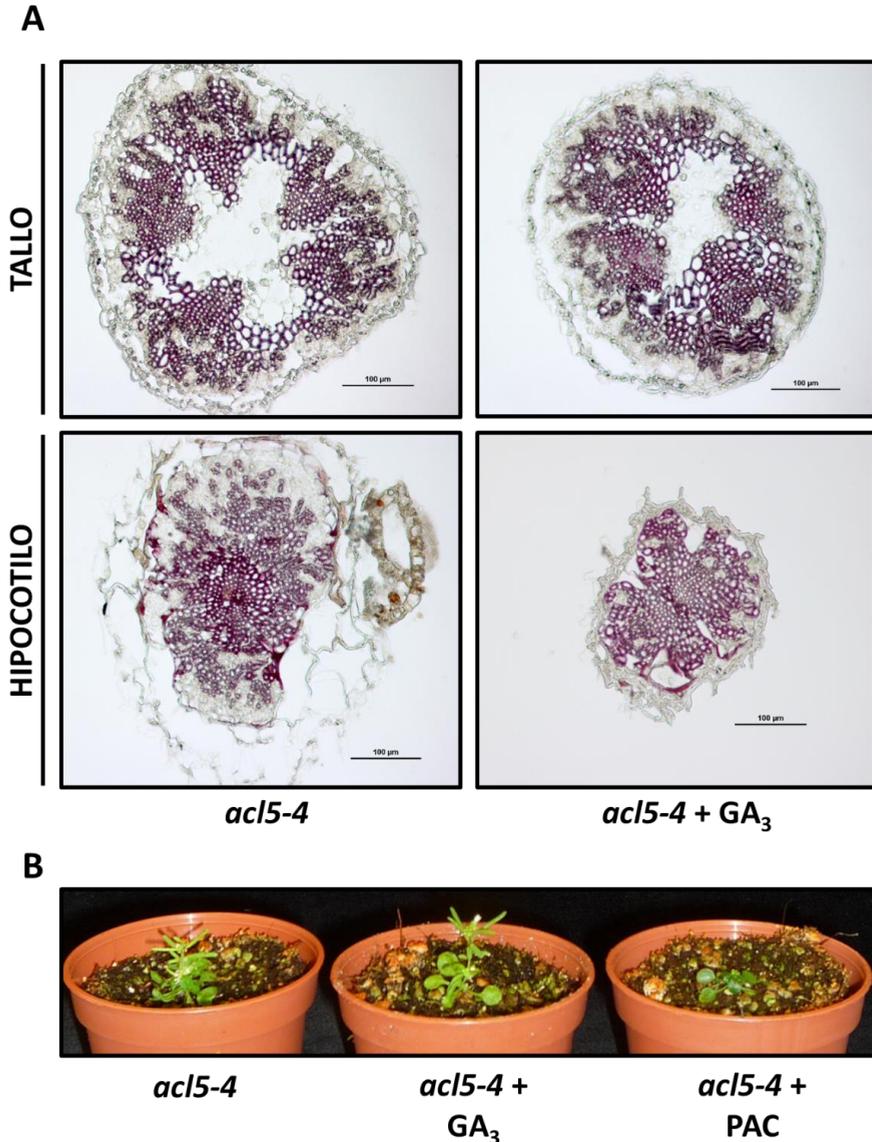
Figura 13. Distribución de los elementos del xilema según su porcentaje de abundancia en distintos fondos mutantes y tratamientos con PAC. Se analizaron 5 plantas por línea y se realizaron conteos de 200-300 células por planta en el microscopio utilizando luz ultravioleta.

### 3.4 Efecto de las DELLA en el desarrollo del xilema a través de la ruta de la termoespermina

Los datos anteriores reflejan que las proteínas DELLA podrían tener un efecto negativo sobre la maduración de las células xilemáticas, y opuesto a la acción de los AJAX. Para saber si esta regulación la ejercen las DELLA a través de los AJAX, se trataron plantas mutantes *acl5-4* con GAs para ver si al inducir la degradación de las DELLA se reactiva el proceso de maduración. Si esto ocurre, significaría que las DELLA tienen un efecto sobre este proceso por una vía independiente al de la termoespermina y probablemente de los AJAX.

Según el análisis realizado en cortes histológicos teñidos con flouroglicinol-HCl para visualizar el estado de la vasculatura tanto en tallo como en hipocotilo, no se

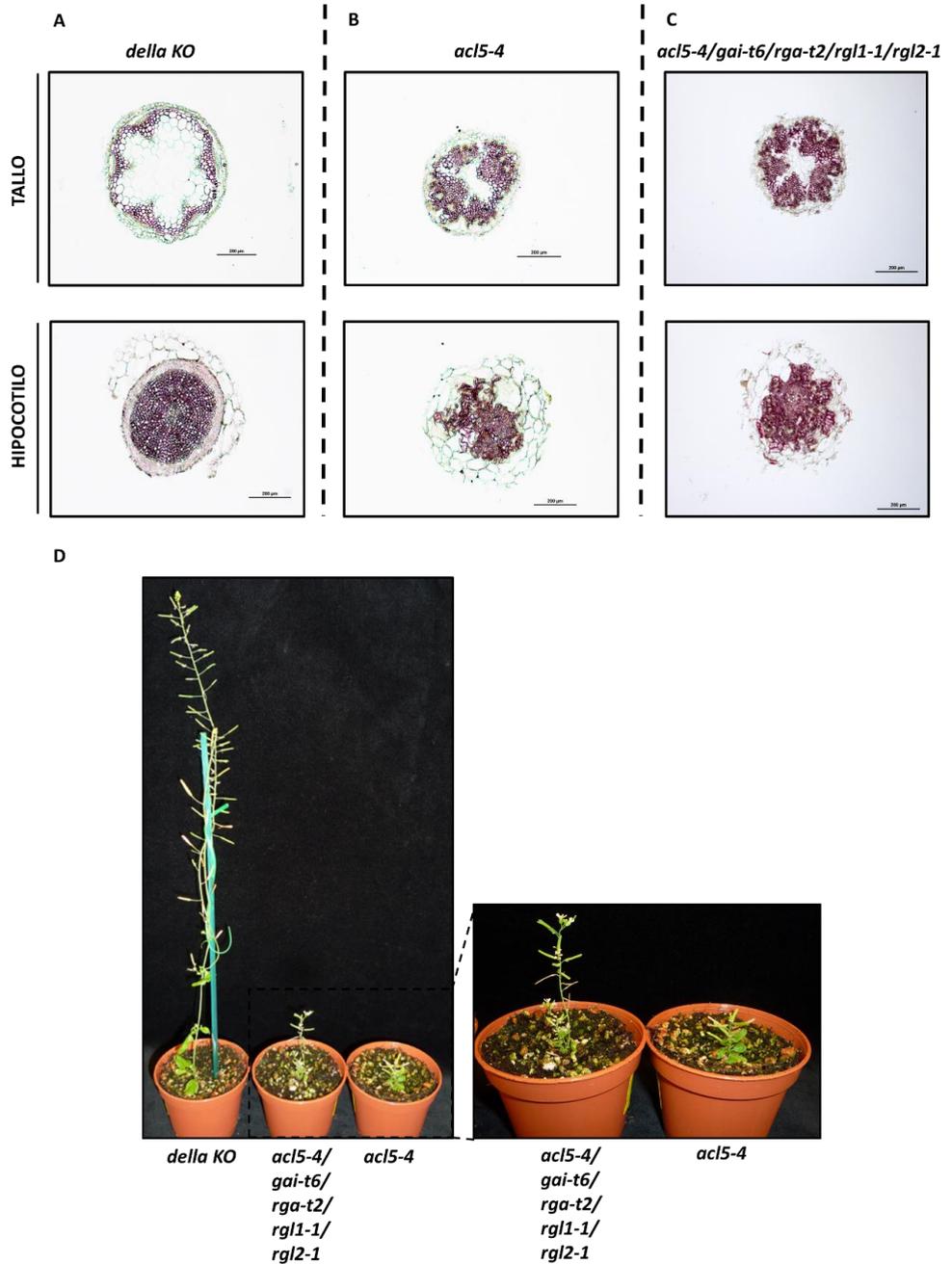
presentaron cambios en la morfología de sobreproliferación de células xilemáticas en el mutante *acl5-4* al ser tratado con GAs (Figura 14A), que correlacionan con la incapacidad del tratamiento de revertir el fenotipo enano del mutante (Figura 14B).



**Figura 14. Efecto de las GAs en el fenotipo de *acl5*.** A. Cortes transversales de hipocótilos y tallos del mutante *acl5-4* teñidos con fluoroglucinol-HCl para observar zonas lignificadas. B. Fenotipos caulinares de plantas adultas del mutante *acl5-4* tratado con giberelinas y paclobutrazol. Barra de escala = 100 µm.

Para corroborar genéticamente los resultados obtenidos mediante el análisis farmacológico, provocamos la inactivación genética de las proteínas DELLA en un fondo *acl5*, cruzando el mutante *acl5-4* con el mutante nulo en los cinco genes DELLA de Arabidopsis, denominado *dellaKO* (ver Materiales y Métodos), debido a que ACL5 se encuentra muy ligado genéticamente a RGL3 el mutante obtenido fue *acl5-4 gai-t6 rga-24 rgl1-1 rgl2-1*. Analizando el estado de la vasculatura de estos mutantes se pudo visualizar que no existen anomalías en el mutante nulo *della*, es decir la formación tanto del anillo vascular del hipocotilo y de los haces vasculares del tallo presentan una correcta organización similar al fenotipo silvestre y contrario a lo que se apreció en los mutantes que acumulan DELLA (Figura 15A). Aun así la anulación de la actividad de estas proteínas no alivió el fenotipo anómalo de sobre proliferación de células del xilema de *acl5*, debido a que no se evidenciaron diferencias entre *acl5-4* y *acl5-4 gai-t6 rga-24 rgl1-1 rgl2-1* (Figura 15 A, B). El fenotipo de este quintuple mutante generado presenta una ligera elongación con respecto al mutante *acl5-4*, que se puede deber al papel que tienen las GAs sobre otros aspectos relacionados con el crecimiento en otros tipos celulares (Figura 15D).

El análisis de los elementos celulares del xilema tampoco evidenció una recuperación de *acl5-4* en lo referente a células de tipo punteado (Figura 16). Estos datos de tipo genético sumados a los aportados por los ensayos de tipo farmacológicos permitirían concluir que ACL5 actúa aguas debajo de las proteínas DELLA, una idea compatible con la interacción física de éstas con los AJAX.



**Figura 15. Inactivación genética de las DELLA en el fondo mutante *acl5-4*.** A. Cortes histológicas transversales tanto de tallo como hipocotilo teñidos con fluoroglucinol-HCl y B. fenotipos de plantas adulta de *acl5-4*, *della KO* y *acl5-4 x gai-t6 rga-24 rgl1-1 rgl2-1*. Barra de escala = 200  $\mu$ m.

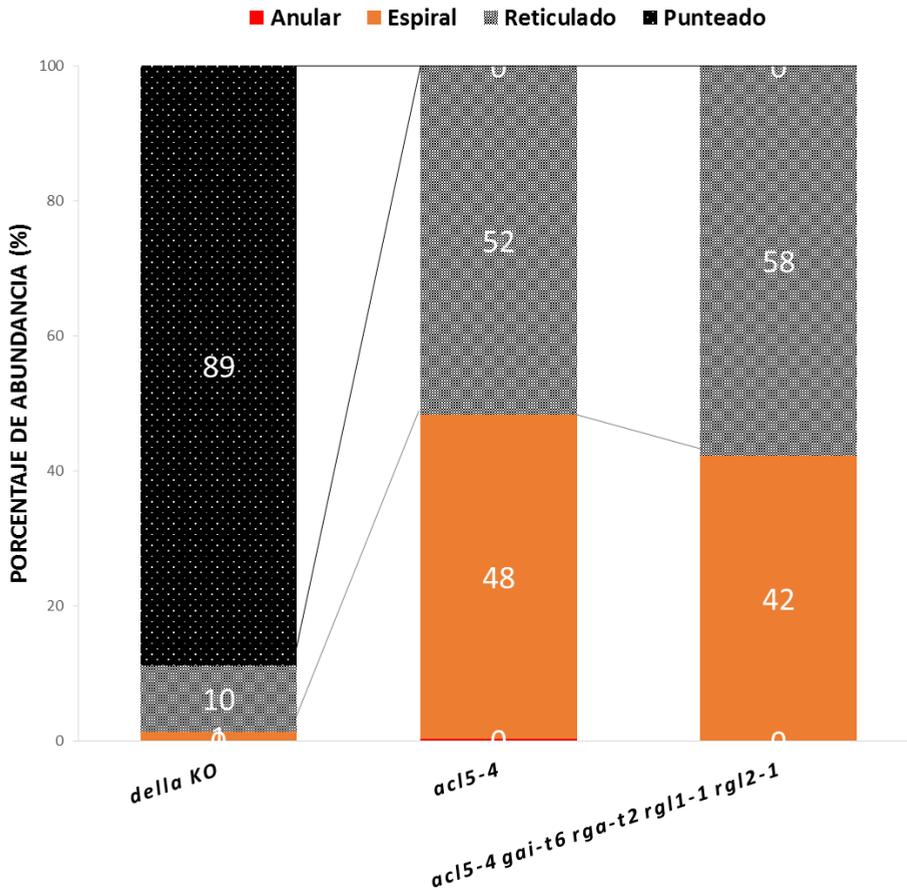
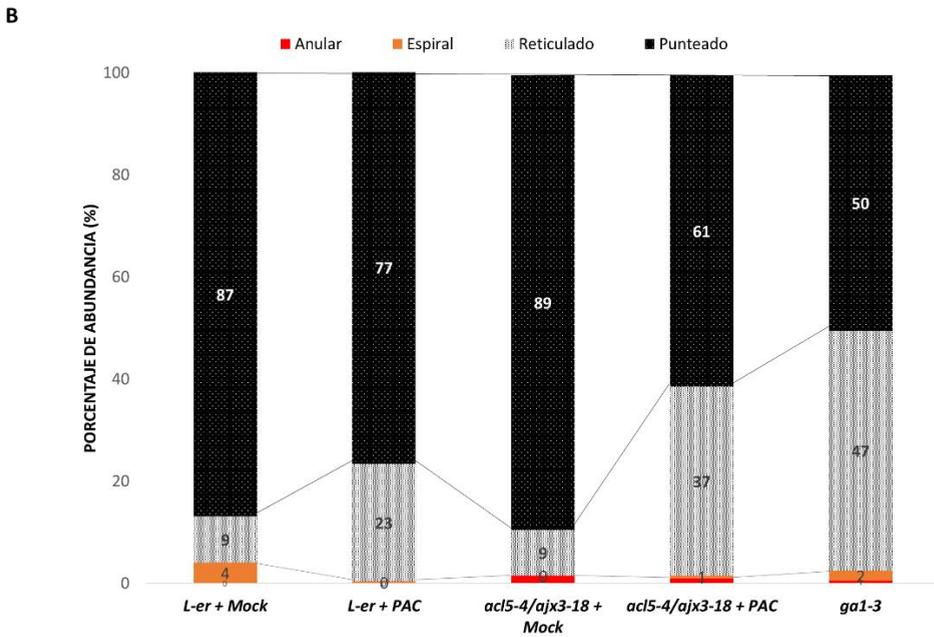
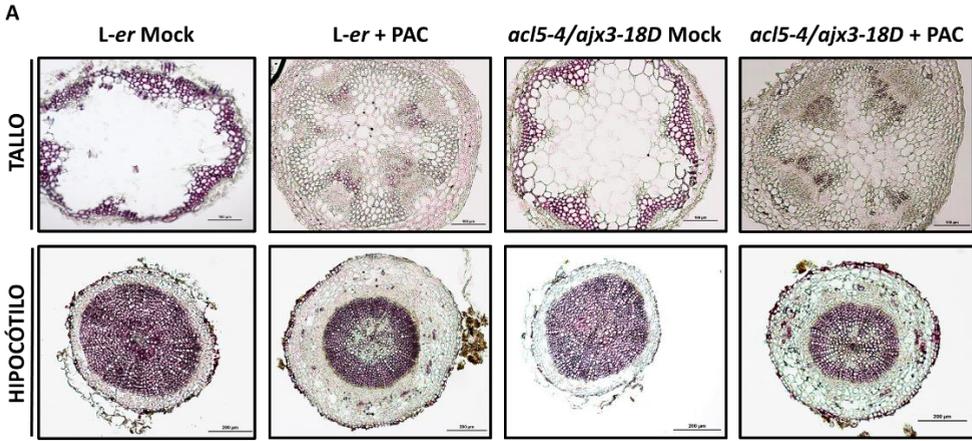


