







UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Aislamiento y caracterización de genes MADS-box  
en *Medicago truncatula*: duplicaciones génicas y  
subfuncionalización en el linaje *euAGAMOUS***

Memoria presentada por

**JOANNA SERWATOWSKA**

para optar al grado de

**DOCTOR por la Universidad Politécnica de Valencia**

**Directores**

**Dr. LUIS ANTONIO CAÑAS CLEMENTE**

**Dr. JOSÉ PÍO BELTRÁN PORTER**

**Valencia, 2012**







MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



CSIC  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

D. Luis Cañas Clemente, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador Científico del CSIC y D. José Pío Beltrán Porter, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del CSIC, ambos del Instituto de Biología Molecular de Plantas (Universidad Politécnica - Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

CERTIFICAN que,

Doña Joanna Serwatowska, Ingeniera Bioquímica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Aislamiento y caracterización de genes MADS-box en *Medicago truncatula*: duplicaciones génicas y subfuncionalización en el linaje *euAGAMOUS*”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 13 de Febrero de 2012.

Fdo: Dr. Luis Antonio Cañas Clemente

Fdo: Dr. José Pío Beltrán Porter



## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra, de cerca o de lejos, me han apoyado durante los últimos nueve años.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de Tesis, Dr. Luis Antonio Cañas Clemente y Dr. José Pío Beltrán Porter, por la oportunidad que me brindaron de realizar este trabajo y por la confianza depositada en mí.

A José María Bellés, por tutelar este trabajo y apoyarme cuando lo necesité.

A Kirankumar S. Mysore y Jiangqi Wen (Samuel Roberts Foundation, Oklahoma, USA) por facilitarnos las semillas de la línea NF4908 con inserción del retrotransposón *Tnt1*.

A los Drs. Elisabeth I. Johansen, Ole S. Lund y Gabriela D. Constantin por dejarme ser parte de su laboratorio durante mi estancia en Frederiksberg, Dinamarca. Por formarme y ayudarme en el desarrollo de los experimentos VIGS presentados en esta Tesis.

Quiero hacer constar mi agradecimiento a todo el personal del IBMCP (Administración y Servicios), cuya labor ha sido imprescindible para llevar a cabo el presente trabajo. En especial a Santiago y a Rafa, por su trato siempre afectuoso y amable.

A Ana y a Majo por estar al pendiente tanto de mis Arabidopsis como de mí.

A Marisol y a MD, por el aporte cultural en los almuerzos.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, a los de siempre y a los recién llegados, por su cariño y por soportarme cada día en las buenas y en las malas.

A Edelín, Maricruz, Bego, Auri y Tere, sin cuyo trabajo el mío no habría sido posible.

A Concha por sus ideas claras y por hacerme ver que mi trabajo es bueno. Gracias de corazón.

Además, quiero agradecer a muchas personas que han llegado a formar parte de mi vida en estos últimos años y sin cuya amistad y apoyo no me habría sentido “en casa” estando del otro lado del mundo.

Gracias a mis amigos, a los de aquí y a los de allá, por estar.

A Mónica, por su amistad, su compañía y por ser tan buena. Espero que sigamos viviendo juntas muchos más momentos inolvidables.

A Marina, por ser tan buena amiga y por los estupendos ratos pasados.

A Lina, por la empatía en los malos tiempos que finalmente no fueron tan malos.

A José Manuel y a Susana, por estar ahí.

A Rosalía, Indalecio, Inés, Maricha, Jose, Jose Luis e Inesita por cuidarme y haberme acogido como una más de la familia.

A mis padres por mostrarme el significado de la constancia y el trabajo bien hecho y por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

A Roberto, porque sin ti no habría llegado.

Y a Rysio. En definitiva, esto es para ti.

El presente trabajo ha sido financiado por una beca-contrato Predoctoral para el Desarrollo de Tesis Doctoral en Líneas de Investigación con Interés para el Sector Industrial, así como por la Ayuda Complementaria para la Realización de Estancias Breves en Centros de I+D y Empresas en España y en el Extranjero, concedidas por el CSIC.

Ukochanym Rodzicom

A Roberto



---

# RESÚMENES

---





## **Aislamiento y caracterización de genes MADS-box en *Medicago truncatula*: duplicaciones génicas y subfuncionalización en el linaje euAGAMOUS**

Las angiospermas presentan gran diversidad en el desarrollo y la morfología de sus inflorescencias, flores y frutos, si bien se ha establecido que estos procesos poseen una base genética común. Esta diversidad exige analizar dichos procesos en plantas modelo diferentes a *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus*. En el presente trabajo, se ha utilizado la leguminosa *Medicago truncatula*, la cual tiene las características apropiadas para servir como sistema modelo para las leguminosas.

Se aislaron y caracterizaron genes de la familia MADS-box en *M. truncatula*. Estos genes son factores de transcripción que participan en procesos como el control del tiempo de floración, la determinación de la identidad del meristemo floral o el desarrollo de órganos florales, frutos y semillas. Hemos estudiado 11 genes MADS-box: dos genes de clase B (*MtTM6* y *MtNMH7*), tres genes de clase C (*MtSHP*, *MtAGa* y *MtAGb*), un gen de clase E (*MtSEP*) y cinco genes que no forman parte del modelo ABC(DE) (*MtAGL6*, *MtAGL6-like*, *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like*). De entre dichos genes, hemos prestado especial atención a la caracterización funcional de los genes de clase C. Los patrones de expresión de los genes aislados se estudiaron mediante *Northern blot* e hibridación *in situ*, observando que todos se expresan en diferentes tejidos florales y/o diferentes estadios de desarrollo floral, aunque varios se expresan también en tejidos vegetativos, tal vez cumpliendo un rango de funciones más amplio que la regulación de los eventos del desarrollo floral. Los resultados obtenidos conforman la base para determinar las funciones de estos genes en el desarrollo de inflorescencias, flores y frutos de *M. truncatula*.

Se ha descrito que varios genes duplicados en *Arabidopsis* están representados por un único gen en *M. truncatula* y también que esta leguminosa presenta duplicaciones de genes que son únicos en *Arabidopsis*. Esto último sucede con los genes de clase C. En *M. truncatula* hemos aislado tres genes MADS-box pertenecientes a este linaje: *MtSHP*, *MtAGa* y *MtAGb*; el primero es miembro del linaje *PLE* y los otros dos son miembros del linaje *euAG*. La duplicación en el linaje *euAG* parece ser específica de las especies leguminosas. Por ello, investigamos si los genes parálogos *MtAGa* y *MtAGb* desempeñan papeles en la especificación de la identidad de los órganos florales y/o en la determinación del meristemo floral, funciones descritas para los genes de clase C. Se analizaron plantas transgénicas de *M. truncatula* con construcciones de RNA interferente y un mutante de pérdida de función C etiquetado por el retrotransposón *Tnt1*. Además, utilizando la tecnología VIGS se obtuvieron plantas de *M. truncatula* y de *Pisum sativum* (leguminosa filogenéticamente cercana) con pérdida de función de los genes *MtAGa/MtAGb* y *PsAGa/PsAGb*, respectivamente. También se realizaron experimentos de ganancia de función mediante la expresión constitutiva en el sistema heterólogo *A. thaliana*.

Los resultados del presente trabajo indican que *MtAGa* y *MtAGb* son genes de clase C que además de tener un alto grado de redundancia funcional, se han subfuncionalizado, distribuyendo la función C ancestral entre ambos parálogos, de tal manera que *MtAGa* tiene un papel prioritario en la determinación del meristemo floral, mientras que *MtAGb* juega un papel clave en la especificación de la identidad de los órganos reproductores florales.

## Isolation and characterization of MADS-box genes in *Medicago truncatula*: gene duplications and subfunctionalization in the *euAGAMOUS* lineage

Angiosperms show great diversity in the development and morphology of inflorescences, flowers and fruits, although it has been established that these processes have a common genetic basis. This diversity demands an analysis of these processes in model plants different from *Arabidopsis thaliana* or *Antirrhinum majus*. In this study, we have used *Medicago truncatula*, which has the appropriate characteristics to serve as a model system for legumes.

We have isolated and characterized MADS-box family genes in *M. truncatula*. These genes are transcription factors that are involved in processes such as control of flowering time, determination of the identity of the floral meristem or development of floral organs, fruits and seeds. We have studied 11 MADS-box genes: two B-class genes (*MtTM6* and *MtNMH7*), three C-class genes (*MtSHP*, *MtAGa* and *MtAGb*), one E-class gene (*MtSEP*) and five genes that do not belong to the ABC(DE) model (*MtAGL6*, *MtAGL6-like*, *MtSOC1a*, *MtSOC1b* and *MtSOC1-like*). We have paid special attention to the functional characterization of the C-class genes. The expression patterns of the isolated genes were studied by *Northern blot* and *in situ* hybridization, finding that all of them are expressed in different floral tissues and/or different floral development stages, although several of them are also expressed in vegetative tissues, perhaps performing a broader range of functions than just regulation of flower development events. These results are the basis for determining the functions of these genes in the development of inflorescences, flowers and fruits of *M. truncatula*.

It has been described that many *Arabidopsis* duplicated genes are represented by a single gene in *M. truncatula* and that this legume presents duplication of genes that are unique in *Arabidopsis*. The latter happens with C-class genes. We have isolated three MADS-box genes belonging to this class in *M. truncatula*: *MtSHP*, *MtAGa* and *MtAGb*. The first is member of the *PLE* lineage and the last two are members of the *euAG* lineage. Duplication in the *euAG* lineage appears to be specific of leguminous species. For this reason, we investigated if *MtAGa* and *MtAGb* paralog genes play roles in the floral organ identity specification and/or in the floral meristem determination, described functions for C-class genes. *M. truncatula* transgenic plants with RNA interference constructs and a loss of C-function mutant labelled by *Tnt1* retrotransposon were analysed. In addition, using VIGS technology, plants of *M. truncatula* and *Pisum sativum* (phylogenetically close legume) with loss of function of *MtAGa/MtAGb* and *PsAGa/PsAGb* genes, respectively, were obtained. Also, we carried out experiments of gain of function through constitutive expression in the heterologous system *A. thaliana*.

The results of this study indicate that *MtAGa* and *MtAGb* are C-class genes that have a high degree of functional redundancy, and furthermore, they subfunctionalized distributing the ancestral C-function between both paralogs, in such a way that *MtAGa* has a priority role in the floral meristem determination, while *MtAGb* plays a key role in the specification of the identity of floral reproductive organs.

## **Aïllament i caracterització de gens MADS-box en *Medicago truncatula*: duplicacions gèniques i subfuncionalització en el llinatge *euAGAMOUS***

Les angiospermes presenten una gran diversitat en el desenvolupament i la morfologia de les inflorescències, flors i fruits, si bé s'ha establert que aquests processos tenen una base genètica comuna. Aquesta diversitat exigeix analitzar aquests processos en plantes model diferents a *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus*. En el treball, s'ha utilitzat la lleguminosa *Medicago truncatula*, la qual té les característiques apropiades per a servir com a sistema model per a les lleguminoses.

Es van aïllar i es van caracteritzar gens de la família MADS-box en *M. truncatula*. Aquests gens són factors de transcripció que participen en processos com ara el control del temps de floració, la determinació de la identitat del meristema floral o el desenvolupament d'òrgans florals, fruits i llavors. Hem estudiat 11 gens MADS-box: dos gens de classe B (*MtTM6* i *MtNMH7*), tres gens de classe C (*MtSHP*, *MtAGa* i *MtAGb*), un gen de classe E (*MtSEP*) i cinc gens que no formen part del model ABC (DE) (*MtAGL6*, *MtAGL6-like*, *MtSOC1a*, *MtSOC1b* i *MtSOC1-like*). Entre aquests gens, hem prestat una atenció especial a la caracterització funcional dels gens de classe C. Els patrons d'expressió dels gens aïllats es van estudiar mitjançant *Northern blot* i hibridació *in situ*, i es va observar que tots s'expressen en diferents teixits florals i/o diferents estadis de desenvolupament floral, encara que n'hi ha diversos que s'expressen també en teixits vegetatius, tal vegada complint un rang de funcions més ampli que la regulació dels esdeveniments del desenvolupament floral. Els resultats obtinguts conformen la base per a determinar les funcions d'aquests gens en el desenvolupament d'inflorescències, flors i fruits de *M. truncatula*.

S'ha descrit que diversos gens duplicats en *Arabidopsis* estan representats per un únic gen en *M. truncatula* i també que aquesta lleguminosa presenta duplicacions de gens que són únics en *Arabidopsis*. Aquest darrer fet succeeix amb els gens de classe C. En *M. truncatula* hem aïllat tres gens MADS-box que pertanyen a aquest llinatge: *MtSHP*, *MtAGa* i *MtAGb*; el primer és membre del llinatge *PLE* i els altres dos són membres del llinatge *euAG*. La duplicació en el llinatge *euAG* sembla que és específica de les espècies lleguminoses. Per això, investiguem si els gens paràlegs *MtAGa* i *MtAGb* exerceixen papers en l'especificació de la identitat dels òrgans florals i/o en la determinació del meristema floral, funcions descrites per als gens de classe C. Es van analitzar plantes transgèniques de *M. truncatula* amb construccions de RNA interferent i un mutant de pèrdua de funció C etiquetat pel retrotransposó *Tnt1*. A més, utilitzant la tecnologia VIGS es van obtenir plantes de *M. truncatula* i de *Pisum sativum* (lleguminosa filogenèticament propera) amb pèrdua de funció dels gens *MtAGa/MtAGb* i *PsAGa/PsAGb*, respectivament. També es van fer experiments de guany de funció mitjançant l'expressió constitutiva en el sistema heteròleg *A. thaliana*.

Els resultats del treball indiquen que *MtAGa* i *MtAGb* són gens de classe C que, a més de tenir un grau alt de redundància funcional, s'han subfuncionalitzat, i han distribuït la funció C ancestral entre tots dos paràlegs, de manera que *MtAGa* té un paper prioritari en la determinació del meristema floral, mentre que *MtAGb* juga un paper clau en l'especificació de la identitat dels òrgans reproductors florals.