Figura 16. Distribución de los elementos del xilema en los mutantes *dellaKO*, *acl5* y *acl5-4 gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1*. Se analizaron 5 plantas por línea y se realizaron conteos de 200-300 células por planta en el microscopio utilizando luz ultravioleta.

Para determinar si la regulación del proceso de maduración xilemática ejercida por las proteínas DELLA se realiza a través de los AJAX se trataron tanto plantas silvestres (*L-er*) como mutantes del supresor dominante *acl5-4 ajx3-18D* con 10  $\mu\text{M}$  de PAC. La idea de este experimento radica en que en este doble mutante el único AJAX que posee actividad traduccional es *AJAX3*, y se considera como una línea que podría ser más sensible al efecto del PAC con respecto a la planta silvestre debido a que en esta última cuenta con la completa actividad de los cuatro AJAX.

El análisis histológico reveló que no existen diferencias entre el fenotipo silvestre y el mutante supresor *acl5-4 ajx3-18D*, apuntando que la sola actividad de AJAX3 es suficiente para rescatar el fenotipo de proliferación de *acl5-4*. En ambos casos el tratamiento con PAC generó una reducción del área xilemática tanto del tallo como del hipocotilo como lo refleja la señal de flouroglucinol-HCl (Figura 17A). Según este análisis, la reducción ocurrió igual en ambos casos, sin diferencias significativas, lo que significaría que el efecto negativo de las DELLA sobre AJAX3 no influye en la regulación de la xilogénesis (crecimiento secundario). Al realizar los respectivos conteos de las células del xilema se observó una mayor tendencia a la pérdida de abundancia de elementos de tipo punteado en la línea sensibilizada *acl5-4 ajx3-18D* (61%) con respecto al silvestre (77%), con un aumento del tipo celular antecesor de tipo reticulado de 23% y 37% para *L-er* y *acl5-4 ajx3-18*, respectivamente. Esto apoya nuestra hipótesis e indica que la importancia del efecto represor de DELLA sobre AJAX3 es específico del proceso de maduración de las células xilemáticas (Figura 17B).



**Figura 17. Efecto inhibitorio causado por las DELLA tanto en plantas silvestres como plantas de una línea sensibilizada de AJAX. A)** Cortes transversales de tejido de tallo e hipocotilo teñidos con fluoroglucinol-HCL. **B)** Distribución de los elementos del xilema. Se analizaron 5 plantas por línea y se realizaron conteos de 200-300 células por planta en el microscopio utilizando luz ultravioleta. Barra de escala = 200 µm.

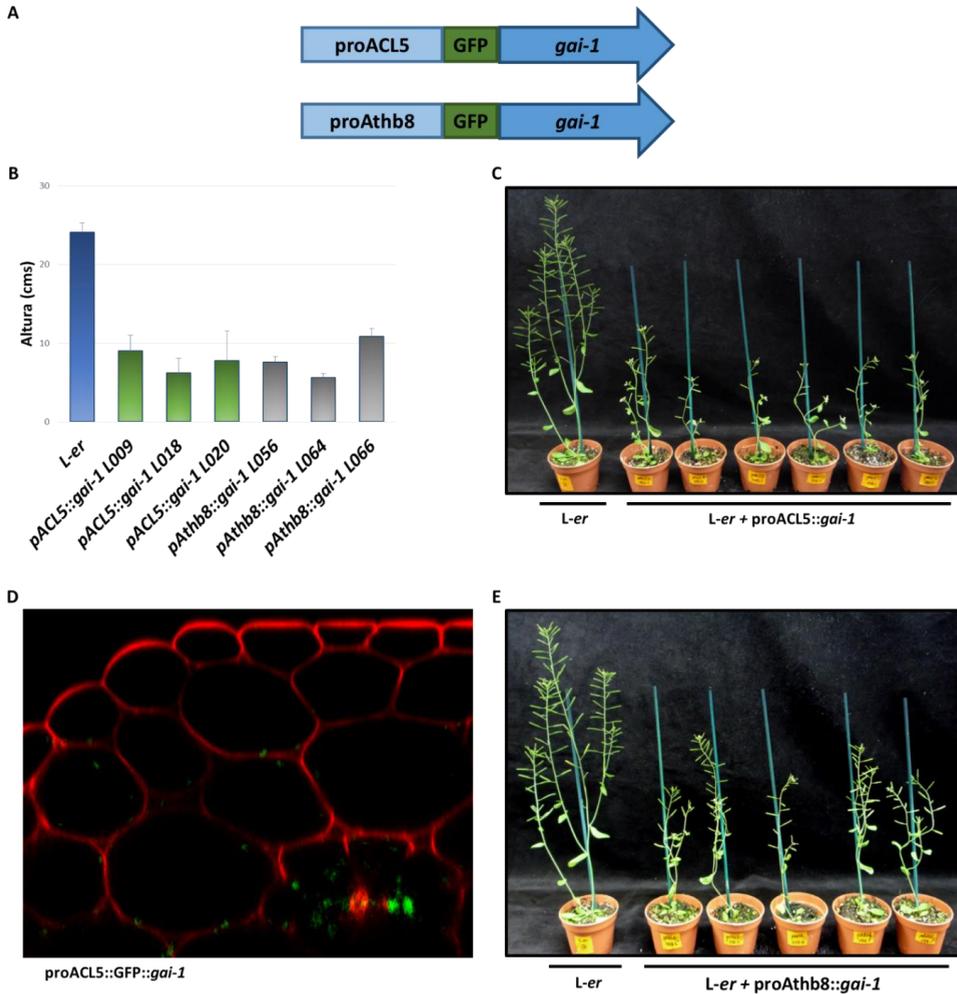
### 3.5 Efecto de la expresión de las proteínas *DELLA* en tejidos vasculares

Debido a que el patrón de expresión de los genes *DELLA* se extiende más allá de la vasculatura, y a que la mutación *acl5* es epistática sobre la pérdida de función de las *DELLA*, cabe la posibilidad de que el efecto de las *DELLA* sobre la maduración del xilema sea causado por una actividad no-autónoma-celular en las células vecinas a la vasculatura, en vez de por una interacción con los AJAX en la vasculatura.

Para comprobar esta posibilidad se expresó un alelo de *DELLA* resistente a la degradación inducida por GAs (*gai-1*) bajo el control de promotores específicos de vasculatura: el de *Athb8* (1.8 Kb aguas arriba del inicio de traducción), necesario para la iniciación del xilema (Donner, Sherr et al. 2009); y el de *ACL5* (2 Kb aguas arriba del inicio de traducción) que se expresa una vez las células han iniciado el programa de diferenciación del xilema (Muniz, Minguet et al. 2008) (Figura 18A). La fusión de *gai-1* a GFP permitió comprobar el correcto dominio de expresión forzada de *gai-1* en el tejido diana (Figura 18D), y la inspección visual de las plantas T3 de estas líneas transgénicas evidenció una reducción general en el tamaño final de las plantas portadoras de cada una de las construcciones (Figura 18 B, C, E).

Para saber si la disminución del tamaño obtenida en estas líneas transgénicas se debe a un posible efecto en el bloqueo de la señalización por GAs mediada por la actividad de *gai-1* se realizaron cortes transversales tanto de hipocotilo como tallo de plantas adultas de 20 después de la floración. Se evidenció una fuerte reducción del área xilemática en ambos órganos en las líneas transgénicas comparado con el fenotipo silvestre (Figura 18A). Este resultado es concordante con los resultados previamente documentados por otros autores en donde se determinó que al bloquear el flujo de GAs provenientes de hojas o al realizar microinjertos utilizando donantes silvestres y patrones enraizados que estabilizan *DELLA*s, como *gai-1* y *gai-3*, se obtiene una reducción significativa del crecimiento secundario (expansión) (Ragni, Nieminen et al. 2011) (Dayan, Voronin et al. 2012), incluso

cuando en este caso solo se expresa *gai-1* específicamente en el tejido vascular, en concordancia con dichas observaciones previas.



**Figura 18. Expresión dirigida de *gai-1* por promotores específicos de tejido vascular en líneas transgénicas de *Arabidopsis* (L-er). A)** Fusión traduccional de GFP-*gai-1* con expresión controlada por los promotores Athb8 y ACL5. **B)** Análisis de longitud en cms de las líneas transgénicas generadas (se escogieron 3 líneas de cada construcción para continuar los análisis). **C), E).** Aspectos fenotípicos de las líneas transgénicas generadas. **D).** Compilado de imágenes de un barrido de series que al ser reconstruidas aportan información global de la expresión de *gai-1* en hypocotilos de plántulas etioladas de 4 días.

Para determinar el aspecto de la maduración del xilema se realizaron conteos de células xilemáticas. En las líneas de expresión de *gai-1* en vasculatura se evidenció una disminución del porcentaje de células de tipo punteado (47%) y un incremento en las predecesoras que son de tipo reticulado (49%) con respecto a la planta silvestre (76% y 20%, respectivamente) (Figura 19B). Este resultado indica de manera sólida que la regulación por GAs de la maduración del xilema se debe a la actividad directa de las DELLAs en las células que están siendo sujetas al programa de diferenciación del xilema, probablemente por su interacción con AJAX.

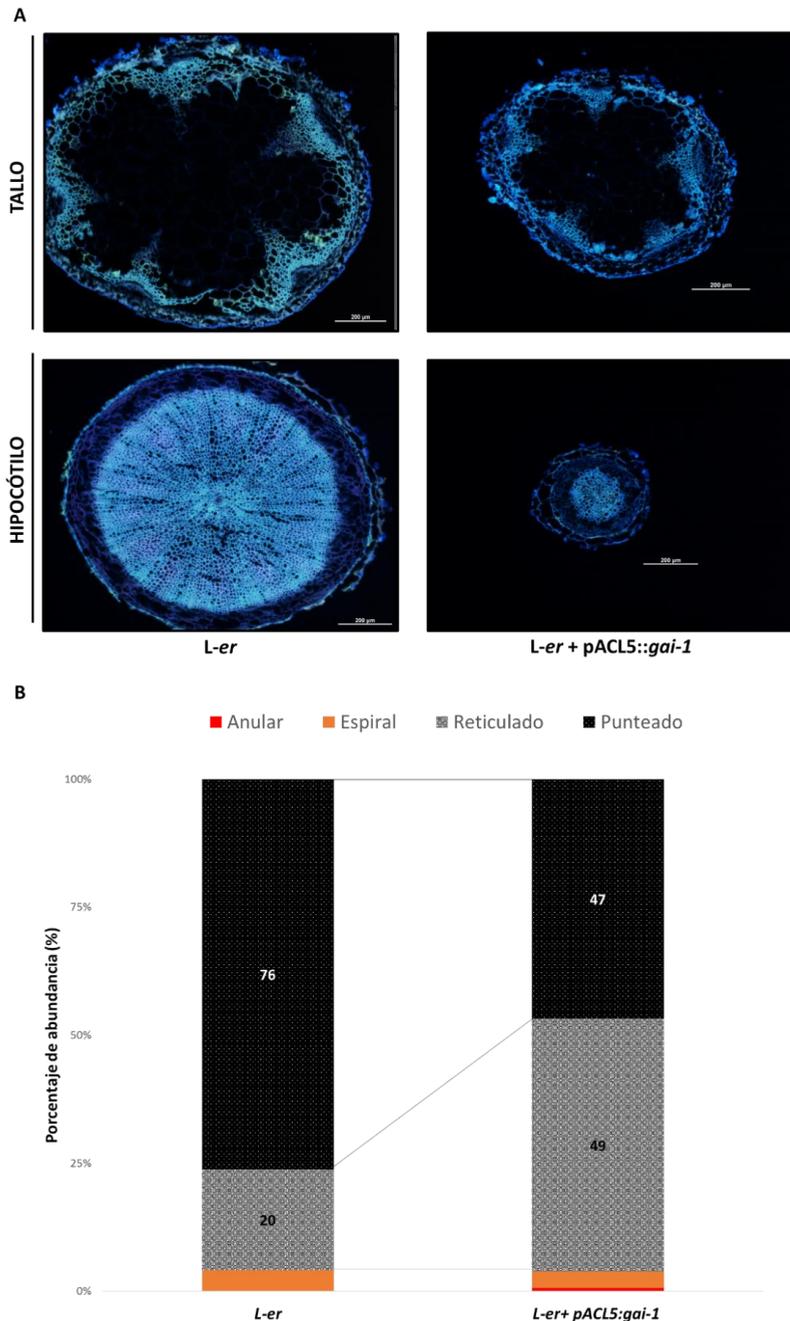
### **3.6 La sobreexpresión de *AJAX3* restaura la maduración del xilema en mutantes deficientes en GAs**

Si la hipótesis que planteamos sobre la interacción DELLA-AJAX3 es relevante para el control de la maduración del xilema es correcta, una predicción que debe cumplirse es que la sobre-expresión de *AJAX3* debería ser capaz de aliviar el efecto que tiene la acumulación de DELLAs en la maduración de las células del xilema. Para probar esta idea se procedió a sobreexpresar *AJAX3* en plantas mutantes deficientes en la biosíntesis de GAs como es el caso de *ga1-3*. Se analizaron dos líneas de sobreexpresión de la generación T3 (L3 y L4) en donde se evidenció un incremento en la cantidad de células de tipo punteado (72% y 71% respectivamente) comparado con el mutante *ga1-3* (53%), recuperando la tendencia presente en el fenotipo silvestre (76%) (Figura 20). Los resultados obtenidos permiten argumentar que el balance entre AJAX y DELLAs podría ser determinante para la correcta maduración del xilema.