<b>ÍNDICE .....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Las leguminosas: alta diversidad e importancia agronómica .....	4
1.1 <i>Medicago truncatula</i> como especie modelo .....	6
2. El desarrollo floral en las especies modelo tradicionales y en las leguminosas .....	8
2.1 Descripción de la inflorescencia y la ontogenia floral .....	8
2.2 El modelo ABC(DE) .....	14
2.2.1 Genes de función A .....	16
2.2.2 Genes de función B .....	16
2.2.3 Genes de función C .....	17
2.2.4 Genes de función D .....	18
2.2.5 Genes de función E.....	18
2.3 Los genes MADS-box.....	19
2.3.1 Clasificación y filogenia de los genes MADS-box .....	21
3. Los genes MADS-box y su implicación en la biología evolutiva del desarrollo de las plantas.....	24
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
1. Material biológico.....	35
1.1. Material vegetal .....	35
1.1.1. Condiciones de cultivo de las plantas .....	35
1.1.1.1. Cultivo de <i>Medicago truncatula</i> .....	35
1.1.1.2. Cultivo de <i>Pisum sativum</i> .....	36
1.1.1.3. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
1.1.1.3.1. Cultivo en placas petri .....	37
1.1.1.3.2. Cultivo en macetas .....	38
1.2. Microorganismos .....	38

1.2.1.	Cepas bacterianas .....	38
1.2.2.	Condiciones de cultivo de microorganismos .....	39
1.2.3.	Medios de cultivo de microorganismos .....	39
2.	Métodos de biología molecular.....	39
2.1.	Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos .....	39
2.1.1.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	39
2.1.2.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .....	40
2.1.3.	Aislamiento y cuantificación de DNA genómico .....	40
2.1.4.	Aislamiento de RNA total .....	41
2.2.	Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	42
2.3.	Técnicas de clonación .....	43
2.3.1.	Vectores plasmídicos utilizados .....	43
2.3.2.	Digestiones del DNA con enzimas de restricción .....	43
2.3.3.	Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa .....	44
2.3.4.	Reacciones de ligación de DNA .....	44
2.4.	Transformación de cepas bacterianas .....	44
2.4.1.	Preparación de células competentes y transformación por electroporación .....	45
2.4.2.	Selección de recombinantes bacterianos .....	45
2.5.	Secuenciación.....	46
2.5.1.	Análisis de secuencias .....	46
2.6.	Escrutinio de genoteca de <i>Medicago truncatula</i> .....	47
2.6.1.	Titulación y rastreo de la genoteca .....	47
2.6.2.	Transferencia a membrana .....	47
2.6.3.	Síntesis de sondas radiactivas .....	47
2.6.4.	Hibridación y lavados .....	48
2.6.5.	Detección de la señal: autorradiografía .....	48
2.6.6.	Identificación y aislamiento de clones positivos.....	48
2.7.	Estudios de expresión .....	49
2.7.1.	Análisis <i>Northern blot</i> y <i>Southern blot</i> .....	49
2.7.1.1.	Electroforesis de RNA y DNA para transferencia a membrana ...	49
2.7.1.2.	Transferencia y fijación de RNA y DNA a membrana.....	50

---

2.7.1.3. Marcaje de sondas radiactivas.....	50
2.7.1.4. Prehibridación e hibridación.....	50
2.7.2. PCR cuantitativa a tiempo real.....	51
2.7.3. Hibridaciones <i>in situ</i> de mRNA.....	53
2.7.3.1. Generación de ribosondas marcadas con digoxigenina .....	53
2.7.3.2. Cuantificación de las sondas .....	54
2.7.3.3. Preparación de las muestras.....	54
2.7.3.4. Prehibridación e hibridación.....	55
2.7.3.5. Inmunodetección colorimétrica de la señal.....	56
3. Transformación genética de plantas.....	56
3.1. Diseño de construcciones .....	56
3.1.1. Construcciones generadas para el silenciamiento de los genes <i>AGAMOUS</i> de <i>Medicago truncatula</i> mediante RNA interferente .....	56
3.1.2. Construcciones generadas para el silenciamiento de los genes <i>AGAMOUS</i> de <i>Pisum sativum</i> y <i>Medicago truncatula</i> mediante silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) .....	58
3.1.3. Construcciones generadas para la expresión constitutiva de los genes <i>AGAMOUS</i> de <i>Medicago truncatula</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	60
3.2. Transformación genética de plantas.....	61
3.2.1. Transformación estable de <i>Medicago truncatula</i> .....	61
3.2.2. Transformación transitoria de <i>Pisum sativum</i> y <i>Medicago       truncatula</i> .....	63
3.2.3. Transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> y análisis de plantas transgénicas.....	64
4. Técnicas de fotografía y microscopía .....	66
4.1. Fotografía digital .....	66
4.2. Microscopía.....	66
4.2.1. Microscopía estereoscópica.....	66
4.2.2. Microscopía óptica .....	67
4.3. Criomicroscopía electrónica de barrido.....	67

<b>IV. CAPÍTULO I: Aislamiento y caracterización de miembros de la familia MADS-box en <i>Medicago truncatula</i></b> .....	<b>71</b>
RESULTADOS .....	73
1. Aislamiento y caracterización de miembros de la familia MADS-box en <i>Medicago truncatula</i> .....	75
1.1. Aislamiento de once clones diferentes con homología a genes MADS-box ..	75
1.2. <i>MtSEP</i> : un gen con homología a genes MADS-box del grupo <i>AGL2</i> .....	77
1.2.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtSEP</i> .....	77
1.2.2. Patrón de expresión de <i>MtSEP</i> .....	80
1.3. <i>MtAGL6</i> y <i>MtAGL6-like</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>AGL6</i> .....	83
1.3.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtAGL6</i> y <i>MtAGL6-like</i> .....	83
1.3.2. Patrón de expresión de <i>MtAGL6</i> y <i>MtAGL6-like</i> .....	88
1.3.2.1. Patrón de expresión de <i>MtAGL6</i> .....	89
1.3.2.2. Patrón de expresión de <i>MtAGL6-like</i> .....	91
1.4. <i>MtSOC1a</i> , <i>MtSOC1b</i> y <i>MtSOC1-like</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>TDR3 (SOC1)</i> .....	93
1.4.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtSOC1a</i> , <i>MtSOC1b</i> y <i>MtSOC1-like</i> .....	93
1.4.2. Patrón de expresión de <i>MtSOC1a</i> , <i>MtSOC1b</i> y <i>MtSOC1-like</i> .....	101
1.4.2.1. Patrón de expresión de <i>MtSOC1a</i> y <i>MtSOC1b</i> .....	101
1.4.2.2. Patrón de expresión de <i>MtSOC1-like</i> .....	103
1.5. <i>MtAGa</i> , <i>MtAGb</i> y <i>MtSHP</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>AG</i> .....	105
1.5.1. Aislamiento de <i>MtAGa</i> , <i>MtAGb</i> y <i>MtSHP</i> .....	105
1.5.2. Análisis de secuencia de <i>MtSHP</i> .....	107
1.5.3. Patrón de expresión de <i>MtSHP</i> .....	110
1.6. <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i> : genes con homología a genes MADS-box del grupo <i>DEF/AP3</i> .....	113
1.6.1. Aislamiento y análisis de secuencia de <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i> .....	113
1.6.2. Patrón de expresión de <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i> .....	121



1.6.2.1. Patrón de expresión de <i>MtTM6</i> .....	121
1.6.2.2. Patrón de expresión de <i>MtNMH7</i> .....	122
DISCUSIÓN .....	125
1. <i>MtSEP</i> es el ortólogo de los genes <i>SEP1/2</i> en <i>Medicago truncatula</i> .....	129
2. <i>MtAGL6</i> es el ortólogo del gen <i>AGL6</i> en <i>Medicago truncatula</i> .....	131
3. <i>MtAGL6-like</i> forma parte de un nuevo grupo génico exclusivo de leguminosas ..	134
4. <i>MtSOC1a</i> y <i>MtSOC1b</i> son ortólogos del gen integrador floral <i>SOC1</i> .....	135
5. <i>MtSOC1-like</i> es un gen del grupo <i>TDR3/SOC1</i> que se expresa en tejido floral adulto .....	137
6. <i>MtSHP</i> : gen ortólogo de los genes <i>SHP1/SHP2</i> con expresión en óvulos.....	138
7. <i>MtTM6</i> y <i>MtNMH7</i> : genes de clase B originados por una duplicación génica, pertenecientes al linaje <i>AP3/DEF</i> .....	141
 <b>V. CAPÍTULO II: Caracterización molecular y funcional de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i> .....</b>	<b>147</b>
RESULTADOS .....	149
1. Caracterización molecular y funcional de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i> .....	151
1.1. Caracterización molecular de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago</i> <i>truncatula</i> .....	151
1.1.1. Análisis de las secuencias proteicas de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> .....	151
1.1.2. Análisis de las secuencias genómicas de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> .....	158
1.1.3. Análisis <i>Southern blot</i> .....	163
1.1.4. Patrón de expresión de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> .....	164
1.1.4.1. Patrón de expresión de <i>MtAGa</i> .....	164
1.1.4.2. Patrón de expresión de <i>MtAGb</i> .....	166
1.2. Caracterización funcional de los genes <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> de <i>Medicago</i> <i>truncatula</i> .....	168
1.2.1. Silenciamiento génico mediante RNA interferente .....	168
1.2.1.1. Fenotipo de las plantas transgénicas 35S::RNAi- <i>MtAGb</i> .....	172
1.2.1.2. Niveles de expresión de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> en las plantas transgénicas 35S::RNAi- <i>MtAGb</i> .....	174

1.2.2. Mutante <i>mtagb</i> : etiquetado por inserción del retrotransposón <i>Tnt1</i> .....	175
1.2.2.1. Caracterización molecular de la inserción y genotipado .....	176
1.2.2.2. Caracterización fenotípica del mutante <i>mtagb</i> .....	178
1.2.3. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) .....	180
1.2.3.1. VIGS en <i>Pisum sativum</i> .....	181
1.2.3.2. VIGS en <i>Medicago truncatula</i> .....	189
1.2.4. Expresión constitutiva en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	193
1.2.4.1. Expresión constitutiva de <i>MtAGa</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	194
1.2.4.2. Expresión constitutiva de <i>MtAGbS</i> y <i>MtAGbL</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	199
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>205</b>
1. <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> presentan homología estructural con genes de función C .....	207
2. <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> funcionan como genes de clase C .....	210
3. El umbral de expresión de <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> requerido para determinar el meristemo o para establecer la identidad de órgano floral es variable .....	214
4. <i>MtAGa</i> y <i>MtAGb</i> son genes duplicados parcialmente redundantes que se han subfuncionalizado adquiriendo papeles en diferentes aspectos de la función C..	216
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>221</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>225</b>
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	<b>257</b>
1. Secuencia genómica amplificada que contiene la región codificante del gen <i>MtAGa</i> de <i>Medicago truncatula</i> .....	259
2. Secuencia genómica amplificada que contiene la región codificante del gen <i>MtAGb</i> de <i>Medicago truncatula</i> .....	260

**ABREVIATURAS**

°C	grado Celsius
μCi	microcurio
μE	microeinstein
μF	microfaradio
μg	microgramo
μL	microlitro
μM	micromolar
Acc	número de acceso (“accession number”)
ADH1	promotor alcohol deshidrogenasa 1 de maíz
Amp	ampicilina
ATP	mononucleótido trifosfato de adenosina
Basta	DL-fosfinotricina o PPT (“DL-phosphinothricin”)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	seroalbúmina de bovino
CaMV 35S	promotor 35S del virus del mosaico de coliflor
cDNA	DNA complementario (“complementary DNA”)
cm	centímetro
Ct	ciclo umbral (“cycle threshold”)
C-terminal	carboxilo terminal
CTP	mononucleótido trifosfato de citosina
cv.	cultivar
dir	directo
DL	día largo
DNA	ácido desoxirribonucleico (“deoxyribonucleic acid”)
dpi	días post inoculación
DPP	días post-polinización
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EST	marcador de secuencia expresada (“expressed sequence tag”)
FAE	formaldehído / ácido acético glacial / etanol

g	gramo
GTP	mononucleótido trifosfato de guanidina
h	hora
Kan	kanamicina
kb	kilobase
kDa	kilodalton
kV	kilovoltio
L	litro
<i>lacZ</i>	$\beta$ -galactosidasa
LB	borde izquierdo (“left border”)
<i>leu2</i>	leucina 2
lx	lux
m	metro
M	molar
MES	tampón ácido 2-( <i>N</i> -morfolino) etano sulfónico
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MOPS	tampón ácido 3-( <i>N</i> -morfolino) propano sulfónico
MPM	marcador de peso molecular
mRNA	RNA mensajero (“messenger RNA”)
NBT	nitroazul de tetrazolio
ng	nanogramo
NOS	terminador de la nopalin sintetasa
<i>nptII</i>	neomicina fosfotransferasa
N-terminal	amino terminal
OCS	terminador de la octopina sintetasa
ORF	marco de lectura abierto (“open reading frame”)
p/v	peso / volumen
pb	pares de bases

---

PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”)
PDK	pyruvate dehydrogenase kinase
PEBV	virus del oscurecimiento precoz del guisante (“Pea early Browning virus”)
pfu	unidades formadoras de calvas (“plaque forming units”)
pH	potencial de hidrógeno
PI	punto isoeléctrico
PM	peso molecular
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
R	resistente
R1	primera generación de reproducción a partir de semilla base
RB	borde derecho (“right border”)
rev	reverso
RNA	ácido ribonucleico (“ribonucleic acid”)
RNAi	RNA interferente
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
S	sensible
SBX	sobreexpresión
SDS	dodecil sulfato sódico
SP6	promotor del fago SP6 de <i>S. typhimurium</i>
SSC	tampón citrato de sodio salino
T <sub>1</sub>	transformante primario
T <sub>2</sub>	transformante secundario
T7	promotor del bacteriófago T7 de <i>E. coli</i>
TBE	tampón tris-borato-EDTA
TBS	tampón tris salino
T-DNA	DNA de transferencia (“transfer DNA”)
Tet	tetraciclina
Tm	temperatura de fusión estimada (“melting temperature”)

Tris	tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	RNA de transferencia (“transfer RNA”)
U	unidad
UTP	mononucleótido trifosfato de uracilo
UV	ultravioleta
V	voltio
v/v	volumen / volumen
VIGS	silenciamiento génico inducido por virus (“virus induced gene silencing”)
WT	ecotipo silvestre (“wildtype”)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ - <i>D</i> -galactósido
$\Omega$	ohmio

---

# INTRODUCCIÓN

---





La transición del desarrollo vegetativo al reproductivo es un cambio crítico en la vida de las plantas y la inducción, expresión y mantenimiento del estado floral están regulados por muchos factores exógenos y endógenos. Diversos estudios han demostrado la importancia de la luz (por ejemplo, en el fotoperiodo o en el efecto de la calidad de la luz) y la temperatura (por ejemplo, en la vernalización) como reguladores ambientales de la floración. Además, son importantes otros factores como el nivel de nutrientes, las hormonas endógenas, el estrés y el estadio de desarrollo de la planta.

El proceso de floración ha sido sometido a análisis genéticos detallados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y los resultados obtenidos han sido importantes para el esbozo de las rutas genéticas que controlan las respuestas florales a fotoperiodo, vernalización o estímulos hormonales (Amasino, 2004; Boss *et al.*, 2004; Putterill *et al.*, 2004). Con el aumento de recursos genéticos disponibles en varias plantas modelo, la información obtenida en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* se ha ido extendiendo a otras especies. La secuenciación de genomas completos ha permitido la comparación de las rutas de floración entre *Arabidopsis thaliana* y otras especies. También se ha descrito la filogenia de familias génicas relacionadas con la floración y/o el estudio funcional de genes en especies como *Oryza sativa* (arroz), *Hordeum vulgare* (cebada), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Petunia hybrida* (petunia) o *Antirrhinum majus*, entre otras (Carmel-Goren *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2003; Hayama *et al.*, 2003; Vandenbussche *et al.*, 2003b). Sin embargo, se conoce poco a nivel genético sobre los procesos de floración en leguminosas, a pesar de la importancia que tienen en los sistemas de producción de estas plantas.

Las leguminosas, tanto las modelo como las de cultivo, presentan gran diversidad en la arquitectura de sus inflorescencias y periodo de vida, así como en su respuesta frente al fotoperiodo o la temperatura. Sin embargo, estudios genéticos, fisiológicos y moleculares de la floración de *Pisum sativum* (guisante) han mostrado que las rutas de floración básicas están conservadas. Además, una gran proporción de genes de floración de *Arabidopsis thaliana* están representados en estas especies, así que es razonable el uso de genes de *Arabidopsis* para identificar posibles ortólogos en leguminosas (revisado por Hecht *et al.*, 2005).

## 1 LAS LEGUMINOSAS: ALTA DIVERSIDAD E IMPORTANCIA AGRONÓMICA

Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae), con más de 670 géneros y cerca de 20.000 especies (Polhill *et al.*, 1981, Lewis *et al.*, 2005), son la tercera familia más grande de plantas angiospermas. Estas plantas crecen en condiciones agro-ecológicas muy variables y su morfología varía desde diminutas hierbas hasta árboles forestales gigantescos. Desde la época Neolítica, las leguminosas han sido un componente esencial de los sistemas agronómicos (Zohary y Hopf, 2000) y actualmente son el segundo grupo de plantas en importancia agronómica tras las gramíneas (Doyle, 2001), considerando la producción total y el área de cosecha.

Entre los diferentes cultivos, las leguminosas son las únicas plantas capaces de fijar el nitrógeno atmosférico mediante una relación endosimbiótica con bacterias rizobias o micorrizas (Jensen y Haugaard-Nielsen, 2003; Hirsch, 2004), la cual ocurre en una estructura especializada conocida como nódulo. Esta simbiosis provee a las leguminosas (y a los cultivos que se sembrarán tras ellas) de una fuente gratuita y renovable de nitrógeno, que es el principal nutriente limitante en la producción de cultivos (Seastedt y Knapp, 1993; Vitousek *et al.*, 1997; Smil, 1999).

El papel central de las leguminosas en la agricultura no es sorprendente, ya que además de su contribución a la fertilidad de los suelos, las semillas de estas plantas presentan altos contenidos de proteína (entre 20% y 50%), conformando la mayor fuente de proteína vegetal para la alimentación humana y animal. Las leguminosas de grano por sí solas aportan hasta el 33% de las necesidades proteicas de la dieta humana (Vance *et al.*, 2000; Graham y Vance, 2003).

Las leguminosas de consumo más importantes son la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.), el caupí (*Vigna unguiculata* L.), el gandul (*Cajanus cajan* L. Millsp.), el garbanzo (*Cicer arietinum* L.), el haba (*Vicia faba* L.), la lenteja (*Lens culinaris* Medik.), la soja verde (*Vigna radiata* L. Wilczek), la judía adzuki (*Vigna angularis* Willd. Ohwi & Ohashi) y el guisante (*Pisum sativum* L.). La soja (*Glycine max* L. Merr.) y el cacahuete (*Arachis hipogea* L.) son las mayores fuentes de aceite vegetal. Las leguminosas forrajeras incluyen la alfalfa (*Medicago sativa* L.), trébol (*Trifolium pratense* L.) y cuernecillo (*Lotus corniculatus* L.) (revisado en Singh *et al.*, 2007).

Las leguminosas forrajeras han sido la base de la producción cárnica y láctea desde hace siglos (Russelle, 2001). Sin embargo, además de los usos tradicionales como alimento y forraje, las leguminosas son una excelente fuente de madera y aceites y se han utilizado industrialmente para preparar plásticos biodegradables (Paetau *et al.*, 1994), gomas, tintes, resinas, barnices y productos eco-amigables como el etanol o el diesel de soja (revisado en Singh *et al.*, 2007).

Otra propiedad de las leguminosas que las hace especialmente interesantes es que sintetizan un gran número de productos secundarios con actividad biológica de interés, incluyendo isoflavonas y saponinas triterpénicas (Andersen *et al.*, 1984; Grusak, 2002; Madar y Stark, 2002). Se ha descrito que el consumo regular de leguminosas puede ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares, hepáticas, Parkinson, Alzheimer o Huntington (Singh 2005, Singh *et al.*, 2007).

Los taxónomos han dividido a las leguminosas en tres grandes subfamilias basándose en rasgos morfológicos, particularmente de la estructura floral. Estas subfamilias se conocen como Papilionoideae (476 géneros y cerca de 14.000 especies), Caesalpinioideae (162 géneros y cerca de 3000 especies) y Mimosoideae (77 géneros y aproximadamente 3000 especies) (Doyle y Luckow, 2003).

Las Papilionoideae son la subfamilia numéricamente dominante y representan gran parte de las leguminosas económicamente importantes, especialmente en alimentación humana y animal, y comprenden aproximadamente el 40% de las variaciones fenotípicas de todas las leguminosas (Gepts *et al.*, 2005). Esta subfamilia se divide en dos clados (Wojciechowski, 2003), conocidos como Hologalegina (leguminosas “de invierno” o “de clima templado”) y Millettioide (leguminosas “de verano” o “de clima tropical”) (Figura 1). Se ha demostrado que existen altos niveles de sintenia a nivel genómico entre las especies de invierno, como *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* y *Pisum sativum* (Kalo *et al.*, 2004) o entre las especies de verano como *Phaseolus vulgaris* o *Glycine max* (Lee *et al.*, 2001).

Los niveles elevados de sintenia entre *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* y muchas leguminosas económicamente importantes apoyan la elección de estas dos especies como plantas modelo para el estudio de las leguminosas. Estas plantas modelo se están utilizando para buscar respuesta a cuestiones biológicas exclusivas de las leguminosas (Somers *et al.*, 2003), como la base molecular de la fijación de nitrógeno o las rutas

metabólicas que llevan a la producción de determinados metabolitos secundarios. Lo más importante en el estudio de estas plantas modelo es la posibilidad de extender los conocimientos obtenidos a cultivos de interés económico y/o agronómico.

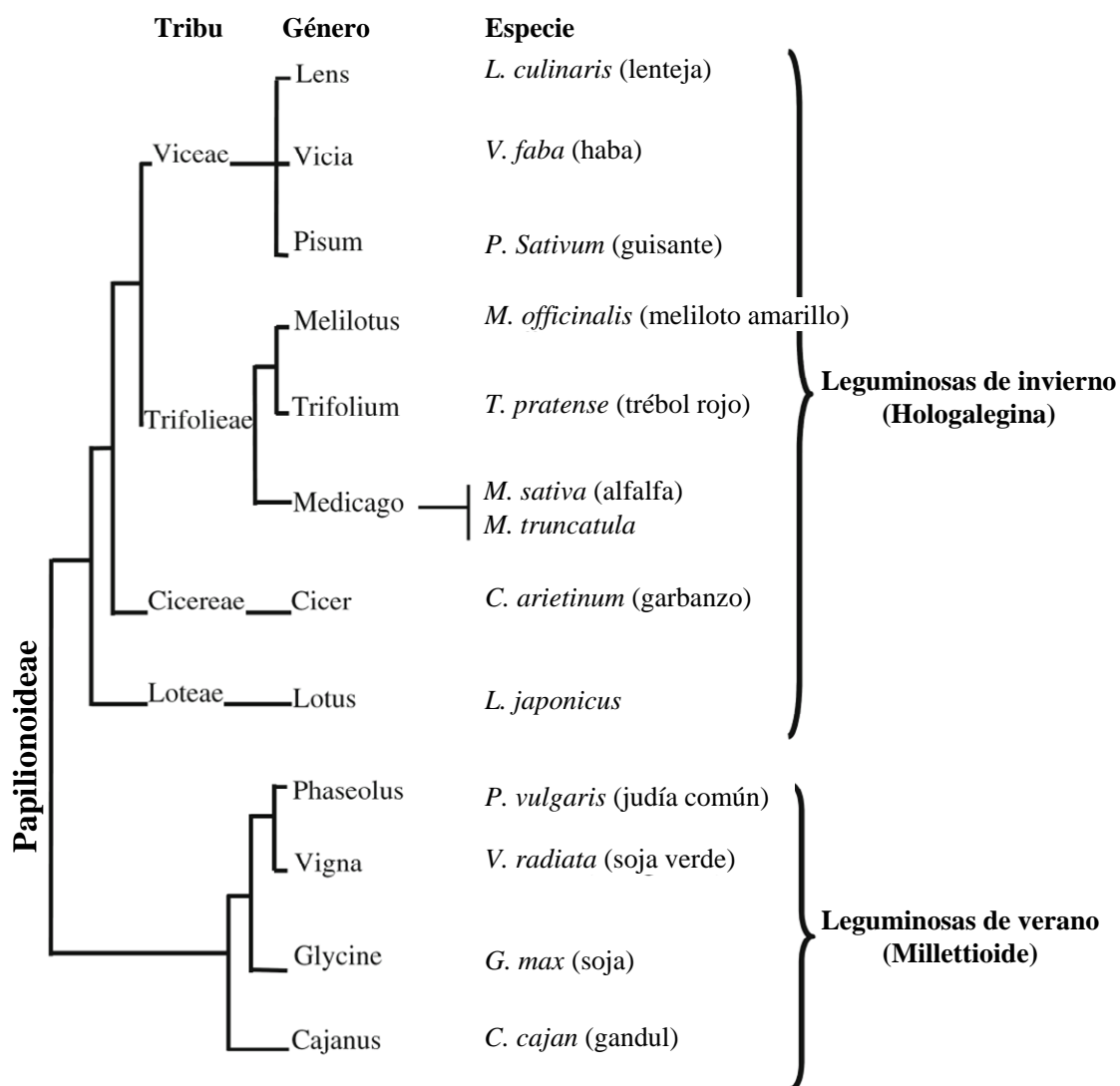
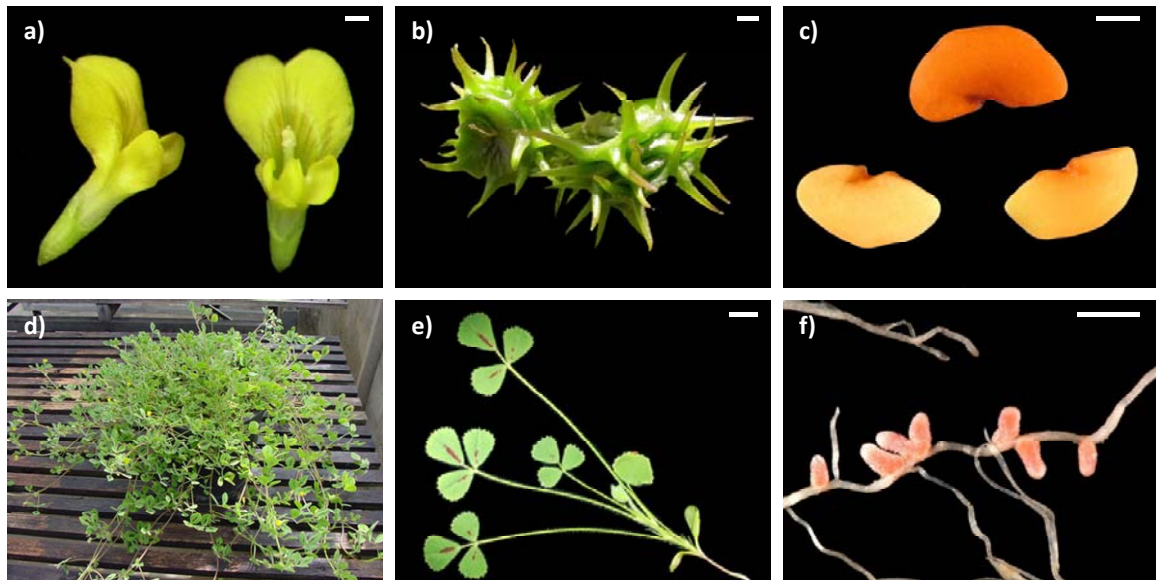


Figura 1. Árbol filogenético de las especies de interés contenidas en la subfamilia Papilionoideae. Se observa la división en los clados Hologalegina y Millettioide. Imagen adaptada de Nayak *et al.* (2010).

### 1.1 *Medicago truncatula* COMO ESPECIE MODELO

*Medicago truncatula* (Figura 2) es una leguminosa forrajera anual que se cultiva comúnmente en Australia, aunque se originó en la cuenca Mediterránea, donde aún puede encontrarse (Crawford *et al.*, 1989). Está estrechamente relacionada con la leguminosa forrajera más importante a nivel mundial, la alfalfa (*Medicago sativa*) y ha llamado la atención como sistema modelo genómico y molecular para estudios

biológicos de las leguminosas (Cook, 1999; Oldroyd y Geurts, 2001), debido a sus características peculiares: genoma pequeño (~500-550 Mpb) y diploide ( $2n=16$ ), ciclo de vida corto (2-3 meses), autofecundación, posibilidad de transformación genética y existencia de grandes colecciones de diferentes ecotipos (Young y Udvardi, 2009).



**Figura 2. *Medicago truncatula*.** a) Flor. b) Frutos. c) Semillas. d) Planta entera. e) Hojas. f) Nódulos. Las barras indican 1 mm en a y c; 5 mm en b y f y 1 cm en e. Fotografías de Joanna Serwatowska (a); Peter Greenwood (b); Ninjatacoshell (c, e y f) y <http://www1.montpellier.inra.fr> (d).

*Medicago truncatula* es un modelo valioso para el estudio de muchos aspectos de la biología de las leguminosas que son únicos para esta familia de plantas. Cuestiones importantes de simbiosis, patogénesis, biología de las semillas, desarrollo radicular, metabolismo secundario (Oldroyd y Geurts, 2001) y últimamente genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica (Benedito *et al.*, 2008; Repetto *et al.*, 2008; Farag *et al.*, 2008) se están estudiando en esta planta modelo.

Además, el género *Medicago* está relacionado con un buen número de leguminosas de cultivo importantes como la alfalfa, guisante, haba, garbanzo, lenteja, trébol, lotus, soja y judía común (Doyle *et al.*, 1996). Es notable el alto nivel de macrosintenia entre *Medicago truncatula* y *Pisum sativum*, aunque el genoma del segundo sea diez veces mayor que el de la primera (Young *et al.*, 2005).

*Medicago truncatula* es una planta modelo con un despliegue impresionante de herramientas genéticas. Hay cerca de 270,000 EST (“Expressed sequence tags” o

marcadores de secuencia expresada) depositados en GenBank (noviembre, 2011) y un GeneChip de Affymetrix® con aproximadamente 51,000 sets de prueba para genes de esta planta. Este *chip* es la base de un atlas de expresión génica recientemente desarrollado (Benedito *et al.*, 2008).