### **3.7 Las proteínas DELLA regulan la actividad de LHW inhibiendo la actividad de AJAX3**

Los resultados mostrados hasta el momento aportan evidencia fisiológica y genética para la interacción entre DELLAs y AJAX3. Sin embargo, aún quedaría por aclarar el mecanismo molecular por el que dicha interacción gobierna la maduración del xilema. Una pista sobre el factor de transcripción sujeto a regulación por el balance entre DELLA y AJAX3 se puede obtener en la literatura.

Por una parte, el análisis transcriptómico del mutante *ac15* muestra niveles altos de inducción de genes relacionados con proteólisis, metabolismo de pared celular y de regulación transcripcional de procesos de formación de xilema (Tong, Yoshimoto et al. 2014). Entre ellos se encuentran varios miembros de la familia de factores de transcripción tipo NAC (por NAM, ATAF, CUC) como *VND1*, *VND2*, *VND6*, *VND7* y *XND1* los cuales se han reportado como elementos maestros en el proceso de formación del xilema.



**Figura 19. Cambios relativos al desarrollo del xilemático en la línea transgénica *proACL5::GFP-gai-1*.** **A.** Visualización de cortes de tallo e hipocótilo en plantas adultas observados al microscopio mediante luz UV aprovechando la autofluorescencia del tejido xilemático (Azul claro). **B.** Conteos celulares de los elementos del xilema. Barra de escala = 200 µm.

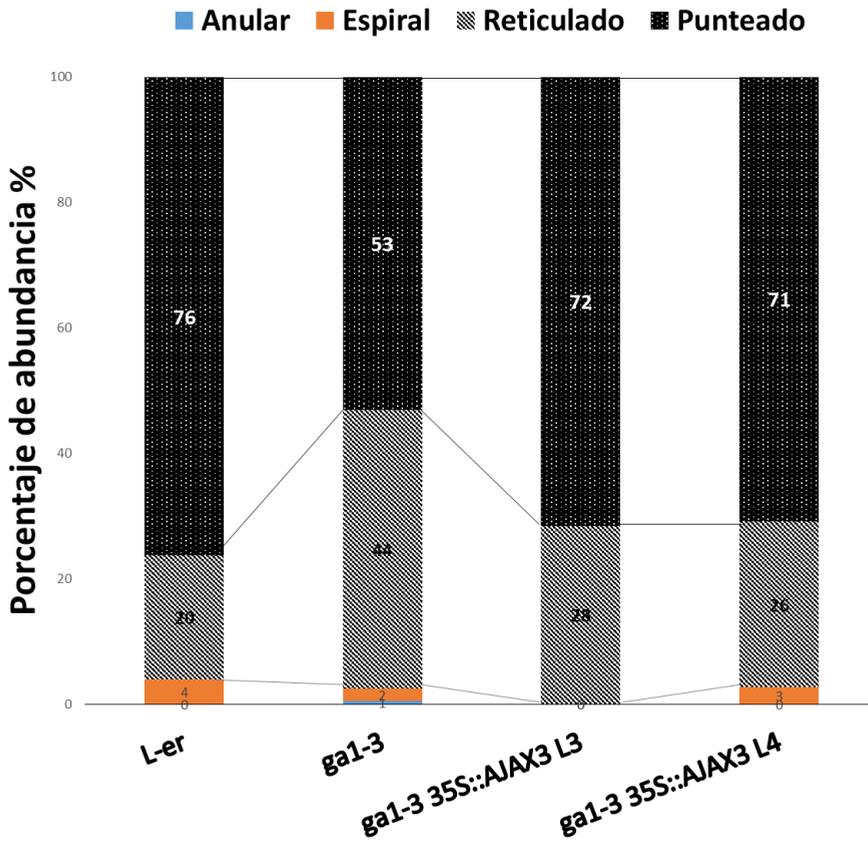


Figura 20. Efecto de la sobreexpresión de AJAX3 sobre la disminución en la maduración del xilema presente en el mutante de biosíntesis de GAs, *ga1-3*. Conteos celulares de elementos del xilema en mutantes que estabilizan proteínas DELLA, líneas sobreexpresante de AJAX3 en fondo *ga1-3*.

Por otra parte, AJAX2 ha sido descrito como un interactor del factor de transcripción de la familia bHLH llamado LONESOME HIGHWAY (LHW) que al parecer tiene un papel en la regulación de los primeros pasos del desarrollo vascular (Ohashi-Ito and Bergmann 2007). Curiosamente, la sobreexpresión de un parólogo de LHW (LHL3) también provoca una fuerte inducción de los genes *VND6* y *VND7* (Ohashi-Ito, Matsukawa et al. 2013). La coincidencia en la regulación de *VND6* y otros genes del desarrollo vascular por parte de ACL5 y de la ruta de LHW,

así como la interacción de AJAX2 con LHW, sugiere que las DELLA podrían regular la actividad de LHW a través de su interacción con AJAX3.

Para comprobar esta hipótesis se analizó primero si la capacidad de LHW de interactuar con AJAX2 era extensible a otros AJAX. Efectivamente, LHW fue capaz de interactuar con AJAX3 tanto cuando éste se utilizaba como presa o como cebo en ensayos de doble híbrido en levadura (Figura 21).

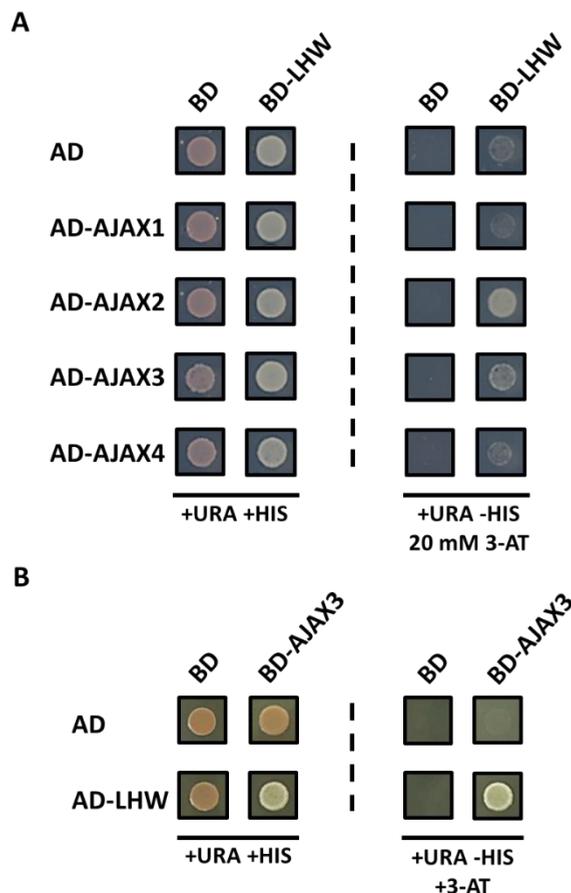


Figura 21. LHW interacciona con AJAX2 y AJAX3 en levadura. A. Ensayo de doble híbrido en levadura enfrentando BD-LHW contra AD con cada uno de los AJAX. B. Interacción de BD-AJAX3 con AD-LHW. La visualización de las interacciones se realizó en ausencia de HIS y en presencia de 3-AT.

En segundo lugar, se analizó la expresión de una línea marcadora de *LHW-GFP* en plántulas etioladas de 4 días en donde se logró visualizar la presencia de *LHW* en la zona de la vasculatura (Figura 22A). Este resultado, más los obtenidos previamente (Figuras 9 y 10) indica que los tres elementos del módulo propuesto colocalizan en el mismo tejido.

Por último, para validar funcionalmente la actividad de este grupo de interactores se diseñó un ensayo de transactivación en hojas de *N. benthamiana*. Como gen testigo se preparó la construcción *proVND6::LUC* que es diana, al menos de *LHL3*, la expresión de *LHW* como efector mostró que esta proteína tiene capacidad transactivadora sobre el promotor de *VND6* (Figura 23). Al introducir *AJAX3* al sistema se pudo apreciar que la actividad luciferasa disminuyó notablemente, de acuerdo con que *AJAX3* interactuara con *LHW* evitando que este active a su diana, ya que *AJAX3* por sí solo no causó cambios en la expresión del gen *LUC*. De especial interés es que la actividad luciferasa se recuperó al co-expresar la proteína *DELLA M5GAI*. Este resultado es una prueba funcional que demuestra el efecto inhibitorio de *GAI* sobre la actividad de *AJAX3*.

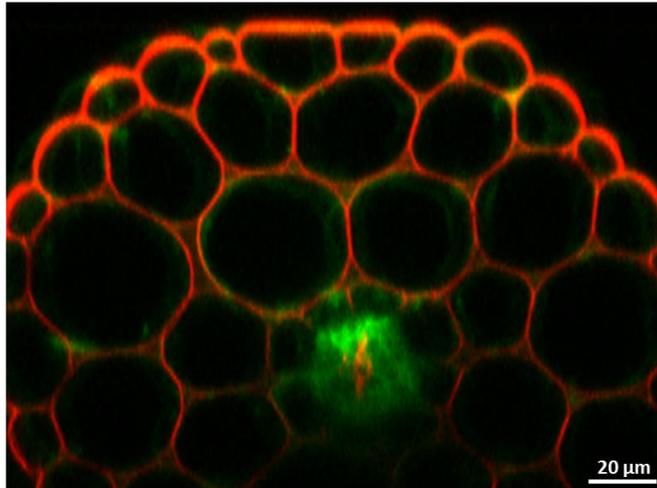
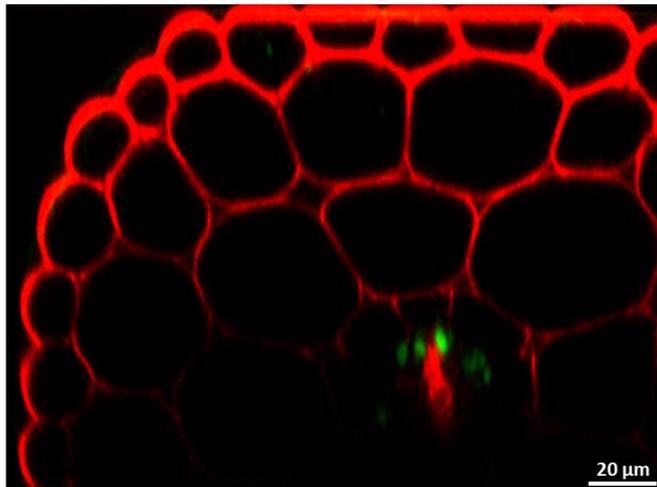
**A*****proLHW::LHW::GFP*****B*****proTMO5::TMO5::n3GFP***

Figura 22. Patrón de localización tisular de líneas marcadoras GFP de *LHW* (A) y *TMO5* (B) visto por microscopia confocal de fluorescencia. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

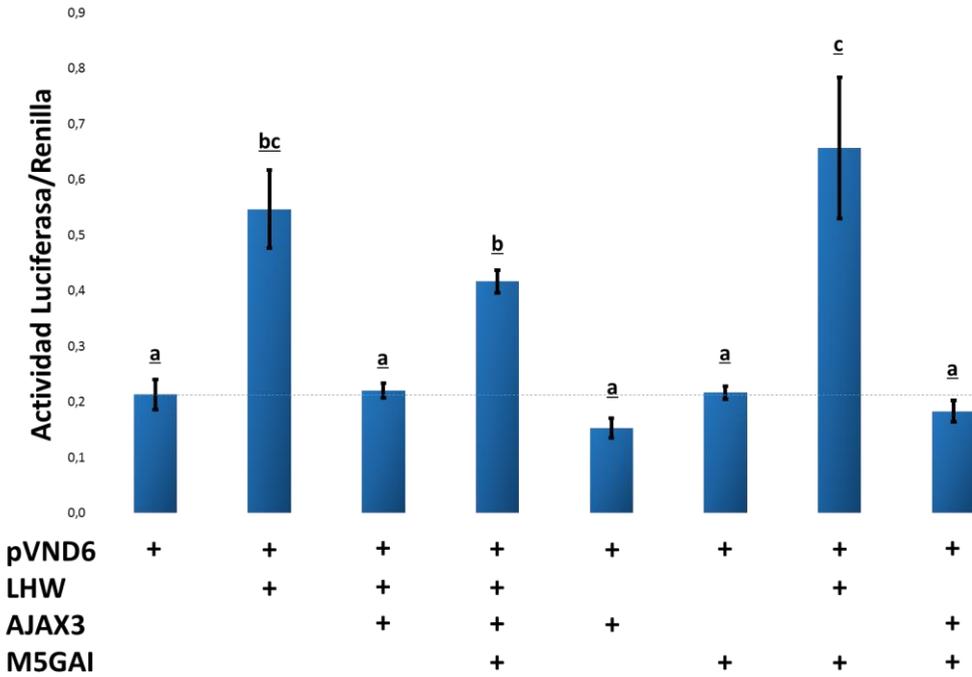


Figura 23. Análisis de la actividad luciferasa del promotor *VND6* en presencia del módulo GAI-AJAX3-LHW en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Los datos representan la media del análisis de 3 hojas por planta para cada uno de los tratamientos. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ( $p < 0.05$ ).