Para la genética reversa, *Medicago truncatula* tiene disponibles poblaciones mutantes caracterizadas con inserciones de *Tnt1* (Tadege *et al.*, 2008), de bombardeo con neutrones rápido (“Fast neutron bombardment” o FNB) (Starker *et al.*, 2006) y TILLING (“target-induced local lesions in genomes”) (Cook, unpublished). También puede realizarse el silenciamiento génico basado en RNA interferente (Limpens *et al.*, 2004) y se están haciendo avances en el silenciamiento génico transitorio mediado por virus (“virus induced gene silencing” o VIGS) (Grønlund *et al.*, 2008). Finalmente, *Medicago truncatula* es diana de la iniciativa internacional BAC-by-BAC de secuenciación del genoma, cuya finalización es inminente (<http://www.medicagohapmap.org>).

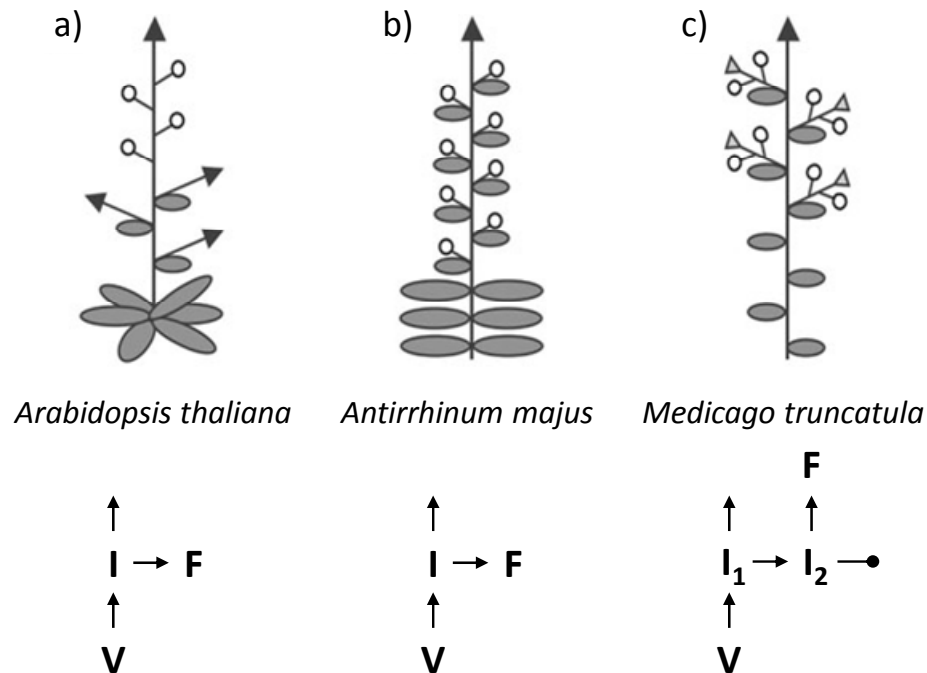
Con todas estas herramientas disponibles, *Medicago truncatula* está lista para proveer una gran riqueza en descubrimientos genómicos para la comunidad de investigación aplicada a las leguminosas.

## **2 EL DESARROLLO FLORAL EN LAS ESPECIES MODELO TRADICIONALES Y EN LAS LEGUMINOSAS**

### **2.1 DESCRIPCIÓN DE LA INFLORESCENCIA Y LA ONTOGENIA FLORAL**

La arquitectura de la inflorescencia en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus* es relativamente simple: tras la transición floral, el meristemo apical del tallo produce un meristemo inflorescente que forma flores solitarias, sustentadas o no por brácteas. Las inflorescencias de *Medicago truncatula* son muy similares a las de *Pisum sativum* y otras leguminosas (Tucker, 1989; Ferrándiz *et al.*, 1999). Presentan un mayor grado de complejidad que las inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* ya que, tras la transición floral, el meristemo apical del tallo se convierte en un meristemo inflorescente primario que diferencia lateralmente meristemos inflorescentes secundarios. Estos últimos dan lugar a un número variable de

flores antes de terminar en un órgano residual llamado “spike” (Figura 3, Ferrándiz *et al.*, 1999; Benlloch *et al.*, 2003).



**Figura 3. Esquema comparativo de la arquitectura de diferentes inflorescencias.** a) Arquitectura de la inflorescencia de *Arabidopsis thaliana*. b) Arquitectura de la inflorescencia de *Antirrhinum majus*. c) Arquitectura de la inflorescencia de *Medicago truncatula*. V, Meristemo vegetativo; I, Meristemo inflorescente; I<sub>1</sub>, Meristemo inflorescente primario; I<sub>2</sub>, Meristemo inflorescente secundario; F, Meristemo floral. La terminación (—●) indica el agotamiento del meristemo inflorescente en un órgano residual. Imagen adaptada de Benlloch, R., Tesis Doctoral (2005) y Benlloch *et al.* (2007).

Idealmente, una flor contiene cuatro tipos de órganos florales organizados en cuatro verticilos (revisado en Soltis *et al.*, 2007). La mayoría de las flores de leguminosas de la subfamilia Papilionoideae presentan este tipo de estructura; poseen un primer verticilo con cinco sépalos, un segundo verticilo con cinco pétalos, un tercer verticilo compuesto por diez estambres y un cuarto verticilo conformado por un carpelo (Tucker, 2003). No obstante, los órganos que conforman estas flores presentan morfologías características que las distinguen de las flores de las otras subfamilias de leguminosas.

La flor de *Medicago truncatula*, en la cual se ha realizado la mayoría de estudios de esta Tesis Doctoral, presenta una morfología y ontogenia que recuerdan a las de otras leguminosas modelo como *Pisum sativum* o *Lotus japonicus* (Tucker, 1989; Ferrandiz *et al.*, 1999; Benlloch *et al.*, 2003). Los cinco sépalos de *Medicago truncatula* están fusionados por su base formando un tubo con los lóbulos libres. La corola presenta tres tipos de pétalos: un estandarte o “vexillum”, que es el más grande y está situado en

posición adaxial, dos pétalos laterales llamados alas o “alae” y dos pétalos cortos fusionados por el margen formando la quilla en posición abaxial. Los diez primordios de estambres se inician en dos verticilos contiguos de cinco primordios cada uno, los cuales se reorientan en un solo verticilo cuando se alarga el receptáculo (Tucker, 2003). Es en ese momento cuando nueve estambres fusionan sus filamentos formando un tubo estaminal que rodea al carpelo y el décimo (en posición adaxial) permanece libre. El carpelo es subsésil y el estilo está flexionado en el extremo distal, encajado en el interior de la quilla. Una particularidad del género *Medicago* es que, tras la fertilización, el ovario crece girando helicoidalmente y forma una vaina con espinas que contiene las semillas (Benlloch *et al.*, 2003).

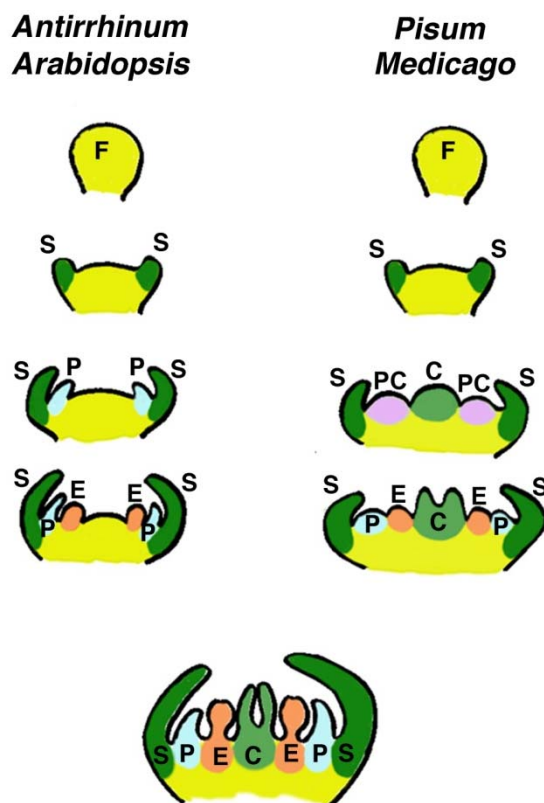
Los estudios de ontogenia de las flores de las especies modelo *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* y *Lotus japonicus* han mostrado que existen diferencias morfológicas sustanciales entre las flores de las Papilionoideae y las flores de muchas otras plantas eudicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus* (Figura 4).

En las flores de *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* los órganos del mismo verticilo se inician simultáneamente y los verticilos se inician secuencialmente, esto es, no solapan en el tiempo de iniciación (Smyth *et al.*, 1990; Sommer *et al.*, 1990). En la mayoría de las Papilionoideae la iniciación de los primordios de los diferentes tipos de órganos florales transcurre de manera unidireccional (desde las posiciones abaxiales hacia las adaxiales), con un alto grado de solapamiento entre diferentes verticilos (Benlloch *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2005). Este solapamiento es extremo en el caso de *Medicago truncatula* y *Pisum sativum* (Ferrándiz *et al.*, 1999; Benlloch *et al.*, 2003). También es característica la iniciación temprana del carpelo. En *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus* este órgano es el último en aparecer, mientras que en *Medicago truncatula* y *Pisum sativum* el primordio de carpelo puede verse en el centro del meristemo floral muy prematuramente (Benlloch *et al.*, 2003).

Otra diferencia es el verticilo heterogéneo que presentan especies como *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* o *Lotus japonicus*. Antes de la iniciación de los primordios de pétalos y estambres, se forman unos “primordios comunes” a ambos órganos. Estos primordios comunes darán lugar a los primordios de pétalos y estambres (Ferrándiz *et al.*, 1999; Benlloch *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2005). Este tipo de primordios comunes han sido descritos también en diversas especies leguminosas y no leguminosas (Sattler,



1967; Sundberg, 1982; Tucker, 1984; 1987; 1989; Ronse *et al.*, 1993; Kamenetsky y Akhmetova, 1994; Delaet *et al.*, 1995; Evans y Dickinson, 1996; Kirchoff, 1997). Sin embargo, en la mayoría de las demás leguminosas Papilionoideae (por ejemplo, *Lupinus affinis* [Tucker, 1984] o *Melilotus alba* [Hirsch, 2002]), así como en la mayoría de las eudicotiledóneas, los pétalos y estambres se inician individualmente a partir de verticilos diferentes. Así pues, los primordios comunes son bastante raros entre las leguminosas y probablemente representan una especialización evolutiva (Tucker, 2003).



**Figura 4.** Esquema de las diferencias en la ontogenia floral de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* con otras especies modelo. Los rasgos característicos en estas especies leguminosas son: la iniciación abaxial-adaxial de los primordios y el solapamiento entre distintos órganos; la iniciación temprana del carpelo y la aparición de los primordios comunes que diferenciarán estambres y pétalos. F, Meristemo floral; S, Sépalo; P, Pétalo; PC, Primordio común; E, Estambre; C, Carpelo. Figura extraída de Benlloch, R., Tesis Doctoral (2005).

En cuanto a la caracterización de la ontogenia floral en leguminosas, se han publicado numerosos trabajos en diversas especies (Tucker, 2003). Tanto en *Medicago truncatula* como en *Pisum sativum* la ontogenia floral transcurre de acuerdo con los siguientes estadios (Figura 5, Ferrándiz *et al.*, 1999; Benlloch *et al.*, 2003):

- ESTADIO 1: El meristemo inflorescente primario diferencia lateralmente un meristemo inflorescente secundario y un primordio de hoja.
- ESTADIO 2: El meristemo inflorescente secundario diferencia lateralmente uno, dos o tres meristemas florales.

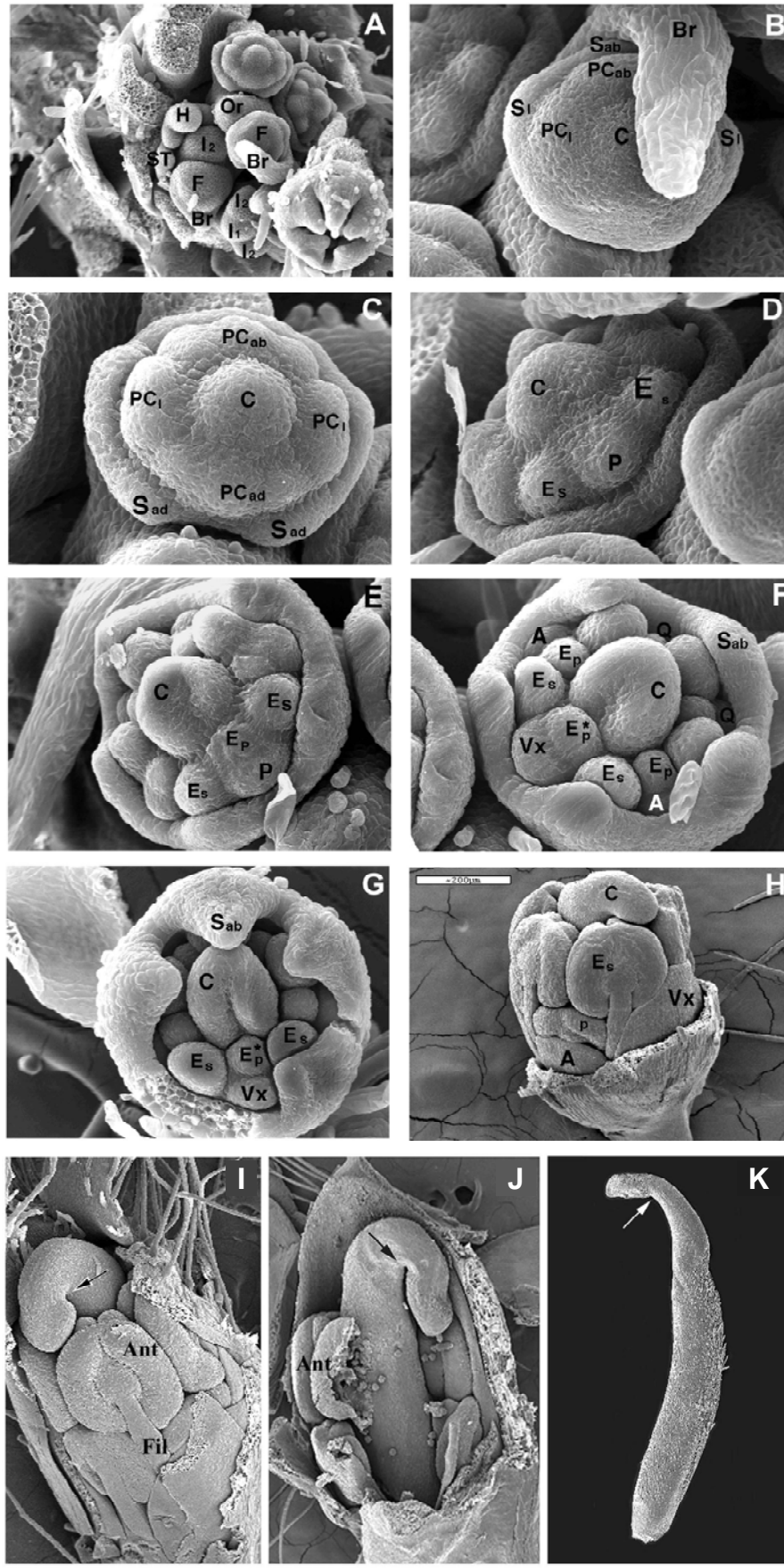


Figura 5. Ontogenia de la flor silvestre de *Medicago truncatula*.

- ESTADIO 3: El meristemo floral produce un meristemo de sépalo en posición abaxial y a continuación dos primordios de sépalos laterales.
- ESTADIO 4: Se forman los cuatro primordios comunes. Aparece el último primordio de sépalo en la zona adaxial, seguido del primordio común abaxial y el primordio del carpelo en la zona central del meristemo. A continuación aparecen los primordios comunes laterales y finalmente el primordio común adaxial.
- ESTADIO 5: Los primordios comunes diferencian tempranamente a los pétalos y los estambres antesépalos. Este proceso ocurre de manera secuencial desde la zona abaxial hacia la zona adaxial del meristemo. En este estadio tardío se diferencian los estambres antepétalos, comenzando por los abaxiales y el último estambre en diferenciarse es el estambre adaxial que permanece libre.
- ESTADIO 6: Los sépalos crecen cubriendo el resto de los primordios de órganos florales. Los estambres comienzan a diferenciar los filamentos y las anteras.
- ESTADIO 7: Los pétalos adquieren su forma característica. Los dos pétalos que forman la quilla se fusionan. El estilo y el estigma están doblados sobre el ovario. Los estambres se han diferenciado.
- ESTADIO 8: Se forma el tubo estaminal. El carpelo se desdobra y crece.

**Figura 5. Ontogenia de la flor silvestre de *Medicago truncatula*.** A) Ápice floral silvestre. Estadios 1 y 2: el meristemo inflorescente primario ha diferenciado dos meristemas inflorescentes secundarios; El meristemo inflorescente secundario se encuentra sustentado por una hoja. B) Estadio 3: el meristemo floral ha desarrollado una bráctea y diferencia los primeros primordios de órganos florales. C) Estadio 4: se forman los cuatro primordios comunes y se inician los primordios de sépalos adaxiales. D) Estadio 5 temprano: los primordios comunes empiezan a diferenciar los órganos de segundo y tercer verticilo. Se diferencian los primordios de pétalos y estambres antesépalos. E) y F) Estadio 5 tardío: los primordios comunes diferencian estambres antepétalos. El último estambre en diferenciarse es el estambre vexilar que permanece libre. G) estadio 6: los sépalos crecen y cubren a los demás órganos florales. H) Estadio 7: Empiezan a diferenciarse las formas de los pétalos. Los estambres han diferenciado anteras y filamentos. I) y J) Estadio 8: crecen los filamentos de los estambres. El carpelo permanece flexionado (flecha) y encajado dentro de la quilla. K) Tras la polinización y durante la antesis el carpelo se desdobra quedando completamente estirado. I<sub>1</sub>, Meristemo inflorescente primario; I<sub>2</sub>, Meristemo inflorescente secundario; H, Hoja; F, Meristemo floral; Br, Bráctea; S<sub>ab</sub>, Or, Spike; Sépalo abaxial; S<sub>l</sub>, Sépalo lateral; PC<sub>ab</sub>, Primordio común abaxial; PC<sub>l</sub>, Primordio común lateral; C, Carpelo; S<sub>ad</sub>, Sépalo adaxial; PC<sub>ad</sub>, Primordio común adaxial; P, Pétalo; E<sub>s</sub>, Estambre antesépalo; E<sub>p</sub>, estambre antepétalo; E<sub>p</sub><sup>\*</sup>, estambre antepétalo libre; Vx, Vexillum; A, Ala; Q, Quilla, Ant, Antera; Fil, Filamento. La barra representa 150 μm en A; 50 μm en B, C, D, E y F; 60 μm en G; 250 μm en I y J; 1,5 mm en K. Imagen adaptada de Benlloch, R., Tesis Doctoral (2005).

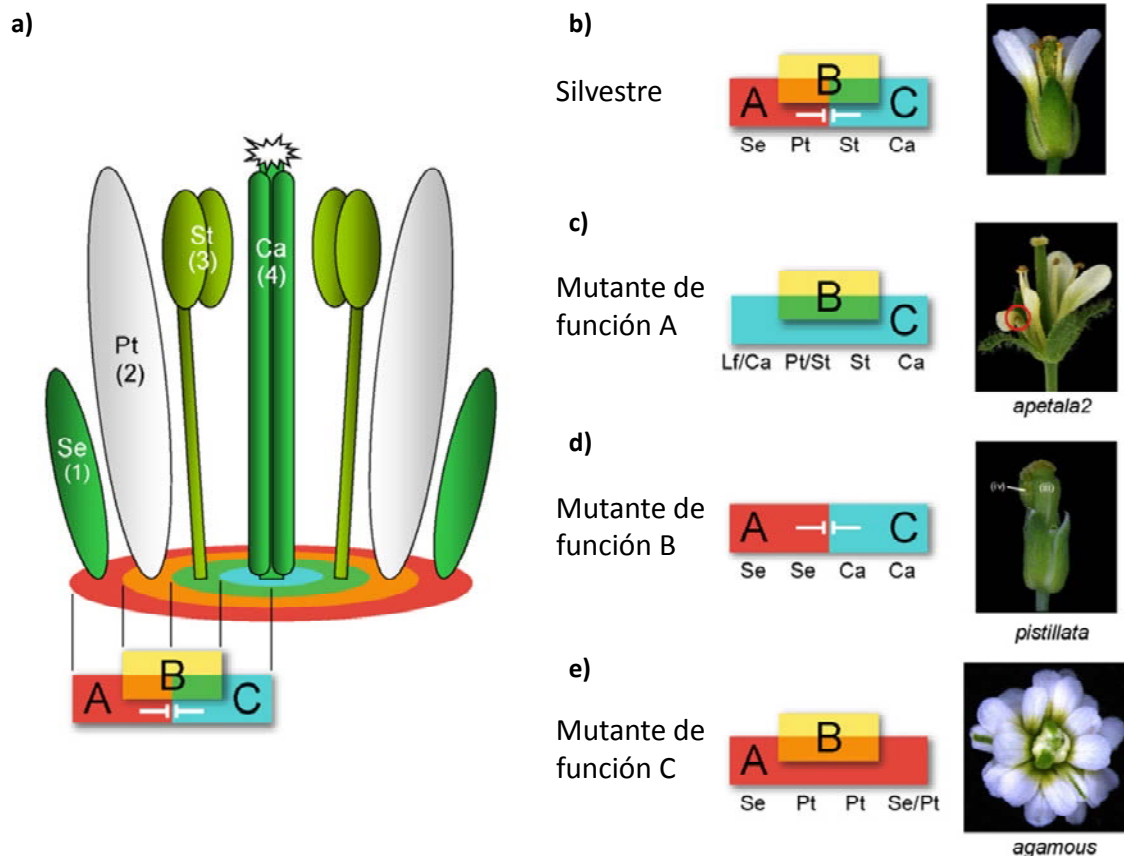
Como ha podido observarse, la evidencia sugiere que los mecanismos moleculares que subyacen al proceso de la ontogenia floral en las leguminosas Papilionoideae varían hasta cierto punto de los mecanismos que rigen la ontogenia floral en otras eudicotiledóneas.

## 2.2 EL MODELO ABC (DE)

Las flores son uno de los productos más exitosos en la evolución de las plantas desde su aparición en el periodo cretáceo temprano. Por otra parte, los mecanismos moleculares que controlan la especificación de los órganos florales suelen estar bastante conservados entre las especies (Soltis *et al.*, 2002).

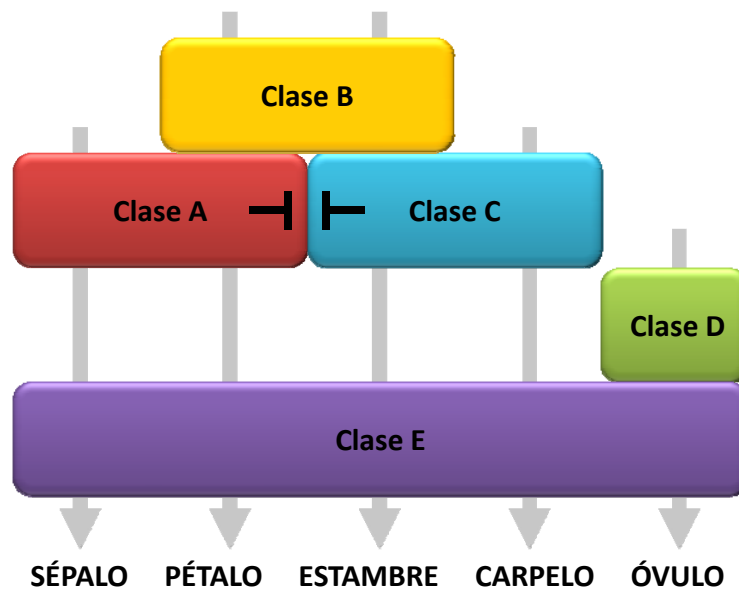
A inicios de la década de los '90, partiendo de análisis genéticos y moleculares realizados en varios mutantes homeóticos de las especies modelo *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Coen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994), se propuso un modelo simple y elegante que explica cómo unos cuantos genes actúan juntos para especificar la identidad de los cuatro tipos de órganos florales que forman una flor eudicotiledónea típica (Coen y Meyerowitz, 1991). Este modelo, conocido como el modelo ABC, propone que existen tres funciones, A, B y C (cada una definida por una clase de mutante homeótico de *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus*), que especifican el tipo de órgano que se forma en cada uno de los cuatro verticilos de la flor. Las funciones A, B y C ocupan cada una dos verticilos adyacentes, los cuales solapan entre sí de tal manera que cada verticilo está definido por la expresión de una única combinación de funciones (Figura 6).

La expresión de la función C en el cuarto verticilo da lugar a la formación de carpelos, en el tercer verticilo se expresan las funciones B y C especificando la formación de estambres, los pétalos se forman en el segundo verticilo debido a la expresión conjunta de las funciones A y B y, finalmente, la expresión de la función A en el primer verticilo resulta en la formación de sépalos. La represión mutua entre las funciones A y C completa el modelo (revisado por Causier *et al.*, 2010).



**Figura 6. Modelo ABC clásico.** a) Diagrama de flor modelo con sépalos (Se) en el primer verticilo, pétalos (Pt) en el segundo, estambres (St) en el tercero y carpelos (Ca) en el cuarto. Bajo la flor se encuentra el modelo ABC. En el primer verticilo se expresan los genes de función A (rojo). En el segundo verticilo se co-expresan los genes de función A y B (naranja). En el tercer verticilo los genes de función B (amarillo) y C (azul) actúan juntos (verde), mientras que en el cuarto verticilo solo actúa la función C. El modelo ABC propone la represión mutua entre las funciones A y C, como se indica mediante líneas truncadas. b – e) Mutantes de *Arabidopsis thaliana* a partir de los cuales se propuso el modelo ABC. b) Flor silvestre. c) Mutante de función A *apetala2* en el cual los sépalos están convertidos en estructuras carpeloides o foliares (dependiendo del alelo) y los pétalos en estructuras tipo estambre (el círculo marca una antera en el segundo verticilo). d) Mutante de clase b *pistillata*. Los dos primeros verticilos presentan identidad de sépalo y el tercer verticilo está convertido en carpelo. Se observa como los carpelos del tercer verticilo (iii) atrapan a los carpelos del cuarto verticilo (iv). e) Mutante de clase C *agamous*. Se presenta conversión de órganos reproductivos (estambres y carpelos) en órganos de periantio (sépalos y pétalos) y pérdida de determinación floral, generando un fenotipo “una flor dentro de otra”. Imagen adaptada de Causier *et al.* (2010).

Posteriormente, en 1995, se añadió al modelo la función D para especificar la identidad de los óvulos, los cuales subsecuentemente se consideraron como órganos separados (Colombo *et al.*, 1995). En 2000, los genes de clase E se integraron al modelo como cofactores que son coresponsables de la identidad de los tres verticilos internos (Pelaz *et al.*, 2000; Theissen y Saedler, 2001; Robles y Pelaz, 2005). El modelo resultante se conoce como modelo “ABCDE” (Figura 7).



**Figura 7. Modelo ABCDE.** Las distintas clases de genes especifican de manera combinatoria los diferentes órganos florales. Además, las clases A y C se regulan antagónicamente. Imagen adaptada de Leebens-Mack *et al.* (2005).

### 2.2.1 Genes de función A

En *Arabidopsis thaliana*, la función A se ha atribuido a dos genes: *APETALA1* (*AP1*) y *APETALA2* (*AP2*) (Mandel *et al.*, 1992b; Jofuku *et al.*, 1994). En los mutantes de estos genes, los sépalos están transformados en órganos tipo hoja o bráctea (o desarrollan características carpeloides) y los pétalos están ausentes o transformados en estructuras tipo estambre.

En leguminosas se han aislado homólogos funcionales de *AP1* en *Medicago truncatula* (*MtAP1*; Benlloch, R., Tesis Doctoral, 2005) y *Pisum sativum* (*PEAM4*; Ferrándiz, C., Tesis Doctoral, 1996; Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001; Berbel, A., Tesis Doctoral, 2002; Berbel *et al.*, 2001) cuya expresión en sépalos y pétalos concuerda con su función en la especificación de la identidad de estos órganos. Además, estos genes están implicados en el proceso de iniciación floral en estas leguminosas. *Lotus japonicus* presenta dos homólogos de *AP1*, *LjAP1a* y *LjAP1b*, ambos con un patrón de expresión similar al de los genes arriba mencionados (Dong *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Genes de función B

Tanto *Arabidopsis thaliana* como *Antirrhinum majus* contienen dos genes de función B: *APETALA3* (*AP3*) y *PISTILLATA* (*PI*); *DEFICIENS* (*DEF*) y *GLOBOSA* (*GLO*), respectivamente, los cuales se requieren para especificar la identidad de pétalos y

estambres en los verticilos segundo y tercero. Todos sus mutantes simples presentan las mismas transformaciones homeóticas de pétalos en sépalos y de estambres en carpelos (Tröbner *et al.*, 1992; Goto y Meyerowitz, 1994).