## **4. *DISCUSIÓN***



Los resultados presentados en esta Tesis son novedosos en dos aspectos: (1) identifican un nuevo proceso de desarrollo en el que participan las GAs como reguladores (la diferenciación del xilema); y (2) proporcionan un mecanismo molecular para dicha regulación. Como se ha explicado en la Introducción, ya se sabía que las GAs eran necesarias para promover el desarrollo vascular que acompaña a la floración –al menos en *Arabidopsis* (Ragni, Nieminen et al. 2011). De esta manera se asegura la planta que la vasculatura, sobre todo el xilema, tendrá la suficiente capacidad de transporte de nutrientes para sostener el crecimiento de nuevos órganos, como ramas, flores y frutos. Sin embargo, nosotros hemos encontrado que la función de las GAs se extiende más allá de la iniciación del desarrollo vascular, y alcanza también a la correcta diferenciación de las células del xilema, como se indica en la Figura 24.

### **Las giberelinas modulan el programa de diferenciación del xilema a través de AJAX3**

Son tres los principales argumentos que apoyan una función de las GAs en la maduración del xilema:

- (1) La deficiencia en GAs provoca un fenotipo en el xilema similar al de la falta de función de ACL5 (que impide la correcta traducción de los AJAX)
- (2) Es posible localizar a las DELLAs en la vasculatura, solapando con la expresión de otros elementos necesarios para la diferenciación del xilema, como ACL5, LHW y TMO5.
- (3) La acumulación de DELLAs específicamente en el dominio de expresión de ACL5 en la vasculatura dificulta la maduración del xilema.

Es importante hacer notar que en ninguno de los casos (mutaciones que estabilizan las DELLAs, y tratamientos o mutaciones que impiden la síntesis de GAs) se bloquea completamente la diferenciación del xilema; es decir, no se alcanza la gravedad que

provoca la falta de función de ACL5. Esto indica que el papel de las GAs debería ser el de modular la actividad de un circuito genético pre-establecido, más que el de constituir un componente esencial de dicho programa de desarrollo. Esta función moduladora parece ser intrínseca a la acción de las GAs en todos los procesos en los que participan. Por ejemplo, los mutantes *dellaKO* no presentan graves problemas en su desarrollo, pero no responden de forma óptima o plástica ante cambios ambientales o la exposición frente a patógenos [(Achard, Renou et al. 2008) (Claeys, Skirycz et al. 2012) (Claeys, De Bodt et al. 2014)]. Y también encaja con esta idea el hecho de que las proteínas DELLA sólo puedan regular la expresión génica a través de factores de transcripción (TFs) que tienen funciones esenciales en otras rutas de señalización (Locascio, Blazquez et al. 2013). En el caso de la maduración del xilema, el mecanismo propuesto en esta Tesis para la acción de las GAs se basa en la interacción física de las DELLAs con AJAX3 (y posiblemente otros AJAX). Aunque AJAX3 parece carecer de la capacidad de unirse al DNA, resultados de nuestro laboratorio indican que regula de forma indirecta la transcripción a través de LHW (Vera-Sirera et al., sin publicar), por lo que este mecanismo no es más que una modificación del modelo general DELLA-TF. De hecho, éste no es el primer caso en el que las DELLA regulan la actividad de un regulador del TF, en vez del propio TF. Se ha descrito que las DELLAs regulan la expresión de genes inducidos por ácido jasmónico a través de la unión a los JAZs, que actúan como represores de la actividad de MYC2, que es quien realmente se une a los promotores diana (Hou, Lee et al. 2010).

Dado que el módulo AJAX-LHW puede ejecutar de forma correcta la completa diferenciación del xilema, una pregunta relevante es **¿qué aporta la modulación por GAs al programa de maduración?** Aunque faltan datos para contestar esta pregunta de forma concluyente, es posible especular con dos posibilidades. La primera es que las GAs aporten información ambiental al desarrollo de la vasculatura. Esta posibilidad se basa en que la síntesis de GAs está sujeta a

regulación por diversos factores ambientales (luz y temperatura principalmente) (Olszewski, Sun et al. 2002), y por tanto los niveles de DELLAs dependen directamente de las condiciones del entorno. Pequeños incrementos o reducciones en estos niveles podrían tener un efecto sutil sobre la actividad del módulo AJAX-LHW y adaptar la maduración del xilema a las necesidades circunstanciales. La segunda posibilidad es que el aumento en GAs que se produce durante la transición floral sirva para coordinar tanto la iniciación como el posterior desarrollo del xilema. Una activación excesiva de LHW se ha visto que provoca alteraciones en la vasculatura (De Rybel B. 2013), por lo que la eliminación de las DELLAs resultaría en mayores niveles de AJAX para controlar la actividad de LHW.

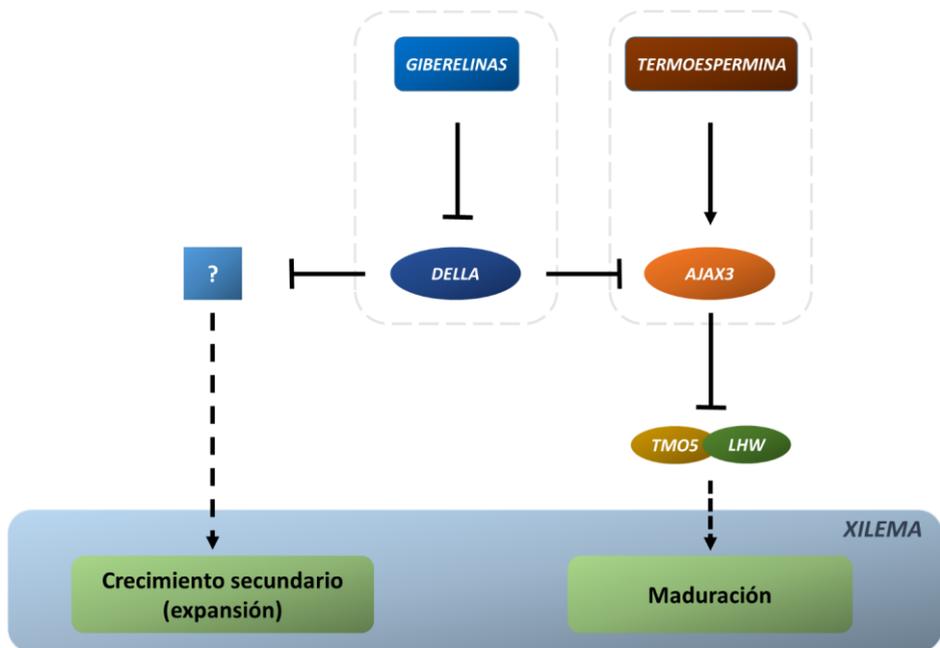
### **Perspectivas. Cuestiones sin resolver**

En mi opinión, son varias las cuestiones derivadas de esta Tesis que habría que resolver en próximos trabajos. Entre las preguntas acerca del mecanismo, la más evidente es **la identificación del factor de transcripción a través del cuál las GAs provocan el estallido de crecimiento secundario** asociado a la entrada en la fase reproductora. Es cierto que tanto la iniciación como la maduración del xilema deben ser procesos coordinados, como sugiere el hecho de que en el mutante *acl5* aumente la iniciación cuando la maduración se ve impedida [(Hanzawa, Takahashi et al. 1997) (Muniz, Minguet et al. 2008)] y que las mutaciones supresoras obtenidas hasta el momento rescaten simultáneamente ambos defectos [(Imai A. 2006) (Imai, Komura et al. 2008) (Vera-Sirera 2011)]. Pero es posible descartar que la interacción DELLA-AJAX tenga un papel importante en el proceso de iniciación del crecimiento secundario por varias razones, como por ejemplo la imposibilidad de que la expresión aumentada de AJAX3 rescate el fenotipo de falta de iniciación de vasculatura durante la floración de mutantes deficientes en GAs. Entre los factores de transcripción que se han descrito con un papel importante en la iniciación del desarrollo de la vasculatura, los candidatos más probables, a priori,

serían ATHB8 (Baima, Possenti et al. 2001) y DOF5.6/HCA2 (Guo, Qin et al. 2009). Los dos son necesarios en la etapa de iniciación, y aunque no se ha comprobado si interaccionan físicamente con las DELLAs, sí que se han encontrado miembros de ambas familias estructurales (HD-ZIP y DOF) entre los interactores de RGA (Marinde la Rosa, Sotillo et al. 2014). Por otra parte, sí que se ha demostrado la interacción física entre las DELLAs y varios TCPs de clase I como TCP15 (Daviere, Wild et al. 2014), y este factor de transcripción es necesario para promover las divisiones celulares que se necesitan en la región vascular durante su desarrollo (Li, Li et al. 2012).

El segundo aspecto que requiere trabajo adicional es la aparente preferencia de las DELLAs por AJAX1/SAC51, AJAX3 y AJAX4, sobre AJAX2, así como la capacidad de los AJAX de interaccionar entre sí. Ninguna de estas observaciones parece tener una explicación en este momento. La interacción entre los AJAX podría ser simplemente una consecuencia intrascendente de su estructura física, ya que es una propiedad bastante común entre los bHLHs. Incluso habiendo perdido la capacidad de interaccionar con el DNA (por tener un dominio básico poco definido), la estructura HLH podría ser suficiente para la formación de homo- y heterodímeros entre AJAX. Por otra parte, se ha demostrado que AJAX1/SAC51 actúa en la maduración del xilema (Imai A. 2006) igual que AJAX2 y AJAX3 (Vera-Sirera, F. Tesis Doctoral), mientras que AJAX4 no parece tener un papel funcional en este proceso. Por eso, la preferencia de las DELLAs por varios de estos AJAX, pero no de AJAX2 es en cierto modo sorprendente. Aunque el análisis de expresión y la localización de fusiones con GFP indica que los AJAX y las DELLA tienen dominios solapantes, es posible que un análisis de mayor resolución revelase que no son exactamente los mismos tipos celulares en los que se expresan los cuatro AJAX, y es posible que entonces las DELLAs sólo solapen con los AJAX con los que mantiene su capacidad de interacción, explicando así cómo las DELLAs podrían intervenir en ciertos momentos y en ciertos tipos celulares, y no en otros.

Por último, es importante señalar que todos los análisis efectuados se refieren a la formación del xilema en la parte aérea de la planta, pero tanto los AJAX como ACL5 se expresan también en las raíces. Por lo tanto, queda en el aire la cuestión de si también en la vasculatura de la raíz tiene relevancia la interacción DELLA-AJAX. Las DELLAs ya se ha demostrado que cumplen diversos papeles en el desarrollo y en la fisiología de la raíz (p.ej. la expansión celular y la respuesta gravitrópica) [(Fu and Harberd 2003) (Ubeda-Tomas, Swarup et al. 2008) (Lofke, Zwiewka et al. 2013)], por lo que es probable que todo lo aquí expuesto esté también ocurriendo durante el desarrollo vascular en la raíz.



**Figura 24. Modelo que representa la interacción de dos rutas de regulación diferentes, Las rutas de señalización por GAs y la regulación por termoespermina interconectadas por la interacción DELLA-AJAX. Las líneas solidas representan rutas con elementos ya establecidos. Las líneas discontinuas denotan rutas de regulación compuestas de distintos niveles.**



## **5. CONCLUSIONES**



Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis nos han permitido aportar evidencia genética, molecular y funcional acerca del importante papel que presentan las giberelinas en la regulación del proceso de maduración del xilema, por lo tanto.

1. Las giberelinas no son sólo importantes para promover el crecimiento secundario durante la transición floral, sino también para asegurar la correcta diferenciación del xilema eliminando la actividad represora de las DELLA sobre las proteínas AJAX.
2. El mecanismo por el que las giberelinas regulan la maduración de las células del xilema podría ser a través del control de la actividad del módulo DELLA-AJAX3-LHW.



## **6. *MATERIALES Y MÉTODOS***



## 6.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Landsberg *erecta* (L-er) y Columbia (Col-0).

Línea	Fondo genético	Procedencia	Comentario/referencia	
Col-0				
L-er				
<i>acl5-4</i>	L-er			
<i>acl5-4/ajax3-18</i>		Vera-Sirera. IBMCP	<i>Sin publicar</i>	
<i>gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1 rgl3-1 (della KO)</i>				
<i>acl5-4 gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1</i>		El autor		
<i>ga1-3</i>				
<i>ga1-3 35S::AJAX3</i>		El autor		
<i>pACL5::GFP::gai-1</i>		El autor		
<i>pAthb8::GFP::gai-1</i>		El autor		
<i>proGAI::GUS 5-4-1</i>		Col-0	Tai-Ping Sun Lab. Duke University	(Gallego-Giraldo, Hu et al. 2014)
<i>proGAI::GUS 4-10-1</i>				
<i>proRGA::GUS 1-3-1</i>	L-er			
<i>proRGA::GUS 10-2-1</i>				
<i>proACL5::GUS</i>	Col-0	Hannelle Touminen Lab. Umea Plant Science Centre. Umea University	(Muniz, Minguet et al. 2008)	
<i>probHLH142:(n3)GFP</i>	Col-0	Dolf Weijers Lab. Wageningen University	<i>Sin publicar</i>	
<i>probHLH143:(n3)GFP</i>				
<i>probHLH144:(n3)GFP</i>				
<i>probHLH145:(n3)GFP</i>				

Tabla 1. Líneas mutantes y transgénicas utilizadas durante el desarrollo de esta tesis.