En *Medicago truncatula* se han descrito dos genes parálogos homólogos a *PI*, *MtPI* y *MtNGL9* (Benlloch, R., Tesis Doctoral, 2005). *MtPI* podría haber mantenido un papel predominante en el desarrollo de los pétalos y estambres, mientras que *MtNGL9* podría estar involucrado en el desarrollo de los nódulos de raíz, al igual que su ortólogo en *Medicago sativa*, *MsNGL9* (Zuccherro *et al.*, 2001). En *Pisum sativum* se aisló el gen *PsPI* que contribuye a la especificación de la identidad de pétalos y estambres (Berbel, A., Tesis Doctoral, 2002; Berbel, *et al.*, 2005). En *Lotus japonicus* se han descrito dos ortólogos de *PI* (*LjPIa* y *LjPIb*) y uno de *AP3* (*LjAP3*), todos específicos de pétalos y estambres (Dong *et al.*, 2005) y en *Glycine max* se han aislado secuencias homólogas a *PI* y a *AP3* (Hecht *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Genes de función C

En *Arabidopsis thaliana*, el gen de función C *AGAMOUS* (*AG*) está involucrado en la especificación del desarrollo de los órganos reproductores femeninos y masculinos y en la regulación de la determinación del meristemo floral (Yanofsky *et al.*, 1990; Lenhard *et al.*, 2001). El mutante de este gen presenta cambio de identidad de estambres a pétalos y de carpelos a sépalos (Bowman *et al.*, 1989). Dos genes adicionales, *SHATTERPROOF1* y *2* (*SHP1* y *SHP2*), comparten funciones redundantes en la especificación de la zona de dehiscencia y funcionan con *AG* en el desarrollo del carpelo (Liljegren *et al.*, 2000; Pinyopich *et al.*, 2003).

En *Pisum sativum* se ha descrito un gen ortólogo a *AG*, *PsMADS7*, cuyo patrón de expresión y fenotipo de expresión constitutiva en *Arabidopsis thaliana* apuntan a un gen de función C (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001). Se ha aislado una secuencia homóloga a este gen en *Medicago truncatula* (Hecht *et al.*, 2005). En *Lotus japonicus*, en cambio, se han descrito dos genes homólogos a *AG*, *LjAGa* y *LjAGb*, que presentan patrones de expresión similares durante la ontogenia floral: inicialmente se expresan en el centro del meristemo floral y posteriormente su expresión se restringe a los primordios de estambres (Dong *et al.*, 2005). Se ha aislado un ortólogo de *SHP1/2* en *Pisum sativum*, *PsMADS8*, que presenta expresión en tercer y cuarto verticilo y cuyo fenotipo de

expresión constitutiva en *Arabidopsis thaliana* apoya la hipótesis de que es un gen de función C (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001). También existen secuencias homólogas a *SHP1/2* en *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* y *Glycine max* (Hecht *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, unpublished).

#### **2.2.4 Genes de función D**

Hay un gen de función D en *Arabidopsis thaliana*, *SEEDSTICK* (*STK*). Este gen está involucrado en el desarrollo del óvulo y se requiere para la dispersión de las semillas cuando el fruto madura. En la promoción de la identidad del óvulo, *STK* actúa redundantemente con *SHP1*, *SHP2* y *AG* (Pinyopich *et al.*, 2003). Ya que los genes de función D pertenecen a la misma subfamilia que los genes de función C y varios genes de función C comparten funciones con los de clase D en el desarrollo del óvulo, los genes de función D podrían considerarse como genes de función C más especializados (Rijkema *et al.*, 2010).

Únicamente se ha descrito la existencia de secuencias homólogas a *STK* en *Medicago truncatula* y *Glycine max* (Hecht *et al.*, 2005).

#### **2.2.5 Genes de función E**

Las proteínas codificadas por los genes de función E actúan como mediadores en la formación de complejos proteicos entre las proteínas B, C y D (Melzer *et al.*, 2009; Immink *et al.*, 2009). La función E en *Arabidopsis thaliana* está codificada por la subfamilia de genes *SEPALLATA* (*SEP*), la cual consta de cuatro genes: *SEPALLATA1*, *2*, *3* y *4* (*SEP1*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4*; Pelaz *et al.*, 2000). Los cuatro genes muestran un alto grado de redundancia funcional, aunque han demostrado alguna diversificación en sus funciones (Favaro *et al.*, 2003).

Se ha descrito *PsMADS6*, el ortólogo de *SEP1/2* en *Pisum sativum*, gen de identidad de órgano floral de tipo *SEP* que además parece estar implicado en el proceso de iniciación floral de esta planta (Berbel, A., Tesis Doctoral, 2002). Se han aislado secuencias homólogas en *Medicago truncatula* y *Glycine max* (Hecht *et al.*, 2005). También en *Pisum sativum* se aisló un ortólogo de *SEP3*, *PsMTF1*, importante en el establecimiento de la identidad de pétalos, estambres y carpelos y para la determinación del meristemo floral (Buchner y Boutin, 1998). Se han aislado secuencias



homólogas en *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* y *Glycine max*. A día de hoy, solo en *Lotus japonicus* se ha encontrado una secuencia homóloga a *SEP4* (Hecht *et al.*, 2005).

Las enormes similitudes en la regulación de las funciones B y C entre *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* llevaron a asumir la aplicabilidad universal del modelo ABC (revisado por Rijpkema *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque se espera que el modelo sea parcialmente válido en leguminosas, se requiere la caracterización funcional de ortólogos ABC para determinar cómo este modelo puede usarse para explicar el diseño único de las flores de estas plantas (Dong *et al.*, 2005).

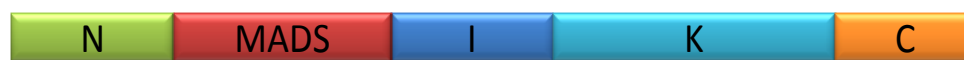
### 2.3 LOS GENES MADS-box

Entre los primeros genes ABC clonados están el gen de clase B *DEF* de *Antirrhinum majus* (Sommer *et al.*, 1990) y el gen de clase C *AG* de *Arabidopsis thaliana* (Yanofsky *et al.*, 1990). Los productos de estos genes presentan alta homología con los dominios de unión a DNA de los factores de transcripción identificados en *Saccharomyces cerevisiae* (MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1, MCM1; Sprague, 1990) y *Homo sapiens* (SERUM RESPONSE FACTOR, SRF; Norman *et al.*, 1988). Así, estas cuatro proteínas se convirtieron en miembros fundadores de una gran familia de factores de transcripción conocida como “MADS-box” (**MCM1, AG, DEF, SRF**; Schwarz-Sommer *et al.*, 1990). A excepción de algunos genes de clase A, como *APETALA2 (AP2)* de *Arabidopsis thaliana*, todos los genes de identidad de órgano floral que han sido caracterizados molecularmente pertenecen a la familia de genes MADS-box (revisado por Becker y Theissen, 2003)

Los miembros de la familia génica MADS-box codifican factores de transcripción que juegan papeles fundamentales en el control del desarrollo y la transducción de señales en los eucariotes (revisado por Becker y Theissen, 2003). La familia génica MADS-box puede dividirse en dos linajes principales, llamados tipo I y tipo II, ambos presentes en plantas, animales y hongos. Todos los miembros de la familia poseen una secuencia de aproximadamente 180 pb, llamada caja MADS (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a), la cual codifica el dominio que es responsable de la localización nuclear, unión a DNA, unión de “factores accesorios” y dimerización de estos factores de transcripción (Theissen *et al.*, 2000; Ng y Yanofsky, 2001; Immink *et al.*, 2002). Excepto por la caja MADS, los genes de tipo I no comparten similitud de secuencia con los genes de tipo II (de Bodt *et al.*, 2003).

A este último linaje es al que pertenecen todos los genes MADS-box caracterizados que contribuyen al desarrollo de las plantas (revisado por Becker y Theissen, 2003).

En las plantas, los genes MADS-box de tipo II se conocen como genes “MIKC” (Münster *et al.*, 1997), ya que sus proteínas presentan una organización estructural conservada (Figura 8) que incluye los dominios MADS (M), Intervening (o región intermedia, I), Keratin-like (K) y C-terminal (C) (Ma *et al.*, 1991; Theissen *et al.*, 1996; Hasebe y Banks, 1997; Münster *et al.*, 1997). El dominio MADS es el mayor determinante en la unión a DNA, mientras que la región I es un factor molecular para la formación selectiva de dímeros de unión a DNA (Riechmann y Meyerowitz, 1997), el dominio K permite la formación de hélices anfipáticas involucradas en la dimerización de las proteínas (Ma *et al.*, 1991; Shore y Sharrocks, 1995) y el dominio C-terminal, la región más variable en secuencia y longitud, está involucrado en la activación transcripcional o en la formación de complejos multiméricos (Cho *et al.*, 1999; Egea-Cortines *et al.*, 1999).



**Figura 8. Estructura de las proteínas MADS-box de tipo MIKC.** Se muestran las distintas regiones de la proteína. El dominio MADS (el más conservado) junto con la región intermedia I media la unión a DNA. El dominio K media interacciones proteína-proteína. El dominio terminal C (el más divergente) contiene en algunos casos un dominio de activación de la transcripción.

En el caso de los genomas de monocotiledóneas se han aislado 61 genes MADS-box en *Zea mays* (Soderlund *et al.*, 2009) y 75 en *Oryza sativa* (Arora *et al.*, 2007), mientras que el número total de genes MADS-box en eudicotiledóneas va desde 105 en *Populus trichocarpa* (Leseberg *et al.*, 2003) y 107 en *Arabidopsis thaliana* (Pařenicová *et al.*, 2003), hasta 212 en *Glycine max* (Schmutz *et al.*, 2010). Hasta el momento se han identificado 22 genes MADS-box de tipo MIKC en *Medicago truncatula* (Hecht *et al.*, 2005). El número de factores de transcripción de dominio MADS puede ser mucho más alto debido, por ejemplo, al *splicing* alternativo (Lightfoot *et al.*, 2008). Sin embargo, solo hay evidencia limitada de que este fenómeno sea de importancia funcional para los genes MADS-box en las plantas.

La mayoría de los genes implicados en el modelo ABC tienen historias evolutivas complejas, las cuales pueden correlacionarse con diferencias en el desarrollo floral. Estos genes presentan duplicaciones frecuentes y pérdidas que afectan desde el taxón entero de angiospermas hasta un pequeño número de especies (Litt y Kramer, 2010). Tras la duplicación, las copias génicas pueden tomar diferentes caminos: mantener la función en una copia y perder la función en la otra; neofuncionalización (una o ambas copias adoptan una función nueva) o subfuncionalización (partición de la función original entre las dos copias) (Prince y Pickett, 2002). Varios candidatos a estudios de neofuncionalización o subfuncionalización se encuentran entre los genes MADS-box. También se han descrito grupos de genes redundantes (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a), los cuales pueden estar en vías de neofuncionalización o subfuncionalización.

Entre las duplicaciones más notables de los genes MADS-box está la que coincide con el origen de las eudicotiledóneas superiores (Kramer *et al.*, 1998, 2004; Litt e Irish, 2003; Zahn *et al.*, 2005a). El surgimiento de esta clase está acompañado por duplicaciones en casi todos los linajes ABCDE de genes: *AP1*, *AP3*, *AG* y *SEP*. La duplicación de los genes homeóticos florales, seguida por la modificación de sus patrones de expresión, puede haber jugado un papel crucial en la diversificación de la función de estos genes y, más ampliamente, en la evolución de las flores (Ferrario *et al.*, 2004).

### 2.3.1 Clasificación y filogenia de los genes MADS-box

Tras la propuesta del modelo ABC se identificaron más genes MADS-box y comenzaron a estructurarse las relaciones filogenéticas entre ellos. Estos genes pueden subdividirse en diferentes “clados” o “subfamilias génicas”, cada uno conteniendo ortólogos de diferentes especies de plantas y nombrado según el primer miembro identificado en dicho clado (Theissen *et al.*, 1996; de Bodt, 2003). Se han definido filogenéticamente 14 clados denominados: *AG*, *AGL2 (SEP)*, *AGL6*, *AGL12*, *AGL15*, *AGL17 (ANR1)*, *DEF (AP3)*, *FLC*, *GGM13 (TT16)*, *GLO*, *TM8*, *SQUA (AP1)*, *STMADS11 (SVP)* y *TDR3 (SOC1)*. Todos los genes MIKC caracterizados hasta ahora son miembros de alguno de estos clados (Becker y Theissen, 2003).

Los genes de clase A, B, C, D y E conocidos hasta ahora se localizan en clados separados: *SQUA* (clase A), *DEF* y *GLO* (clase B), *AG* (clases C y D) y *AGL2* (clase E) (Doyle, 1994; Purugganan *et al.*, 1995; Theissen y Saedler, 1995; Angenent y Colombo, 1996;

Theissen *et al.*, 1996, 2000; Münster *et al.*, 1997). Aquí se incluyen también los genes homeóticos florales de leguminosas aislados hasta la fecha (Hecht *et al.*, 2005). Los miembros del mismo clado tienden a tener patrones de expresión similares (Theissen *et al.*, 1996), aunque esta correlación es más estricta en los genes involucrados en la formación de flores que en los genes que se expresan en otros tejidos (Becker y Theissen, 2003).

Además de proveer funciones homeóticas florales, los genes MADS-box tienen muchos otros papeles en las redes génicas que dirigen el desarrollo reproductivo en las eudicotiledóneas (revisado por Becker y Theissen, 2003). Existen también genes MADS-box que se transcriben fuera de las flores y los frutos, así como gran número de mutantes y plantas transgénicas que sugieren que varios miembros de esta familia juegan papeles reguladores también durante el desarrollo vegetativo, como en el desarrollo de embriones, raíces u hojas (por ejemplo, Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1995; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a; Theissen *et al.*, 2000). Todos estos genes se localizan en los demás clados que componen la filogenia de los genes MADS-box. En lo que respecta a las leguminosas, no se han aislado secuencias pertenecientes a los clados *AGL12*, *AGL15*, *TM8*, *GGM13* ni *FLC* en *Medicago truncatula*, *Glycine max* ni *Lotus japonicus* (Hecht *et al.*, 2005). Los primeros cuatro clados no están bien estudiados, pero el clado *FLC* en *Arabidopsis thaliana* contiene varios genes con un papel en la regulación del tiempo de floración (Boss *et al.*, 2004). *FLC* es el gen mejor caracterizado de este clado y es el represor central de la floración y un mediador importante de la respuesta a vernalización (Boss *et al.*, 2004).

La función de los genes del clado *AGL6* en *Arabidopsis thaliana* (*AGL6* y *AGL13*) no se ha demostrado, pero tanto estos como otros genes relacionados en otras especies se expresan en órganos florales y óvulos (Rounsley *et al.*, 1995; Immink *et al.*, 2003) y pueden influir en la floración al ser expresados ectópicamente (Carlsbecker *et al.*, 2004).

Se han aislado dos genes pertenecientes a este clado en *Pisum sativum*: *PsMADS5* y *PsMADS3*). *PsMADS5* es un gen MADS-box de expresión específicamente floral y temprana durante el desarrollo de la flor, mientras que *PsMADS3* es un gen con expresión en tejidos florales y además en tejidos vegetativos, excepto en raíz, por lo que se ha relacionado con procesos diferentes al desarrollo floral (Ferrandiz, C., Tesis

Doctoral, 1996). Solo se han identificado ESTs en *Medicago truncatula* y *Glycine max* (Hecht *et al.*, 2005).

El gen *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* se identificó como gen relacionado con la floración en *Sinapis alba* (Menzel *et al.*, 1996) y se mostró que es una diana directa de regulación por *CONSTANS (CO)*, Samach *et al.*, 2000), además de tener un papel importante en la integración de señales de fotoperiodo, giberelinas y vernalización (Moon *et al.*, 2003). En *Arabidopsis thaliana* hay cinco miembros más en el clado *SOC1*, cuyas funciones aún se desconocen. Sin embargo, *AGL14*, uno de ellos, se expresa en raíces (Rounsley *et al.*, 1995), sugiriendo que no todos los miembros de este clado tienen un papel en la floración.

Se han identificado tres ESTs de *Medicago truncatula* pertenecientes a este clado, de los cuales uno es un claro homólogo de *SOC1*. También existe un homólogo en *Glycine max* y hay dos secuencias relacionadas a *SOC1* en *Pisum sativum* (*SOC1a* y *SOC1b*) (Hecht *et al.*, 2005).

En *Arabidopsis thaliana* hay dos genes pertenecientes al clado *SVP*: *SVP* y *AGL24*. *SVP* actúa como un represor de la floración dependiente de dosis (Hartmann *et al.*, 2000), mientras que *AGL24* es un regulador negativo de la identidad del meristemo floral (Yu *et al.*, 2004). En *Medicago truncatula* existen dos secuencias relacionadas a *SVP*, una de ellas también presente en *Lotus japonicus*, *Glycine max* y *Pisum sativum* (Hecht *et al.*, 2005).

El clado *ANR1* de *Arabidopsis thaliana* comprende cuatro miembros que se expresan principalmente en raíces (Burgeff *et al.*, 2002). El gen *ANR1* controla el desarrollo radicular lateral en respuesta a la aplicación de  $\text{NO}_3^-$  (Zhang y Forde, 1998). Se han aislado cuatro secuencias de *Medicago truncatula* y una de *Glycine max* pertenecientes a este clado (Hecht *et al.*, 2005).

Es probable que los estudios adicionales de los genes MADS-box identificados en el presente trabajo proporcionen una nueva perspectiva acerca de los aspectos característicos de la fisiología de la floración y la arquitectura de la inflorescencia de *Medicago truncatula* y ayuden a descubrir las bases moleculares para la variación genética natural que controla la floración en las leguminosas.

### 3 LOS GENES MADS-box Y SU IMPLICACIÓN EN LA BIOLOGÍA EVOLUTIVA DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

La biología evolutiva del desarrollo (“evo-devo”) intenta explicar la diversidad de fisonomías en las plantas y en los animales. En este ámbito, los cambios en los patrones de expresión o en las funciones de genes homeóticos son especialmente importantes para la generación de novedades morfológicas. En el caso de la enorme diversidad de plantas existentes, la evolución de la familia génica MADS-box parece haber jugado un papel clave, principalmente mediante duplicaciones génicas. De hecho, todas las duplicaciones en esta familia han sido esenciales para formar la red reguladora que está involucrada en el desarrollo floral de hoy en día (Rijkema *et al.*, 2007).

Cuando ocurre la duplicación génica, las copias resultantes se conocen como parálogos, mientras que los miembros del mismo linaje génico separados por la especiación se conocen como ortólogos (Kramer, 2007). Los genes duplicados pueden originarse a partir de duplicaciones a gran o pequeña escala. En muchos organismos eucariotes, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* o *Populus trichocarpa*, han ocurrido varias duplicaciones del genoma completo (Maere *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2006). A menor escala, un evento de duplicación génica simple produce dos genes parálogos con funciones altamente redundantes que habitualmente no suelen mantenerse a lo largo del tiempo (Force *et al.*, 1999). Tras la duplicación, una de las copias es neutralizada debido a la acumulación de mutaciones deletéreas. Este fenómeno, conocido como no-funcionalización o pseudogenización, es considerado como el resultado más probable de un evento de duplicación (Lynch y Conery, 2000) y se ha descrito en análisis genómicos de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Populus trichocarpa*, entre otros (Pařenicová *et al.*, 2003; Nam *et al.*, 2004; Leseberg *et al.*, 2006).

Sin embargo, la redundancia génica (existencia de genes parálogos que realizan la misma función) es común en la familia de genes MADS-box (ejemplos: Liljegren *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2000; Pinyopich *et al.*, 2003; Vandenbussche *et al.*, 2004). Parece ser que estas copias génicas redundantes pueden mantenerse por algún tiempo ya que protegen contra las mutaciones deletéreas y contribuyen a la robustez genética de un organismo (Moore *et al.*, 2005). Además, se cree que la redundancia es una ventaja para

los genes que codifican grandes cantidades de productos benéficos (Kondrashov *et al.*, 2002).

Aunque se encuentran muchos casos de redundancia parcial o total en la familia MADS-box, también hay varios ejemplos de diversificación funcional entre los genes duplicados (de Martino *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2006; Rijpkema *et al.*, 2006; Alvarez-Buylla *et al.*, 2006). El mecanismo más común de diversificación es la subfuncionalización, en la cual los múltiples papeles funcionales del gen ancestral se dividen entre los parálogos resultantes de tal manera que ambas copias deben mantenerse para conservar el repertorio original de funciones. Se han descrito casos de subfuncionalización en genes MADS-box de clase B, C y E (ejemplos: Yanofsky *et al.*, 1990; Tröbner *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1993; Goto y Meyerowitz, 1994; Davies *et al.*, 1999; Liljegren *et al.*, 2000; Vandenbussche *et al.*, 2003b; Ditta *et al.*, 2004; Rijpkema *et al.*, 2006;). Un claro ejemplo son *OsMADS3* y *OsMADS58* (ortólogos de *AG* en *Oryza sativa*). Estos dos parálogos han dividido entre ellos las funciones de clase C, pero juntos completan el papel ancestral definido para el gen *AG* de *Arabidopsis thaliana*: regulación de la identidad de estambres y carpelos y regulación de la determinación del meristemo floral (Yamaguchi *et al.*, 2006).

La subfuncionalización es un proceso aleatorio que sucede de manera independiente en diferentes especies. Los ortólogos no necesariamente tienen la misma función, mientras que los homólogos que tienen la misma función no son necesariamente ortólogos. Esto ha ocurrido con los homólogos funcionalmente equivalentes *PLE* de *Antirrhinum majus* y *AG* de *Arabidopsis thaliana*, los cuales en realidad son parálogos (Kramer *et al.*, 2004; Causier *et al.*, 2005). La explicación está en que tras la duplicación génica de un ancestro común, los diferentes miembros del par génico duplicado han retenido las funciones homeóticas primarias en diferentes linajes (*PLE* en *Antirrhinum majus* y *AG* en *Arabidopsis thaliana*), mientras que sus respectivos ortólogos (*SHP* en *Arabidopsis thaliana* y *FAR* en *Antirrhinum majus*) han experimentado un proceso de subfuncionalización independiente y divergente a la vez (Kramer *et al.*, 2004; Causier *et al.*, 2005).

La naturaleza aleatoria de la subfuncionalización también se refleja en el número variable de miembros de una subfamilia génica (incluso entre especies estrechamente relacionadas) y en las diferencias en el grado de redundancia y subfuncionalización entre

estos genes. Si se considera en conjunto todo el repertorio de funciones de un grupo de genes subfuncionalizados, se observa que las funciones están bien conservadas entre las especies. En estos casos, la diferencia de función génica entre los ortólogos individuales de estas especies no implica necesariamente una diferencia fundamental en la función. Por esta razón, es de crucial importancia considerar todo el conjunto de genes MADS-box de la subfamilia estudiada (Rijpkema *et al.*, 2007).

Un caso en el cual el estudio de todos los miembros de una subfamilia aporta información sobre la función génica es el análisis de los genes de función B. Dentro del linaje *AP3*, conocido como *paleoAP3*, ocurrió una duplicación en la base de las eudicotiledóneas superiores, dando lugar a dos linajes parálogos llamados *euAP3* y *TM6* (revisado en Kramer y Zimmer, 2006). En el linaje *euAP3* la secuencia génica se ha remodelado enormemente alterando motivos proteicos conservados, mientras que el linaje *TM6* ha conservado la mayoría de las características del *paleoAP3* ancestral. Desafortunadamente, no existen ortólogos *TM6* en *Arabidopsis thaliana* ni en *Antirrhinum majus*. Por ello, los estudios de los genes de clase B duplicados se han realizado principalmente en solanáceas, que poseen genes en ambos linajes. El gen *PhDEF* de *Petunia hybrida* (linaje *euAP3*) contribuye a la identidad de pétalos y estambres (van der Krol *et al.*, 1993). El análisis de toda la subfamilia de función B en esta planta reveló que el gen *PhTM6*, un gen del linaje *TM6*, actúa redundantemente con *PhDEF* en la formación de las anteras (de Martino *et al.*, 2006; Rijpkema *et al.*, 2006). Ambos genes en conjunto reúnen todas las características típicamente asociadas con un gen de función *euAP3*, como se ha descrito para *DEF* y *AP3* en *Arabidopsis thaliana* (Rijpkema *et al.*, 2007).

Una última vía por la cual un gen puede evolucionar tras la duplicación génica es la neofuncionalización, en la cual una de las dos copias mantiene la función ancestral mientras que la segunda adquiere una nueva función, resultando en el mantenimiento selectivo de ambas copias (Ohno, 1970). Esta generación de funciones génicas completamente nuevas se observa en ocasiones como, por ejemplo, en el caso del gen MADS-box *MPF2* de *Physalis pubescens*, que tiene una función novedosa que hace que los sépalos sigan creciendo tras la polinización para encapsular los frutos maduros (He y Saedler, 2005). La subfuncionalización es más probable que la neofuncionalización, pero ambos modelos no son mutuamente excluyentes, pues se ha demostrado que la



subfuncionalización puede ser una fase transitoria hacia la neofuncionalización (He y Zhang, 2005; Rastogi y Liberles, 2005).

Desde que se describió el modelo ABC, ha sido el eje de estudios y especulaciones evolutivas (Bowman *et al.*, 1991b; Doyle, 1994; Bowman, 1997). La naturaleza homeótica de este programa genético se ha visto como un mecanismo evolutivo para el origen de las angiospermas y para ciertos aspectos de su diversificación (Bowman, 1997; Albert *et al.*, 1998). Además, los estudios de los genes MADS-box abarcan un grupo cada vez más amplio de especies de diferentes taxones, lo que permite tener una visión evolutiva de cómo estos genes pueden cambiar su función tras la duplicación y de cómo ha surgido la flor actual (Rijkema *et al.*, 2007). Así pues, los estudios “evo-devo” florales ofrecen oportunidades interesantes, no sólo en la investigación molecular, sino también en la comprensión de aspectos fundamentales de la evolución y las innovaciones morfológicas de las plantas.



---

# OBJETIVOS

---



Las leguminosas son el segundo grupo de cultivos en importancia agronómica tras las gramíneas. Sin embargo, a pesar de la importancia que tiene la floración en los sistemas de producción de estas plantas, es un proceso poco estudiado. Aunque en los últimos años se ha alcanzado un notable conocimiento en lo que respecta al desarrollo de flores e inflorescencias en las leguminosas, existen lagunas en la comprensión de los mecanismos moleculares que dirigen los procesos de iniciación y desarrollo floral de estas especies.

*Medicago truncatula* es un modelo valioso para el estudio de muchos aspectos únicos de la biología de las leguminosas, como la simbiosis, patogénesis o metabolismo secundario. Se han observado diferencias importantes entre *Medicago truncatula* o *Pisum sativum* respecto a los sistemas modelo *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* en relación a muchos aspectos del desarrollo floral (arquitectura de la inflorescencia, ontogenia floral, presencia de primordios comunes, iniciación temprana del carpelo, etc.). Dichas diferencias deben sustentarse en actividades génicas reguladoras que hay que desvelar. El conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen dichas diferencias permitirá elaborar modelos que ayuden a entender las bases genéticas que han contribuido a la enorme diversidad morfológica floral que se observa en la naturaleza.

Por ello, resulta relevante el estudio de los factores de transcripción MADS-box en *Medicago truncatula*, ya que estos genes están implicados en el control de procesos como el tiempo de floración, la determinación de la identidad del meristemo floral o el desarrollo de órganos florales, frutos y semillas. En este ámbito, es de especial interés la frecuencia de duplicaciones y subfuncionalización observada en genes MADS-box de función B y C, implicados en el desarrollo reproductivo. La subfuncionalización ocurre de manera independiente en diferentes especies, por lo que es interesante saber si ha sucedido en leguminosas y de que manera. Todas las duplicaciones en la familia MADS-box habrán sido esenciales para formar la red reguladora involucrada en el desarrollo floral de las leguminosas, ayudando a comprender aspectos fundamentales de la evolución y las innovaciones morfológicas de estas plantas.

Dentro de este marco, como **objetivos concretos** de la presente Tesis Doctoral se plantea:

**PRIMERO:** Aislar y caracterizar nuevos miembros de la familia de genes MADS-box de *Medicago truncatula* involucrados en la formación del meristemo floral y el desarrollo de flores y frutos. Se estudiarán con detalle las secuencias y los patrones de expresión de los mismos y se formularán hipótesis tentativas sobre sus posibles funciones.

**SEGUNDO:** Comprobar la aplicabilidad de la tecnología VIGS en el silenciamiento transitorio específico de genes MADS-box en *Medicago truncatula*.

**TERCERO:** Realizar un estudio sobre la función de los genes MADS-box de *Medicago truncatula* homólogos al gen de clase C *AGAMOUS* utilizando diferentes abordajes. Con ello se pretende profundizar en las particularidades de la función C en leguminosas y comprobar si estos genes presentan funciones distintas o adicionales a las descritas para sus homólogos.

---

# **M**ATERIALES Y **M**ÉTODOS

---





## 1 MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1 MATERIAL VEGETAL

En la Tabla 1 se muestran las distintas líneas de *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo.

**Tabla 1. Genotipos, ecotipos y procedencia de las plantas utilizadas en este trabajo**

Planta	Genotipo	Variedad/Ecotipo	Procedencia	Uso
<i>Medicago truncatula</i>	Silvestre	Jemalong A17	Dr. D. Cook <sup>a</sup>	Estudios de expresión
<i>Medicago truncatula</i>	Silvestre	2HA	Dr. P. Ratet <sup>b</sup>	Transformación genética
<i>Medicago truncatula</i>	Silvestre	R108	Samuel Roberts Noble Foundation	Etiquetado por retrotransposón
<i>Medicago truncatula</i>	Silvestre	SA1335	Dra. E. Johansen <sup>c</sup>	Silenciamiento génico inducido por virus
<i>Pisum sativum</i>	Silvestre	cv. Bonneville	Dra. E. Johansen	Silenciamiento génico inducido por virus
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Silvestre	Columbia (Col)	IBMCP	Expresión constitutiva

<sup>a</sup> University of California; Davis USA

<sup>b</sup> Institut des Sciences du Végétal; Gif-sur-Yvette Francia

<sup>c</sup> Faculty of Agricultural Sciences, Aarhus University; Frederiksberg Dinamarca

Las muestras de los tejidos vegetales utilizadas para la extracción de ácidos nucleicos se recogieron directamente de la planta, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

#### 1.1.1 Condiciones de cultivo de las plantas

##### 1.1.1.1 Cultivo de *Medicago truncatula*

Las semillas de *M. truncatula* se escarificaron mecánicamente frotando con papel de lija hasta ver claros signos de abrasión en la cubierta de las mismas. Posteriormente, se esterilizaron por inmersión durante 40 minutos en una solución de dicloroisocianurato sódico (Bayrochlor® mini [BAYROL France, S.A.], 1 comprimido en 0,5 L de agua) y una gota de detergente común con agitación de 60-70 rpm y se lavaron 5 veces con agua Mili-Q estéril, en la campana de flujo laminar.