### Cruces genéticos

Polen del mutante *acl5-4* se utilizó para fertilizar flores del mutante *dellaKO*; la población F1 presentó fenotipo silvestre debido a la complementación génica de ambos parentales, posteriormente se analizaron fenotípicamente 596 plantas F2

las cuales presentaron fenotipos segregantes de distintos tamaños. Se escogieron 144 plantas (24%) de fenotipo enano para coleccionar material y empezar el proceso de genotipado. De todas ellas 42 (29,2 %) fueron homocigotas *gai-t6*, de las cuales 12 fueron a su vez homocigotas *rga-t2* (28,6 %), y finalmente de estas 12 solo dos (17%) también homocigotas *rgl1-1* y *rgl2-1*. Adicionalmente se genotipo la generación F3 para recomprobar el quíntuple mutante obtenido.

### Condiciones de cultivo

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 12 cm o en bandejas de alveolos, según el caso. El sustrato utilizado era una mezcla de turba, perlita y vermiculita en una proporción 1:1:1. El riego se hizo con la solución nutritiva descrita en la Tabla 2. La temperatura se mantuvo en 22°C durante el día y 19°C durante la noche. El fotoperiodo consistió de un día largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Compuesto	Dosis (g/L)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,15
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,82
K NO <sub>3</sub>	0,2
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,35
Mg SO <sub>4</sub>	0,24
BMX (Micronutrientes)	0,1

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva utilizada en el riego de invernadero.

### Tratamientos hormonales

Para inhibir la biosíntesis de GAs en condiciones tanto in vitro como en invernadero se utilizó PAC (Duchefa) a una concentración final de 1 µM y 10 µM

respectivamente. En plantas cultivadas en tierra se diluyó el PAC en solución nutritiva aplicando el tratamiento una vez por semana.

El tratamiento con GA<sub>3</sub> se realizó a una concentración de 50 µM en condiciones de invernadero una vez cada semana.

## 6.2 Microscopía

### Microscopía estereoscópica

Para observar tejidos con bajo aumento (entre 5 y 20 aumentos) se utilizó una lupa binocular *Leica MZ16F*, que está acoplada a una cámara digital *Leica DFC300 FX*. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software *LAS (Leica Application Suite)* versión 2.6.0 R1.

### Microscopía óptica

Los cortes histológicos y cortes de tejidos en fresco, se analizaron bajo el microscopio óptico Nikon Eclipse E600, en donde se utilizó iluminación de campo claro y la técnica de Normaski o D.I.C. (contraste diferencial por interferencia). El microscopio está acoplado a una cámara digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1). Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software de análisis de imagen NIS-Elements F3.0.

### Microscopía confocal

Para esta técnica se utilizó un microscopio confocal *Leica TCS SL*, consistente en un microscopio invertido DMIR2 y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de láser (458 nm, 488 nm, 514 nm y 534 nm). Para excitar la GFP, se utilizó un láser de 488 nm, y la emisión se recogió entre 500 nm y 520 nm (máximo de emisión: 509 nm). La clorofila se excitó con el mismo láser, y su emisión se recogió entre 660 nm y 690 nm. La identidad de la señal se

confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda ( $\lambda$ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

### **Tinción con toluidina**

Los cortes se dispusieron en portaobjetos tratados con poli-lisina, se tiñeron con toluidina 0.5% durante un minuto y luego se lavaron con abundante agua. Finalmente los cortes se montaron con Merckglass (Merck®) y se visualizaron mediante microscopía óptica.

### **Fijación de tejidos e inclusión en parafina**

Hipocótilos de 30 días se fijaron con una solución de FAE (formaldehído 3.7%; ácido acético 5%; etanol 50%; H<sub>2</sub>O) utilizando una bomba de vacío, a continuación se utilizó el procesador de tejidos (Leica TP1020) el cual se programó siguiendo las instrucciones del fabricante para pasar secuencialmente los tejidos por soluciones crecientes de etanol 70%, 95%, 100% para deshidratar la muestra (en la segunda concentración de 95% las muestras se tiñeron con Eosina-Y al 0,2%) y luego por soluciones crecientes de Histo-Clear® (National Diagnostics); etanol de 25;75, 50;50, 75;25, 100;0 (%v/v) para finalmente incluirlas en parafina 100% parafina Paraplast® Plus (McCormick Scientific) a 58°C utilizando vacío. Tras la inclusión en parafina las muestras se colocaron en moldes de aluminio con parafina líquida, se cubrieron con un soporte plástico y se dejaron solidificar a 4°C.

Se realizaron cortes transversales de los hipocótilos de 10  $\mu$ m de grosor utilizando un micrótopo *Microm HM330* ubicándolos en portaobjetos cubiertos con poli-lisina que posteriormente se desparafinaron con histoclear y se hidrataron con dosis decrecientes de etanol 100%, 75%, 50%, 25% y H<sub>2</sub>O para poder realizar hibridaciones y distintos tipos de tinción.

### 6.3 Microorganismos

#### Bacterias

Las cepas bacterianas que se han utilizado en este trabajo se detallan en la tabla 3.

Microorganismo	Cepa	Método de transformación	Temperatura
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	Choque térmico	37°C
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Electroporación	37°C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58	Electroporación	28°C

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas

#### Medio de cultivo para bacterias

Medio LB (Luria-Bertani): 1% triptona. 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7,0. En los casos donde se utilizaba el medio sólido se adicionaba 1,5% de agar bacteriológico (Pronadisa).

#### Transformación de cepas bacterianas

Para la transformación de células bacterianas se descongeló en hielo una alícuota de 40 µL de células competentes, a la cual se le adicionó 1 µL del plásmido llevando la construcción de interés. La cepa de *E. coli* fue transformada siguiendo el protocolo de choque térmico proporcionado por el fabricante (Invitrogen®). En el caso de las cepas de *E. coli* DH5α y *A. tumefaciens* C58 la transformación se llevó a cabo por electroporación. Tras añadir el DNA plasmídico a la alícuota de células competentes, la mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación (BioRad®) previamente enfriada en hielo, luego se aplicó un pulso eléctrico a través del equipo Gene Pulse (BioRad®). Para la cepa DH5α las condiciones de electroporación fueron 200 Ω, 25 µF y 1,8 kV y para *A. tumefaciens* 400 Ω, 25 µF y 1,8 kV.

En los todos los casos las células bacterianas transformadas se resuspendieron en 700 µL de medio LB sin antibióticos, y se incubaron en agitación constante durante 1h a 37°C, para *E.coli* y 2h a 28°C para *A. tumefaciens*. Tras la incubación sin presión

de selección, las células bacterianas se plaquearon en medio LB suplementado con antibiótico, con el fin de seleccionar las células transformadas.

#### **6.4 Amplificación y purificación y de ácidos nucleicos**

##### **Extracción de DNA plasmídico**

Para la extracción de DNA plasmídico se partió de 2 ml de cultivo crecidos durante una noche en LB suplementado con antibiótico, posteriormente se siguió el protocolo establecido de extracción y purificación de DNA plasmídico del sistema *E.Z.N.A plasmid miniprep Kit OMEGA Bio-tek*.

##### **Extracción de DNA genómico**

Para el genotipado de las plantas, se tomaron 300 mg de hojas jóvenes, que se maceraron en 500  $\mu$ l de tampón de extracción (0,2M Tris-HCL pH 9,0; 0,4 M LiCl; 25 mM EDTA; 1% v/v SDS). Tras una centrifugación de 5 min a 13.000 r.p.m., 350  $\mu$ l del sobrenadante se transfirieron a un tubo eppendorf que contenía 350  $\mu$ L de isopropanol y la mezcla se centrifugó por 10 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) 2 veces, se dejó secar y se resuspendió en 200  $\mu$ L de agua destilada. La cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

##### **Amplificación de ácidos nucleicos**

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó a partir de 50 ng de ADN molde. La mezcla de reacción contenía 0.4  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos específicos del fragmento a amplificar, 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 5  $\mu$ l de tampón de reacción 10X, 1,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50 mM y 1,25 unidades de ADN polimerasa (Extaq Takara) en un volumen final de 50  $\mu$ l. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador en las siguientes condiciones: una incubación inicial de 94°C 2 min; seguida de 30 - 35 ciclos de amplificación y una incubación final de extensión. Cada ciclo de amplificación consistió en tres etapas: la primera de desnaturalización 94°C

durante 30 s; luego una de anillamiento de 30 s a la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos utilizados (T), la cual se consideró en función de la temperatura de fusión estimada ( $T_m$ ) de cada uno de ellos (ver Tabla 2); y la tercera etapa de 72°C durante 30 s que corresponde a la extensión.

### **Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las digestiones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 ml con 5-10 U de la enzima / 1 µg DNA. En cada reacción la enzima iba acompañada de su respectivo tampón según las condiciones recomendadas por la casa comercial. La incubación se realizó en un termobloque durante dos horas a 37°C. Después de la incubación, la digestión se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### **Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos**

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8-5 % (p/v) en tampón TBE1X (Tris 0,89 M; ácido bórico 0,89 M; EDTA 2 mM (pH=8,0)), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v); azul de xilencianol 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v)) hasta una concentración final 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante durante el tiempo necesario. Además, los geles contenían 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta.

Para la purificación de fragmentos de DNA, las bandas se observaron bajo luz ultravioleta y se cortaron del gel con ayuda de una cuchilla. La purificación de DNA se llevó a cabo mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit® (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **6.5 Técnicas de clonación**

### **Plásmidos utilizados**

En este trabajo se utilizaron distintos plásmidos en función del objetivo de cada experimento. En la tabla 3 se detalla la lista de plásmidos, con sus características, procedencia y uso que se le ha dado.

Plásmido	Características	Referencia/ procedencia	Uso
<i>pCR8/GW/TOPO</i>	<i>Spec</i> <sup>R</sup> ; promotor T7, sitios M13; sitios attL1 y attL2	Invitrogen™	Ligación de productos de PCR, vector de entrada a la tecnología Gateway
<i>pDEST32</i>	Gen <sup>R</sup> ; dominio de unión a ADN GAL4; <i>LEU2</i> ; sitios attL1 y attL2	Invitrogen™	Análisis de doble híbrido en levadura
<i>pDEST22</i>	Amp <sup>R</sup> ; dominio de activación GAL4; <i>TRP1</i> ; sitios attL1 y attL2	Invitrogen™	Análisis de doble híbrido en levadura
<i>pEarleygate104</i>	Kan <sup>R</sup> ; gen reportero <i>YFP</i> ; attR1 y attR2	Earley <i>et al.</i> , 2006	Fusión traduccional YFP, vector de expresión en planta.
<i>pEarleygate202</i>	Kan <sup>R</sup> ; gen reportero <i>YFP</i> ; attR1 y attR2		Fusión traduccional FLAG, vector de expresión en planta.
<i>pEarleygate203</i>	Kan <sup>R</sup> ; gen reportero <i>Myc</i> ; attR1 y attR2		Fusión traduccional MYC, vector de expresión en planta.
<i>pSBRIGHT</i>	Kan <sup>R</sup> ; gen reportero <i>GFP</i> ; attR1 y attR2, BASTA <sup>R</sup> .	Bensmihen <i>et al.</i> , 2004	Fusión traduccional YFP, vector de expresión en planta.
<i>pGreenII 0800-LUC</i>	Kan <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> ; gen reportero <i>LUC</i> ; attR1 y attR2, BASTA <sup>R</sup> .	Hellens <i>et al.</i> , 2005	Fusión de promotores al gen LUC (luciferasas), vector de expresión en planta.

Tabla 4. Plásmidos utilizados. Los sitios *attL* y *attR*, son sitios de recombinación homóloga correspondientes a la tecnología Gateway<sup>R</sup>. Los antibióticos a los cuales confiere resistencia el plásmido, se indican como: espectinomomicina (*Spec*), kanamicina (*kan*) y ampicilina (*Amp*).

### Ligación de fragmentos mediante la técnica de recombinación homóloga Gateway (Invitrogen™)

La tecnología Gateway se basa en las propiedades de recombinación sitio específicas del bacteriófago *lambda*, el cual contiene sitios de recombinación bien

caracterizados conocidos como *att* (site-specific *ATTachment*). En primer lugar los productos de PCR amplificados se clonaron en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO TA® (Invitrogen™, EUA), el cual contiene las secuencias de recombinación attL1 y attL2 y dos sitios EcoRI, que flanquean el fragmento de interés. Posteriormente, los clones obtenidos se mandaron secuenciar, para verificar su calidad y determinar la orientación del fragmento respecto al promotor T7 del vector. Una vez se determinó la orientación del fragmento clonado, este se incorporó en los vectores de destino del sistema Gateway que contiene dos lugares de recombinación attR1 y attR2 mediante una reacción de recombinación catalizada por la enzima LR Clonasa (Invitrogen™).

### **Secuenciación**

La secuenciación de fragmentos se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia – CSIC), donde se utilizó un secuenciador capilar ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores usados se indican en la tabla 5.

Proceso	Producto	Nombre	Secuencia
Doble híbrido en levadura	DEL2AJAX3	AJXDEL213Forward	ATGTCTATGGATGCAGAGCGAGGG AACATT
	C-terAJAX3	AJAX3C-terminal Forward	ATGCTACTGGACCATTTCGTACAGAG A
		AJAX3C-terminal Reverse	TCACCAATGGTTATTCAAACCCTTTG ATG
	N-terAJAX3	AJAX3N-terminal Forward	ATGCCTCTTGATACCAAACAGCAGA
		AJAX3N-terminal Reverse	TCATTTCTGTCTTTAAGAAGTGGAC CAT
	Hibridación <i>in situ</i>	Sonda GAI	5GAIC Forward
3GAID Reverse			TAAATCCGCCGCGGAGAG
Sonda AJAX3		AJAX3 <i>insitu</i> Forward	AAAACCTACAACCCCTTTGTCTTAT TGAT
		MPA062Reverse	GCCTTTGAAGAGCTTAAGAGCCAGA G
proAthb8:: <i>GFP::gai-1</i>	Promotor Athb8	SpelpAthb8Forward	ACTAGTGACGATAATGATGATAACT AC
		SpelpAthb8Reverse	ACTAGTCTTTGATCCTCTCCGATCTC TC
proACL5:: <i>GFP::gai-1</i>	Promotor ACL5	HindIIIpACL5Forward	AAGCTTCCACCATCGAATGGTATGC A
		HindIIIpACL5Reverse	AAGCTTACGGCTTACCATCCAAGTT
Genotipado	<i>acl5-4</i>	FVS013	GTCGAGAGGGGAACTGACAAGTGT ACA
		FVS017	CTCCACCCAAAATCTCAGTCTTGT
	ACL5	MPA111	GCAAATGATGGCACATGTGCTGTGT AA
	<i>gai-t6</i>	gai-t6 - 300	CTAGATCCGACATTGAAGGCA
		GAI-304	TCGGTACGGGATTTTCGCAT
	GAI	GAI-302	AGCATCAAGATCAGCTAAAG
	<i>rga-24</i>	rga24-219B	CAAAAGTTGTTCCGGCGGTT
		220B	GGTTTCATCCCTTTGACGCCAAACA
	RGA	rga24-212	GGTGATTTTCACGGTGGTTG
	<i>rgl1-1</i>	1670F	AAGCTAGCTCGAAACCCAAAT
		DS5-P1	GTGACTCCGGGTCGGGTAC
	RGL1	2295R	CAATAGGAGATGCGGAGACACC
	<i>rgl2-1</i>	856F	GCTGGTGAACGCGTGGGAACA
		DS3-2	GCTTTTGCCCTATATGGCC
	RGL2	1883R	GTGAGTAGTGTGGAGCCGCA

Tabla 5. Listado de oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

## 6.6 Hibridación *in situ*

### Generación de sondas marcadas con digoxigenina

A partir de ADN genómico se generaron dos fragmentos de 782 pb y 598 como molde para la ribsonda de GAI y AJAX3 pertenecientes a zonas específicas, estos fragmentos fueron clonados en el vector pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen™, EUA). La amplificación de los fragmentos se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos M13 directo y reverso propios del vector, posteriormente los fragmentos amplificados se purificaron y se utilizaron como moldes para cada sonda. Se transcribió la sonda en “antisentido” desde el promotor T7 del vector, y como control negativo frente a hibridaciones inespecíficas se generó una sonda en “sentido”.

En la transcripción *in vitro* se preparó una reacción de 20  $\mu$ l que contenía 200 ng de molde de cDNA amplificado, 2  $\mu$ l de DIG RNA Labeling Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP. Roche®), 2  $\mu$ l de inhibidor de RNasas (Protector RNase Inhibitor, Roche®) 2  $\mu$ l de T7 RNA polimerasa y 2  $\mu$ l de tampón 10X (Roche®). Esta reacción se incubó durante 2 h a 37°C. Tras la incubación cada sonda se trató con 1  $\mu$ l de DNasa I libre de RNasa (Roche®) durante 15 min a 37°C. Para detener la reacción se adicionaron 2  $\mu$ l de EDTA 0,2M y luego se añadió 1  $\mu$ l de tRNA de levadura (10  $\mu$ g/  $\mu$ L, Roche®). La precipitación se realizó en 10  $\mu$ l de LiCl 1M y 75  $\mu$ l de etanol 100% y se almacenó a -20°C toda la noche. Al día siguiente las sondas se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 15 min, se lavaron en etanol 80% y una vez secas se resuspendieron en 10  $\mu$ l de agua desionizada estéril libre de RNasas. Para la cuantificación de la sonda se utilizó 1  $\mu$ l y los 9  $\mu$ l restantes se resuspendieron en 91  $\mu$ l de tampón de hibridación que inmediatamente se guardó hasta su uso a -20°C.

### **Cuantificación de la sonda**

La cuantificación de la sonda se realizó mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos tipo “*dot blot*”. A partir de 1 µl de la sonda sintetizada se prepararon diluciones 1/25, 1/100 y 1/250. 1 µl de cada dilución se dispuso en una membrana de nylon (Hybond N+), que se secó y se fijó con luz ultravioleta. Como control de la cuantificación se utilizó un RNA marcado con Digoxigenina de concentración conocida (Roche®) para el cual se prepararon las mismas diluciones y se dispusieron en la misma membrana. La membrana se incubó durante 2 min en TBS 1X (TBS 10X: 1M Tris-HCl; 4M NaCl a pH 7,5) y posteriormente se bloqueó en *Blocking Reagent* 0,5% (Roche®) en TBS 1X durante 10 min. Posteriormente, la membrana se lavó en la solución de BSA (BSA 1%; Tritón X-100 0,3%; en TBS 1X) durante 5 min y se incubó durante 20 min con el anticuerpo anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche®) diluido en la solución de BSA a una concentración 1:3000. Las trazas de anticuerpo se lavaron con la misma solución sin anticuerpo 2 veces durante 4 min cada una. Tras el lavado se adicionó el tampón de detección (100 mM Tris; 100 mM NaCl; 50 M MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5) y se reveló en 2,5 ml de tampón de detección 1X con sustrato (3,75 µL de NBT (100 mg/ml) y 3,75 µl de BCIP (50 mg/ml) de Roche®) incubando por 12 min en oscuridad. Finalmente se enjuagó con agua destilada estéril y se dejó secar. La dilución que se usó era la que mostraba una señal similar a la penúltima gota de la línea control.

### **Prehibridación e hibridación**

Las muestras se fijaron y se incluyeron en parafina como se describió en los apartados 2.1 y 2.3, respectivamente. Los cortes histológicos colocados en portaobjetos se desparafinaron con Histo-Clear®, y se hidrataron en series decrecientes de etanol (100%, 95%, 70%, 50%, 30% y agua) dos min en cada una. Posteriormente los cortes se hidrolizaron en HCl 0,2 M durante 20 min, después se

hicieron 4 lavados de 5 min cada uno, uno con agua ultrapura, dos con SSC 2X (SSC 20X: 0,3 M Citrato de sodio; 3 M NaCl a pH 7,0) y otro nuevamente con agua ultrapura. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 18 min con Proteínasa K (1 µg/ml en tampón: Tris 100mM; EDTA 50mM pH 8,0). Tras la incubación los cortes se lavaron por 2 min con PBS 1X (PBS 20X: 2,75 M NaCl; 50mM KCL; 200mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 35 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) y para el bloqueo de la proteínasa K se utilizó glicina 0,2% (2mg/ml de PBS 1X) por 2 min seguido de dos lavados con PBS 1X por 2 min. Para refijar el tejido se utilizó una solución de formaldehído 4% en PBS en donde los portaobjetos permanecieron 10 min. Se lavaron nuevamente con PBS y por último el tejido se deshidrató en series crecientes de etanol de 2 min cada una (agua ultra pura, 30%, 50%, 70%, 95% y 100%) y se dejaron secar.

Para la hibridación, las sondas se diluyeron en tampón de hibridación (TH: SSC 6X; 1,5 % SDS; 50% formamida; tRNA de levadura 100 µg/ml) a razón de 4 µl sonda / 50 µl de TH. Las sondas se desnaturalizaron a 80°C durante 2 min. Luego se pusieron 50 µl de la solución de hibridación en cada portaobjeto y se colocó un cubreobjetos sobre cada uno. La hibridación se llevó a cabo durante una noche en cámara húmeda a 50°C.

### **Lavados e Inmunodetección colorimétrica**

Se realizaron tres lavados en SSC 2X con 50% de formamida (v/v) a la temperatura de hibridación 50°C, el primero de 30 min y los dos siguientes de 1 h y 30 min cada uno. Tras los lavados los portaobjetos se incubaron en TBS 1X durante 5 min y posteriormente 1h en *Blocking Reagent* (Roche®) 0,5% en TBS 1X. Tras el bloqueo los portaobjetos se lavaron en la solución de BSA (BSA 1%; Tritón X-100 0,3%; en TBS 1X) durante 30 min y después se incubaron con el anticuerpo anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments de Roche® diluido en la misma solución anterior (1:3000). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 20 min cada uno con la solución de BSA. Tras los lavados los portaobjetos se sumergieron en el tampón de detección (100

mM Tris, 100 mM NaCl, 50 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) en donde se incubaron 5 min, esta solución se reemplazó por 50 ml del tampón de detección que contenía el sustrato (75 µL de NBT (100 mg/ml) y 75 µL de BCIP (50 mg/ml) de Roche®). La incubación en oscuridad duró un tiempo superior a 18 horas, hasta que se observó la señal. Finalmente la reacción se detuvo cambiando la solución de detección por agua. Las muestras se dejaron secar, se montaron con Merckglass (Merck®) y se visualizaron bajo microscopio óptico.

### 6.7 Análisis de la actividad β-glucoronidasa (GUS)

Las muestras se recolectaron y se fijaron inmediatamente en acetona 90% fría durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se hicieron dos o tres lavados con la solución de revelado sin el sustrato (Tabla 5), después se sumergieron en la solución con sustrato y se aplicaron 3 pulsos de vacío de 5 min cada uno, y se incubaron a 37°C durante 16 horas (aproximadamente). Finalmente el tejido se lavó con concentraciones crecientes de etanol (15, 30 y 50 %). La fijación de las muestras se realizó con FAE (50% etanol absoluto; 10% ácido acético glacial; 5% formaldehído) aplicando nuevamente tres pulsos de vacío de 5 min, y dejándolos 16 horas a 4°C. Finalmente las muestras se llevaron a etanol al 70% y se guardaron a 4°C hasta su uso. Según el caso, algunas muestras fueron incluidas en parafina (ver apartado 4,3) y a otras se les hizo un clareado con el reactivo de Hoyer.

Componente	Concentración
Tampón fosfato sódico pH:7,0	50mM
Ferricianuro de potasio	0,5 a 1mM
Ferrocianuro de potasio	0,5 a 1mM
Tritón -X-100	0,1% v/v
EDTA	10mM
X- gluc*	2mM

Tabla 5. Solución de revelado utilizada en la tinción GUS. El asterisco (\*) señala el sustrato.

## 6.8 Transformación genética

### Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

La cepa utilizada para la transformación fue *A. tumefaciens* C58i que contenía las construcciones de interés. El cultivo bacteriano se incubó a 28°C en oscuridad y agitación constante, en medio LB suplementado con los respectivos antibióticos (dependiendo del vector utilizado) como presión de selección. Al siguiente día se transfirieron 200 µl del cultivo bacteriano a 200 ml de medio LB suplementado con acetosiringona a una concentración de 200 µM, manteniendo las mismas condiciones de incubación, hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,2-0,3, correspondiente a una concentración de inóculo de 10<sup>-2</sup> – 10<sup>-3</sup> UFC/ml.

### Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* se utilizó el ecotipo silvestre Landsberg *erecta* (L-*er*). La transformación se realizó según el protocolo de infiltración descrito por Bechtold (1998) con algunas modificaciones (Bechtold and Pelletier 1998).

En primer lugar, se sembraron 20 semillas de *Arabidopsis* en macetas de 12 cm de diámetro en condiciones de día largo. Tras 4 semanas de cultivo aproximadamente, las plantas presentaban la primera inflorescencia y ya estaban listas para ser transformadas.

Tres días antes de la infiltración, se preparó un pre-cultivo de 10 ml de *A. tumefaciens* cepa C58 que llevaba la construcción de interés. El medio se suplementó con los antibióticos indicados y se incubó durante una noche a 28°C. Al día siguiente se preparó un cultivo de 1L de LB, suplementado con los antibióticos correspondientes, el cual se inculó con los 10 ml del pre-cultivo y se incubó

durante 48 horas a 28°C en agitación. Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 15 min. El sedimento se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2,2 g/L MS; sacarosa 5% (p/v); 0,5 g/l MES; 0,03% Silwet L-77; a pH 5,7). Las plantas se sumergieron en la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración durante 5 min aproximadamente. Posteriormente las plantas se secaron ligeramente en un papel absorbente, y se cubrieron con bolsas de plástico. Luego se llevaron al invernadero y un día después se les retiró el plástico. Las plantas permanecieron en el invernadero hasta la recolección de las semillas. Una vez recolectadas las semillas se secaron a 37°C durante 5 días.

### **Selección de transformantes**

Para la selección de transformantes primarios las semillas se esterilizaron en una solución con 30% lejía y 0,01% de Tritón X-100, durante 10 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua estéril para eliminar la solución anterior. Las semillas se sembraron en el medio de germinación suplementado con kanamicina (2,2 g/l MS; 20g/l sacarosa; con 0,6 % agar; 100 mg/L kanamicina; pH: 5,9). Las semillas se estratificaron a 4°C durante 5-7 días, y luego se incubaron en condiciones de fotoperiodo estándar, i. e. 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad a  $26 \pm 2$  °C. Después de 7-10 días, las plantas resistentes a la kanamicina eran pasadas al invernadero en las condiciones normales de cultivo, allí permanecían hasta la obtención de semillas. Cada planta era considerada una línea transgénica independiente (T1).

Para la selección de líneas con una sola inserción de T-DNA, 100 semillas provenientes de cada planta T1, se esterilizaban y se sembraban en el medio de germinación suplementado con kanamicina. Tras 10 días se realizaba el conteo de plantas resistentes y plantas sensibles. De esta manera se identificaban las líneas que presentaban una segregación 3:1 (Resistentes: Sensibles), y por tanto una única

inserción. Las plantas resistentes (T2) eran pasadas al invernadero hasta la obtención de semillas.

Para la selección de plantas transgénicas homocigotas, se tomaban 100 semillas de las plantas T2. Estas semillas nuevamente se sembraban en el medio de germinación suplementado con kanamicina, y en esta ocasión se seleccionaban las líneas que presentaran el 100% de plantas resistentes (T3).

### **Expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana***

Para este ensayo se utilizó la gama de vectores pEARLEYGATE dependiendo de las etiquetas necesarias. Posteriormente cada construcción se introdujo en la cepa bacteriana C58 de *A. tumefaciens* por separado. Se realizó un experimento por cada construcción. En primer lugar la bacteria llevando la construcción de interés, se cultivó en medio LB suplementado con los antibióticos de selección, a 28°C durante 16 horas. Al siguiente día, se midió la Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) a 600 nm, y a partir del resultado se hicieron los cálculos para obtener una OD<sub>600</sub> de 0,3, diluyendo con medio líquido LB. El cultivo (a la concentración adecuada) se centrifugó a 5000 r.p.m durante 5 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2ml de la solución de infiltración (1mM MES; 0,1mM MgCl<sub>2</sub>; Acetosiringona 200µM). La incubación se realizó a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación constante durante dos horas. Posteriormente con una jeringuilla sin aguja, se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* por el envés, en total se agroinfiltraron 3 hojas por cada planta (de 3 semanas de edad). Después de dos días, se tomaron porciones circulares de hojas agroinfiltradas de aproximadamente 1 cm de diámetro, se montaron en portaobjetos con agua, y finalmente se observaron en el microscopio confocal (Ver apartado 5.3).

### 6.9 Doble híbrido en levadura Y2H

Para el ensayo de interacción de doble híbrido en levadura se utilizaron las versiones delecionadas M5GAI y RGA52 introducidas en el vector pDEST32 permitiendo la fusión con el dominio de unión a ADN de GAL4 (GAL4-DBD) generando los vectores tipo presa (Gallego-Bartolomé J. 2012). Las secuencias codificantes de los genes AT5G64340 (*SAC51*), At1g29950 (*AJAX2*), At5g09460 (*AJAX3*) y At5g50010 (*AJAX4*) y las deleciones de *AJAX3* fueron ligadas al *pCR8.0/GW/TOPO* e introducidas por Gateway en el vector pDEST22 para lograr la fusión con el dominio de activación de GAL4 (GAL4-AD) y generando así los vectores tipo cebo. Todas las construcciones se introdujeron en la cepa de levadura AH109 (Clontech). El análisis de interacción se realizó en un medio SD; las colonias positivas se seleccionaron en ausencia de triptófano, leucina e histidina. El medio se suplementó con el inhibidor del gen testigo *HIS3* 3-amino-1, 2, 4 triazole [(3- AT) (Sigma-Aldrich)] para analizar la fuerza de la interacción.

### 6.10 Coinmunoprecipitación de proteínas (coIP)

Para los ensayos de coinmunoprecipitación de proteínas (co-IP), las secuencias codificantes de M5GAI y AJAX3 se transfirieron a los vectores pEarleyGate203 y pEarleyGate104 (Earley K W. 2006) para crear las fusiones Myc-M5GAI y YFP-AJAX3 respectivamente. Los vectores que expresan estas proteínas de fusión están basados en el promotor constitutivo 35S. Cada construcción se introdujo en la cepa C58i de *Agrobacterium tumefaciens* que fue posteriormente usada para infiltrar las hojas de *N. benthamiana*.

### Extracción de proteínas

Tejido congelado de hojas de *N. benthamiana* se homogenizó en 1.5 volúmenes del tampón de extracción [Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, glicerol 10%, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 0.1 %] suplementado con inhibidores de proteasas: PMSF (fluoruro

de fenilmetilsulfonilo) 1mM y una mezcla completa de inhibidores de proteasas 1X (Roche). Los extractos se centrifugaron durante 15 minutos a 13,000 x g a 4°C. Las proteínas solubles totales se cuantificaron por el método Bradford.

### **Inmunoprecipitación de proteínas**

Cuarenta microgramos de proteína soluble total se reservaron para el input, y 600 µg se incubaron con 50 µl de bolas paramagnéticas (Miltenyi Biotec) en hielo durante 30 minutos en un volumen total de 1.5 ml. Los extractos fueron cargados a temperatura ambiente en µ columnas (Miltenyi Biotec) previamente lavadas con el tampón de extracción. Las columnas se mantuvieron a temperatura ambiente y se lavaron cuatro veces con tampón de lavado 1 [Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM, NaCl 250 mM, y Nonidet P-40 1% (v/v)] y una vez con 100 µl del tampón de lavado 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Las proteínas se eluyeron en 50 µl tampón de elución denaturante siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas inmunoprecipitadas se corrieron en 8% SDS/PAGE y posteriormente fueron transferidas a una membrana de PVDF y detectadas con anticuerpos anti-GFP y anti-MYC.

### **6.11 Extracción de elementos del xilema**

Para el análisis de los elementos individuales del xilema los hipocotilos se colectaron de plantas luego de haberse cumplido la floración. Los tejidos se incubaron a 95 °C en una solución de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/50% ácido acético durante cuatro horas, luego se lavaron 3 veces con agua destilada seguido de la neutralización adicionando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M en el último lavado. Las muestras fueron disgregadas mecánicamente y almacenadas indefinidamente a 4°C. Las suspensiones celulares fueron teñidas con 0.01% de Cellfluor (Polysciences) y examinadas bajo luz ultravioleta con un microscopio de luz. Para cada línea se analizaron 3 plantas y se

contaron alrededor de 200-300 elementos/planta para analizar su longitud, grosor y patrón de deposición de pared secundaria.

### **6.12 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en los análisis de luciferasa se analizaron mediante el programa STATGRAPHS Centurion XVI versión 16.1.15 <http://statgraphics.softonic.com/>. Al comparar más de dos muestras, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) considerando un valor de  $P < 0.05$ . En este caso el método empleado para discriminar entre medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de fisher (Hayter 1986).





## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Achard, P. and P. Genschik (2009).** "Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins." *J Exp Bot* **60**(4): 1085-1092.
- Achard, P., J. P. Renou, R. Berthome, N. P. Harberd and P. Genschik (2008).** "Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species." *Curr Biol* **18**(9): 656-660.
- Alcazar, R., T. Altabella, F. Marco, C. Bortolotti, M. Reymond, C. Koncz, P. Carrasco and A. F. Tiburcio (2010).** "Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance." *Planta* **231**(6): 1237-1249.
- Arnaud, N., T. Girin, K. Sorefan, S. Fuentes, T. A. Wood, T. Lawrenson, R. Sablowski and L. Ostergaard (2010).** "Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*." *Genes Dev* **24**(19): 2127-2132.
- Bai, M. Y., J. X. Shang, E. Oh, M. Fan, Y. Bai, R. Zentella, T. P. Sun and Z. Y. Wang (2012).** "Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*." *Nat Cell Biol* **14**(8): 810-817.
- Baima, S., M. Possenti, A. Matteucci, E. Wisman, M. M. Altamura, I. Ruberti and G. Morelli (2001).** "The *Arabidopsis* ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems." *Plant Physiol* **126**(2): 643-655.
- Baum, S. F., J. G. Dubrovsky and T. L. Rost (2002).** "Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots." *Am J Bot* **89**(6): 908-920.
- Bechtold, N. and G. Pelletier (1998).** "In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration." *Methods Mol Biol* **82**: 259-266.
- Bhalerao, R. P. and M. J. Bennett (2003).** "The case for morphogens in plants." *Nat Cell Biol* **5**(11): 939-943.
- Birnbaum, K., D. E. Shasha, J. Y. Wang, J. W. Jung, G. M. Lambert, D. W. Galbraith and P. N. Benfey (2003).** "A gene expression map of the *Arabidopsis* root." *Science* **302**(5652): 1956-1960.
- Bishopp, A., H. Help, S. El-Showk, D. Weijers, B. Scheres, J. Friml, E. Benkova, A. P. Mahonen and Y. Helariutta (2011).** "A mutually inhibitory interaction between

auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots." Curr Biol **21**(11): 917-926.

**Bishopp, A., S. Lehesranta, A. Vaten, H. Help, S. El-Showk, B. Scheres, K. Helariutta, A. P. Mahonen, H. Sakakibara and Y. Helariutta (2011).** "Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem." Curr Biol **21**(11): 927-932.

**Bjorklund, S., H. Antti, I. Uddestrand, T. Moritz and B. Sundberg (2007).** "Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin." Plant J **52**(3): 499-511.

**Bolle, C. (2004).** "The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development." Planta **218**(5): 683-692.

**Cano-Delgado, A., Y. Yin, C. Yu, D. Vafeados, S. Mora-Garcia, J. C. Cheng, K. H. Nam, J. Li and J. Chory (2004).** "BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*." Development **131**(21): 5341-5351.

**Cartwright, D. A., S. M. Brady, D. A. Orlando, B. Sturfels and P. N. Benfey (2009).** "Reconstructing spatiotemporal gene expression data from partial observations." Bioinformatics **25**(19): 2581-2587.

**Castrillo G., T. F., Leveugle M., Lecharyn A., Carbonero P., Coupland G., Paz-Ares J., Oñate-Sánchez L. (2011).** "Speeding Cis-Trans Regulation Discovery by Phylogenomic Analyses Coupled with Screenings of an Arrayed Library of *Arabidopsis* Transcription Factors." Plos One **6**(6).

**Claeys, H., S. De Bodt and D. Inze (2014).** "Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks." Trends Plant Sci **19**(4): 231-239.

**Claeys, H., A. Skiryicz, K. Maleux and D. Inze (2012).** "DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity." Plant Physiol **159**(2): 739-747.

**Clay, N. K. and T. Nelson (2005).** "*Arabidopsis* thickvein mutation affects vein thickness and organ vascularization, and resides in a provascular cell-specific spermine synthase involved in vein definition and in polar auxin transport." Plant Physiol **138**(2): 767-777.

- Chandler, P. M., A. Marion-Poll, M. Ellis and F. Gubler (2002).** "Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization." *Plant Physiol* **129**(1): 181-190.
- Cheng, H., L. Qin, S. Lee, X. Fu, D. E. Richards, D. Cao, D. Luo, N. P. Harberd and J. Peng (2004).** "Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function." *Development* **131**(5): 1055-1064.
- Choe, S., T. Noguchi, S. Fujioka, S. Takatsuto, C. P. Tissier, B. D. Gregory, A. S. Ross, A. Tanaka, S. Yoshida, F. E. Tax and K. A. Feldmann (1999).** "The Arabidopsis *dwf7/ste1* mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis." *Plant Cell* **11**(2): 207-221.
- Daviere, J. M., M. Wild, T. Regnault, N. Baumberger, H. Eisler, P. Genschik and P. Achard (2014).** "Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height." *Curr Biol* **24**(16): 1923-1928.
- Dayan, J., N. Voronin, F. Gong, T. P. Sun, P. Hedden, H. Fromm and R. Aloni (2012).** "Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems." *Plant Cell* **24**(1): 66-79.
- de Lucas, M., J. M. Daviere, M. Rodriguez-Falcon, M. Pontin, J. M. Iglesias-Pedraz, S. Lorrain, C. Fankhauser, M. A. Blazquez, E. Titarenko and S. Prat (2008).** "A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation." *Nature* **451**(7177): 480-484.
- De Rybel B., M. M., Yoshida S., Grabowicz I., Barbier de Reuille P., Boeren S., Smith R. S., Borst J. W., and Weijers D. (2013).** "A bHLH Complex Controls Embryonic Vascular Tissue Establishment and Indeterminate Growth in Arabidopsis." *Developmental Cell* **24**: 426-437.
- Dill, A., H. S. Jung and T. P. Sun (2001).** "The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 14162-14167.
- Dill, A., S. G. Thomas, J. Hu, C. M. Steber and T. P. Sun (2004).** "The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation." *Plant Cell* **16**(6): 1392-1405.

- Donner, T. J., I. Sherr and E. Scarpella (2009).** "Regulation of preprocambial cell state acquisition by auxin signaling in Arabidopsis leaves." Development **136**(19): 3235-3246.
- Earley K W., H. J. R., Pontes O., Opper K., Juehne T., Song K. and Pikaard C S. (2006).** "Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics." The Plant Journal **45**: 616-629.
- Feng, S., C. Martinez, G. Gusmaroli, Y. Wang, J. Zhou, F. Wang, L. Chen, L. Yu, J. M. Iglesias-Pedraz, S. Kircher, E. Schafer, X. Fu, L. M. Fan and X. W. Deng (2008).** "Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins." Nature **451**(7177): 475-479.
- Fu, X. and N. P. Harberd (2003).** "Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response." Nature **421**(6924): 740-743.
- Fu, X., D. E. Richards, B. Fleck, D. Xie, N. Burton and N. P. Harberd (2004).** "The Arabidopsis mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates." Plant Cell **16**(6): 1406-1418.
- Fukuda, H. (1996).** "XYLOGENESIS: INITIATION, PROGRESSION, AND CELL DEATH." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 299-325.
- Funk, V., B. Kositsup, C. Zhao and E. P. Beers (2002).** "The Arabidopsis xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog." Plant Physiol **128**(1): 84-94.
- Gallego-Bartolomé J., G.-M. E., Grau-Enguix F., Abbas M., Locascio A., Thomas S. G., Alabadí D., and Blázquez M.A. (2012).** "Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS **109**(33): 13446–13451
- Gallego-Bartolomé J., G.-M. E., Marín J., Prat S., Blázquez M.A. and Alabadí D. (2010).** "Transcriptional Diversification and Functional Conservation between DELLA Proteins in Arabidopsis." Mol. Biol. Evol. **27**(6): 1247–1256.
- Gallego-Giraldo, C., J. Hu, C. Urbez, M. D. Gomez, T. P. Sun and M. A. Perez-Amador (2014).** "Role of the gibberellin receptors GID1 during fruit-set in Arabidopsis." Plant J.

- Gardiner, J. C., N. G. Taylor and S. R. Turner (2003).** "Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem." Plant Cell **15**(8): 1740-1748.
- Griffiths, J., K. Murase, I. Rieu, R. Zentella, Z. L. Zhang, S. J. Powers, F. Gong, A. L. Phillips, P. Hedden, T. P. Sun and S. G. Thomas (2006).** "Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis." Plant Cell **18**(12): 3399-3414.
- Guo, Y., G. Qin, H. Gu and L. J. Qu (2009).** "Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in Arabidopsis." Plant Cell **21**(11): 3518-3534.
- Hanzawa, Y., T. Takahashi and Y. Komeda (1997).** "ACL5: an Arabidopsis gene required for internodal elongation after flowering." Plant J **12**(4): 863-874.
- Hardtke, C. S. and T. Berleth (1998).** "The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development." EMBO J **17**(5): 1405-1411.
- Hirano, K., K. Asano, H. Tsuji, M. Kawamura, H. Mori, H. Kitano, M. Ueguchi-Tanaka and M. Matsuoka (2010).** "Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice." Plant Cell **22**(8): 2680-2696.
- Hogetsu, T. (1991).** "Mechanism for formation of the secondary wall thickening in tracheary elements: Microtubules and microfibrils of tracheary elements of *Pisum sativum* L. and *Commelina communis* L. and the effects of amiprophosmethyl." Planta **185**(2): 190-200.
- Hosokawa, M., S. Suzuki, T. Umezawa and Y. Sato (2001).** "Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells." Plant Cell Physiol **42**(9): 959-968.
- Hou, X., L. Y. Lee, K. Xia, Y. Yan and H. Yu (2010).** "DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs." Dev Cell **19**(6): 884-894.
- Igarashi, K. and K. Kashiwagi (2010).** "Modulation of cellular function by polyamines." Int J Biochem Cell Biol **42**(1): 39-51.
- Igarashi, K. and K. Kashiwagi (2011).** "Characterization of genes for polyamine modulon." Methods Mol Biol **720**: 51-65.

- Ikeda, A., M. Ueguchi-Tanaka, Y. Sonoda, H. Kitano, M. Koshioka, Y. Futsuhara, M. Matsuoka and J. Yamaguchi (2001).** "slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8." *Plant Cell* **13**(5): 999-1010.
- Imai, A., M. Komura, E. Kawano, Y. Kuwashiro and T. Takahashi (2008).** "A semi-dominant mutation in the ribosomal protein L10 gene suppresses the dwarf phenotype of the *acl5* mutant in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **56**(6): 881-890.
- Imai A., H. Y., Komura M., Yamamoto K. T., Komeda Y., and Takahashi T. (2006).** "The dwarf phenotype of the *Arabidopsis acl5* mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene." *Development* **133**: 3575-3585
- Inoue, T., M. Higuchi, Y. Hashimoto, M. Seki, M. Kobayashi, T. Kato, S. Tabata, K. Shinozaki and T. Kakimoto (2001).** "Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*." *Nature* **409**(6823): 1060-1063.
- Ito, J. and H. Fukuda (2002).** "ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements." *Plant Cell* **14**(12): 3201-3211.
- Takehi, J., Y. Kuwashiro, M. Niitsu and T. Takahashi (2008).** "Thermospermine is required for stem elongation in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* **49**(9): 1342-1349.
- Kiba, T., K. Aoki, H. Sakakibara and T. Mizuno (2004).** "Arabidopsis response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant." *Plant Cell Physiol* **45**(8): 1063-1077.
- King, K. E., T. Moritz and N. P. Harberd (2001).** "Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA." *Genetics* **159**(2): 767-776.
- Knott, J. M., P. Romer and M. Sumper (2007).** "Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine." *FEBS Lett* **581**(16): 3081-3086.
- Kubo, M., M. Udagawa, N. Nishikubo, G. Horiguchi, M. Yamaguchi, J. Ito, T. Mimura, H. Fukuda and T. Demura (2005).** "Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation." *Genes Dev* **19**(16): 1855-1860.

- Kuriyama, H. (1999).** "Loss of Tonoplast Integrity Programmed in Tracheary Element Differentiation." Plant Physiol **121**(3): 763-774.
- Kusano, T., K. Yamaguchi, T. Berberich and Y. Takahashi (2007).** "The polyamine spermine rescues Arabidopsis from salinity and drought stresses." Plant Signal Behav **2**(4): 251-252.
- Lechner, E., P. Achard, A. Vansiri, T. Potuschak and P. Genschik (2006).** "F-box proteins everywhere." Curr Opin Plant Biol **9**(6): 631-638.
- Lee, S., H. Cheng, K. E. King, W. Wang, Y. He, A. Hussain, J. Lo, N. P. Harberd and J. Peng (2002).** "Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition." Genes Dev **16**(5): 646-658.
- Lehmann, K., B. Hause, D. Altmann and M. Kock (2001).** "Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence." Plant Physiol **127**(2): 436-449.
- Li, Z. Y., B. Li and A. W. Dong (2012).** "The Arabidopsis transcription factor AtTCP15 regulates endoreduplication by modulating expression of key cell-cycle genes." Mol Plant **5**(1): 270-280.
- Locascio, A., M. A. Blazquez and D. Alabadi (2013).** "Genomic analysis of DELLA protein activity." Plant Cell Physiol **54**(8): 1229-1237.
- Lofke, C., M. Zwiewka, I. Heilmann, M. C. Van Montagu, T. Teichmann and J. Friml (2013).** "Asymmetric gibberellin signaling regulates vacuolar trafficking of PIN auxin transporters during root gravitropism." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(9): 3627-3632.
- Lucas W. J., G. A., Lichtenberger R., Furuta K., Yadav S., Helariutta Y., He X. Q., Fukuda H., Kang J., Brady S. M., Patrick J. W., Sperry J., Yoshida A., López-Millán A. F., Grusak M. A. and Kachroo P. (2013).** "The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions." Journal of Integrative Plant Biology **55**: 294–388.
- Mahonen, A. P., A. Bishopp, M. Higuchi, K. M. Nieminen, K. Kinoshita, K. Tormakangas, Y. Ikeda, A. Oka, T. Kakimoto and Y. Helariutta (2006).** "Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development." Science **311**(5757): 94-98.

- Marin-de la Rosa, N., B. Sotillo, P. Miskolczi, D. J. Gibbs, J. Vicente, P. Carbonero, L. Onate-Sanchez, M. J. Holdsworth, R. Bhalerao, D. Alabadi and M. A. Blazquez (2014).** "Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines Group VII ERFs as functional DELLA partners." *Plant Physiol.*
- Marín de la Rosa, N. A. (2014).** "DELLA proteins as hubs in signaling networks in plants." *Tesis Doctoral Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia Nº registro 4883.*
- McGinnis, K. M., S. G. Thomas, J. D. Soule, L. C. Strader, J. M. Zale, T. P. Sun and C. M. Steber (2003).** "The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase." *Plant Cell* **15**(5): 1120-1130.
- Minguet, E. G., F. Vera-Sirera, A. Marina, J. Carbonell and M. A. Blazquez (2008).** "Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis." *Mol Biol Evol* **25**(10): 2119-2128.
- Mitsuda, N., M. Seki, K. Shinozaki and M. Ohme-Takagi (2005).** "The NAC transcription factors NST1 and NST2 of Arabidopsis regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence." *Plant Cell* **17**(11): 2993-3006.
- Moyle, R., J. Schrader, A. Stenberg, O. Olsson, S. Saxena, G. Sandberg and R. P. Bhalerao (2002).** "Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid aspen." *Plant J* **31**(6): 675-685.
- Muniz, L., E. G. Minguet, S. K. Singh, E. Pesquet, F. Vera-Sirera, C. L. Moreau-Courtois, J. Carbonell, M. A. Blazquez and H. Tuominen (2008).** "ACAULIS5 controls Arabidopsis xylem specification through the prevention of premature cell death." *Development* **135**(15): 2573-2582.
- Murase, K., Y. Hirano, T. P. Sun and T. Hakoshima (2008).** "Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1." *Nature* **456**(7221): 459-463.
- Nakajima, M., A. Shimada, Y. Takashi, Y. C. Kim, S. H. Park, M. Ueguchi-Tanaka, H. Suzuki, E. Katoh, S. Iuchi, M. Kobayashi, T. Maeda, M. Matsuoka and I. Yamaguchi (2006).** "Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors." *Plant J* **46**(5): 880-889.

- Oda, Y., T. Mimura and S. Hasezawa (2005).** "Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in Arabidopsis cell suspensions." Plant Physiol **137**(3): 1027-1036.
- Ogawa, M., T. Kusano, M. Katsumi and H. Sano (2000).** "Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level." Gene **245**(1): 21-29.
- Ohashi-Ito, K. and D. C. Bergmann (2007).** "Regulation of the Arabidopsis root vascular initial population by LONESOME HIGHWAY." Development **134**(16): 2959-2968.
- Ohashi-Ito, K., M. Matsukawa and H. Fukuda (2013).** "An atypical bHLH transcription factor regulates early xylem development downstream of auxin." Plant Cell Physiol **54**(3): 398-405.
- Olszewski, N., T. P. Sun and F. Gubler (2002).** "Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways." Plant Cell **14** *Suppl*: S61-80.
- Peng, J., P. Carol, D. E. Richards, K. E. King, R. J. Cowling, G. P. Murphy and N. P. Harberd (1997).** "The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses." Genes Dev **11**(23): 3194-3205.
- Ragni, L., K. Nieminen, D. Pacheco-Villalobos, R. Sibout, C. Schwechheimer and C. S. Hardtke (2011).** "Mobile gibberellin directly stimulates Arabidopsis hypocotyl xylem expansion." Plant Cell **23**(4): 1322-1336.
- Ringli, C., B. Keller and U. Ryser (2001).** "Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls." Cell Mol Life Sci **58**(10): 1430-1441.
- Sasaki, A., H. Itoh, K. Gomi, M. Ueguchi-Tanaka, K. Ishiyama, M. Kobayashi, D. H. Jeong, G. An, H. Kitano, M. Ashikari and M. Matsuoka (2003).** "Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant." Science **299**(5614): 1896-1898.
- Shimada, A., M. Ueguchi-Tanaka, T. Nakatsu, M. Nakajima, Y. Naoe, H. Ohmiya, H. Kato and M. Matsuoka (2008).** "Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1." Nature **456**(7221): 520-523.
- Sieburth, L. E. and M. K. Deyholos (2006).** "Vascular development: the long and winding road." Curr Opin Plant Biol **9**(1): 48-54.

- Silverstone, A. L., C. N. Ciampaglio and T. Sun (1998).** "The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway." Plant Cell **10**(2): 155-169.
- Silverstone, A. L., H. S. Jung, A. Dill, H. Kawaide, Y. Kamiya and T. P. Sun (2001).** "Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis." Plant Cell **13**(7): 1555-1566.
- Takano, A., J. Kakehi and T. Takahashi (2012).** "Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom." Plant Cell Physiol **53**(4): 606-616.
- Taylor, N. G., R. M. Howells, A. K. Huttly, K. Vickers and S. R. Turner (2003).** "Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1450-1455.
- Tokunaga, N., N. Sakakibara, T. Umezawa, Y. Ito, H. Fukuda and Y. Sato (2005).** "Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated Zinnia mesophyll cells." Plant Cell Physiol **46**(1): 224-232.
- Toledo-Ortiz G., H. E. a. Q. P. H. (2003).** "The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family." The Plant Cell **15**: 1749–1770.
- Tong, W., K. Yoshimoto, J. Kakehi, H. Motose, M. Niitsu and T. Takahashi (2014).** "Thermospermine modulates expression of auxin-related genes in Arabidopsis." Front Plant Sci **5**: 94.
- Turner, S., P. Gallois and D. Brown (2007).** "Tracheary element differentiation." Annu Rev Plant Biol **58**: 407-433.
- Tyler, L., S. G. Thomas, J. Hu, A. Dill, J. M. Alonso, J. R. Ecker and T. P. Sun (2004).** "Della proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis." Plant Physiol **135**(2): 1008-1019.
- Ubeda-Tomas, S., R. Swarup, J. Coates, K. Swarup, L. Laplaze, G. T. Beemster, P. Hedden, R. Bhalerao and M. J. Bennett (2008).** "Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis." Nat Cell Biol **10**(5): 625-628.
- Ueguchi-Tanaka, M., M. Ashikari, M. Nakajima, H. Itoh, E. Katoh, M. Kobayashi, T. Y. Chow, Y. I. Hsing, H. Kitano, I. Yamaguchi and M. Matsuoka (2005).**

- "GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin." Nature **437**(7059): 693-698.
- Ueguchi-Tanaka, M., M. Nakajima, E. Katoh, H. Ohmiya, K. Asano, S. Saji, X. Hongyu, M. Ashikari, H. Kitano, I. Yamaguchi and M. Matsuoka (2007).** "Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin." Plant Cell **19**(7): 2140-2155.
- Vera-Sirera, F. (2011).** "Bases moleculares de la síntesis de termoespermina y sus implicaciones en el desarrollo vascular de *Arabidopsis thaliana*." Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia Nº de registro 3484.
- Wen, C. K. and C. Chang (2002).** "Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses." Plant Cell **14**(1): 87-100.
- Wild, M., J. M. Daviere, S. Cheminant, T. Regnault, N. Baumberger, D. Heintz, R. Baltz, P. Genschik and P. Achard (2012).** "The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses." Plant Cell **24**(8): 3307-3319.
- Willige, B. C., S. Ghosh, C. Nill, M. Zourelidou, E. M. Dohmann, A. Maier and C. Schwechheimer (2007).** "The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis." Plant Cell **19**(4): 1209-1220.
- Yamamoto, R., T. Demura and H. Fukuda (1997).** "Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells." Plant Cell Physiol **38**(8): 980-983.
- Yamamoto, R., S. Fujioka, T. Demura, S. Takatsuto, S. Yoshida and H. Fukuda (2001).** "Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements." Plant Physiol **125**(2): 556-563.
- Yang, D. L., J. Yao, C. S. Mei, X. H. Tong, L. J. Zeng, Q. Li, L. T. Xiao, T. P. Sun, J. Li, X. W. Deng, C. M. Lee, M. F. Thomashow, Y. Yang, Z. He and S. Y. He (2012).** "Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(19): E1192-1200.
- Yu, S., V. C. Galvao, Y. C. Zhang, D. Horrer, T. Q. Zhang, Y. H. Hao, Y. Q. Feng, S. Wang, M. Schmid and J. W. Wang (2012).** "Gibberellin regulates the

Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors." Plant Cell **24**(8): 3320-3332.

**Zentella, R., Z. L. Zhang, M. Park, S. G. Thomas, A. Endo, K. Murase, C. M. Fleet, Y. Jikumar, E. Nambara, Y. Kamiya and T. P. Sun (2007).** "Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis." Plant Cell **19**(10): 3037-3057.

**Zhang, Z. L., M. Ogawa, C. M. Fleet, R. Zentella, J. Hu, J. O. Heo, J. Lim, Y. Kamiya, S. Yamaguchi and T. P. Sun (2011).** "Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(5): 2160-2165.