Las semillas se colocaron en placas Petri con un soporte de papel filtro estéril humedecido, se sellaron con "Parafilm" y se almacenaron en oscuridad durante 2 días a temperatura ambiente. Después se realizó una incubación a 4 °C durante 7 días más con la finalidad de sincronizar la germinación de las plántulas (estratificación), ó 2 semanas para adelantar la floración (vernalización).

Las plántulas de *M. truncatula* procedentes de la germinación se trasplantaron a pastillas Jiffy de turba prensada (Jiffy-7 41 mm, Jiffy Products International) colocados en alveolos de plástico o se cultivaron individualmente en macetas de plástico de 13 cm de diámetro, en una mezcla de turba y arena 3:1 (v/v).

Las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero o en cámara de cultivo (fitotrón). En el invernadero la temperatura se mantuvo en un rango de 20 a 22,5 °C, con un fotoperiodo inductivo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL). La luz natural se suplementó con luz artificial asegurando una intensidad mínima de 5000 lx, con una media de 8000 lx, mediante lámparas de dos tipos alternadas en las filas de mesas, concretamente lámparas de halogenuro metálico POWERSTAR® HQI®-BT 400 W/D Daylight E40 (Osram) y de sodio a alta presión MASTER SON-T PIA Plus Hg Free 400W/220 E40 1SL (Philips).

En el fitotrón la temperatura oscilaba entre 22 °C de día y 16 °C de noche, con un fotoperiodo de día largo. En ambos casos el riego utilizado consistió en solución Hoagland nº1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966) alternada semana a semana con agua desionizada, usando el sistema de riego mecánico mediante inmersión con una frecuencia que permitiera mantener húmeda la turba.

#### 1.1.1.2 Cultivo de *Pisum sativum*

Las semillas de *P. sativum* se lavaron por inmersión durante 10 minutos con agitación en una solución de lejía comercial al 10% (v/v) y una gota de detergente común. Se aclararon 5 veces con agua destilada estéril.

Tras lavar las semillas, se colocaron en bandejas limpias con un soporte de papel filtro tipo Whatman 3 MM humedecido con agua destilada estéril y se cubrieron con papel aluminio. Se incubaron en oscuridad durante 1 semana a 20 °C, comprobando periódicamente la presencia de humedad. A mitad de semana se realizó un cambio del papel a fin de minimizar contaminaciones.

Las semillas germinadas de *Pisum sativum* se sembraron individualmente en vermiculita en macetas de 16 cm de diámetro. Antes de colocarlas en el sustrato, las radículas se mojaron en solución fungicida de Benomilo 50 Vallés a 1 g/L (IQV). Las plantas se cultivaron en cabina de invernadero en condiciones controladas, con una temperatura de 22,5 °C durante el día y 20 °C durante la noche. La luz natural se suplementó del mismo modo que para *Medicago truncatula*, manteniendo un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). El riego se efectuó por goteo automatizado con solución Hoagland nº1, suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966) durante 2 minutos cuatro veces al día.

### 1.1.1.3 Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

#### 1.1.1.3.1 CULTIVO EN PLACAS PETRI

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en placas Petri, se realizó en cámaras de crecimiento *in vitro* con temperatura constante de 24 °C, bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) con una intensidad de luz de 90  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$  suministrada por tubos fluorescentes de luz fría tipo Gro-Lux F36W/GRO (Sylvania).

Las semillas se esterilizaron, en la campana de flujo laminar, por inmersión durante 3 minutos en una solución de etanol al 70% (v/v) y 0,005% Tritón X-100 (v/v) con agitación. Posteriormente se lavaron durante 1 minuto en agitación con etanol al 96% (v/v). Se colocaron junto con el etanol por inversión sobre papel filtro estéril y se dejaron secar.

Para la selección de transformantes primarios las semillas esterilizadas se sembraron en placas Petri de 140 mm de diámetro (30 mg de semillas, el equivalente de unas 1500, en cada placa) que contenían medio de selección suplementado con kanamicina y timentina [2,2 g/L sales MS (Duchefa), 20 g/L sacarosa, 0,1 g/L MES, pH 5,9, 0,6% agar (Pronadisa), 50 mg/L kanamicina, 300 mg/L timentina]. Las placas con las semillas se almacenaron durante tres días a 4 °C en oscuridad, tras lo cual se trasladaron a una cámara de cultivo *in vitro*. Después de 7-10 días desde la siembra, los transformantes, que eran identificables por su color verde y raíz alongada, se trasplantaron con ayuda de unas pinzas, a alveolos de plástico de 6,5 x 6,5 x 5 cm y se cultivaron como se describe en el siguiente apartado. Para el análisis de segregación de las líneas transgénicas se sembraron 200 semillas por línea. Las semillas, tras su esterilización, se sembraron

individualmente, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, en placas Petri de 140 mm de diámetro (66–67 semillas/placa) que contenían medio de selección suplementado con kanamicina. Las plántulas sensibles y resistentes se contabilizaron al cabo de 15 días.

#### 1.1.1.3.2 CULTIVO EN MACETAS

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en cabinas de invernadero bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. La temperatura se mantuvo en 22 °C por el día y 19 °C por la noche y la iluminación se suplementó con luz artificial del mismo modo que el descrito para *Medicago truncatula*. Habitualmente, las plantas se cultivaron bajo condiciones de fotoperiodo inductivo: 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL).

Las semillas se sembraron en macetas de plástico de 11 ó 13 cm de diámetro o en bandejas de alveolos en una mezcla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1). Las bandejas con macetas o alveolos se regaron por inmersión con agua destilada. Una vez por semana se regaba con solución Hoagland nº1, suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966). Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad y evitar contaminaciones de semillas procedentes de plantas próximas. Se mantuvieron en oscuridad, a 4 °C, durante tres días, a fin de sincronizar la germinación, antes de pasarlas a la cabina del invernadero. Cuando apareció el primer par de hojas se perforó el plástico, y el número y tamaño de las perforaciones se fue aumentando progresivamente hasta que en 3 días se eliminó por completo el plástico.

## 1.2 MICROORGANISMOS

### 1.2.1 Cepas bacterianas

En este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas que se detallan en la Tabla 2.

### 1.2.2 Condiciones de cultivo de microorganismos

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

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Referencia / Origen	Uso
ElectroMAX™ DH10B™ ( <i>E. coli</i> )	Life technologies	Transformación de bacterias
XL1-Blue MRF' ( <i>E. coli</i> )	Stratagene	Rastreo de genoteca
XL0LR ( <i>E. coli</i> )	Stratagene	Rastreo de genoteca
C58/pMP90 ( <i>A. tumefaciens</i> )	Koncz y Schell (1986)	Transformación de plantas <sup>a</sup>
C58/pMP90 [pSoup] ( <i>A. tumefaciens</i> )	Koncz y Schell (1986)	Transformación de plantas <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Para transformar con construcciones de expresión constitutiva y VIGS

<sup>b</sup> Para transformar con construcciones de RNA interferente

### 1.2.3 Medios de cultivo de microorganismos

El medio de cultivo que se usó generalmente para el crecimiento de los cultivos bacterianos, tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens* es el medio LB. Se utilizaron los medios NZY y NZY top agar para el cultivo de fagos durante el rastreo de la genoteca y el medio TYP para el cultivo de *A. tumefaciens* utilizado en el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).

- **Medio LB (Luria-Bertani):** 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl. Para medio sólido: 15 g/L agar
- **Medio NZY:** 5 g/L NaCl, 2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NZ amino (hidrolizado de caseína). pH=7,5. Para medio sólido: 15 g/L agar
- **Medio NZY top agar:** Medio NZY líquido suplementado con 0,7 g/L de agarosa
- **Medio TYP:** 16 g/L bactotriptona, 16 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 2,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Para medio sólido: 15 g/L agar

## 2 MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### 2.1.1 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se realizaron a partir de cultivos de 3 mL crecidos durante una noche en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente, según el procedimiento de extracción y purificación de DNA plasmídico del sistema Rapid Plasmid Miniprep System de Marligen Biosciences, Inc.

Las preparaciones a media escala se realizaron utilizando el procedimiento de extracción y purificación de DNA plasmídico del sistema QIAGEN® Plasmid Midi Kit (columnas QIAGEN-tip 100) a partir de cultivos de 100 mL crecidos en las mismas condiciones que para las preparaciones a pequeña escala.

En ambos casos se siguieron las recomendaciones suministradas por los fabricantes.

### **2.1.2 Aislamiento de DNA plasmídico de *A. tumefaciens***

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) con ligeras modificaciones. Se partía de un cultivo de 3 mL crecido durante una noche en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente. Tras añadir la solución III las muestras se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante. Se le añadió 900 µL de etanol absoluto y se incubó 30 minutos a -80 °C. Pasado este tiempo se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm y el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 25 µL de TE 1X (1 mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,0).

La pureza y rendimiento de la preparación de DNA obtenida no era lo suficientemente alta para realizar análisis de restricción del plásmido. Por ello, una alícuota de 1 µL de esta preparación de DNA se utilizó para transformar *E. coli*. De uno de los clones transformantes de *E. coli* obtenidos se hizo una nueva preparación de DNA plasmídico que fue utilizada para los análisis de restricción pertinentes.

### **2.1.3 Aislamiento y cuantificación de DNA genómico**

Se han utilizado tres protocolos distintos de aislamiento de DNA genómico durante el desarrollo de este trabajo.

El DNA genómico utilizado para genotipar mediante PCR las plantas presuntamente transgénicas de *Medicago truncatula* fue aislado a partir de hoja utilizando el sistema Plant DNAzol® Reagent (Life technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para genotipar las plantas de *Arabidopsis thaliana* así como las plantas de *Medicago truncatula* con inserción de transposon *Tnt1*, el DNA genómico fue aislado según el siguiente procedimiento: Se molió aproximadamente 300 mg de hoja en 500 µL de tampón de extracción (0.2 M Tris-HCl pH 9,0, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1% v/v SDS). Tras 5 minutos de centrifugación a velocidad máxima (13.200 rpm), el sobrenadante fue

transferido a un volumen igual de isopropanol y se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 200  $\mu$ L de agua. Se utilizaron 2  $\mu$ L para las reacciones de PCR.

El aislamiento del DNA genómico utilizado para el análisis *Southern blot* se realizó siguiendo el protocolo de extracción de DNA genómico de plantas descrito por Dellaporta *et al.* (1983), modificado por la adición de un lavado con fenol-cloroformo 1:1 y una precipitación de los ácidos nucleicos en isopropanol después de la precipitación proteica con acetato de sodio 3M pH 5,2. El precipitado final se resuspendió en 100  $\mu$ L de TE 1X.

La cuantificación del DNA se realizó por comparación con patrones de concentración conocida en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en TBE 1X (890 mM Tris-borato, 890 mM ácido bórico, 20 mM EDTA, pH 8,3) con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/mL).

#### **2.1.4 Aislamiento de RNA total**

A 0,3 g de material congelado y pulverizado se añadió 500  $\mu$ L de tampón de extracción (4% ácido p-aminosalicílico, 1% ácido 1,5-naftalenodisulfónico) y 1 mL de fenol-cloroformo (1:1). Se incubó 10 minutos en hielo y se centrifugó a 4 °C. El sobrenadante se precipitó añadiendo 1/10 volumen de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó 30 minutos en hielo. Se centrifugó nuevamente y el precipitado se resuspendió en 400  $\mu$ L de agua y se precipitó con 250  $\mu$ L de LiCl 8 M durante una noche. Al día siguiente se centrifugó y se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v) y se dejó secar. El precipitado se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua libre de RNasas. El RNA total aislado por este método se utilizó para el análisis *Northern blot*.

Para la extracción de RNA total de tejidos de *Medicago truncatula* y *Pisum sativum* que posteriormente se utilizó para los experimentos de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), se utilizó el sistema RNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El RNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando el espectrofotómetro UV/VIS SP8001 DINKO o el NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

## 2.2 AMPLIFICACIÓN DE DNA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó como molde DNA de diferente naturaleza incluyendo DNA genómico, plásmidos recombinantes purificados o cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción de RNA. Esta técnica se empleó para amplificar fragmentos de DNA que se utilizarían para ser ligados a vectores plasmídicos, sintetizar sondas y genotipar plantas transgénicas.

Para todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo indistintamente en los termocicladores Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 o CS Cleaver Scientific Ltd GTC Thermal Cycler 54 en un volumen total de 50  $\mu$ L. La mezcla de reacción de PCR contenía 0,3–0,5  $\mu$ M de los cebadores específicos del fragmento a amplificar, 200  $\mu$ M de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 1X tampón de PCR (suministrado por el fabricante), 1,5 U de DNA polimerasa y DNA molde en concentración variable.

La DNA polimerasa utilizada fue NETZYME™ DNA polymerase (N.E.E.D.), aunque en los casos donde se requería la obtención de fragmentos con alta fidelidad de copia se utilizó TaKaRa Ex Taq™ (TaKaRa). Cabe mencionar que en la mezcla de reacción de esta última no se requiere adición de  $MgCl_2$ . Para la amplificación de los fragmentos usados en las construcciones de expresión constitutiva se utilizó una mezcla 4:1 de NETZYME™ DNA polymerase con *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene).

Los programas de amplificación estándar consistieron en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94 °C seguida de 30-35 ciclos de amplificación y finalmente una extensión de 10 minutos a 72 °C. Cada ciclo de amplificación estaba constituido por 3 etapas: 30 s a 94 °C (desnaturalización), 30 s a la temperatura óptima de hibridación de los cebadores (alineamiento) y por último 1 minuto/kb a 72 °C (extensión).

En cada reacción la temperatura de alineamiento se consideró en función de la temperatura de fusión estimada ( $T_m$ ) de los cebadores empleados.

Los oligonucleótidos empleados como cebadores fueron sintetizados por la empresa Invitrogen™ (<http://www.invitrogen.com>) con grado de purificación máximo. En la Tabla 10 se recogen los cebadores empleados en este trabajo.



## 2.3 TÉCNICAS DE CLONACIÓN

### 2.3.1 Vectores plasmídicos utilizados

Las clonaciones se hicieron en diferentes plásmidos en función de la procedencia de los fragmentos de DNA y de los fines requeridos. Los plásmidos utilizados a lo largo de este trabajo se detallan en la Tabla 3 junto con sus características, origen y uso.

**Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Características	Referencia / Origen	Uso
<b>pGEM® T-easy</b>	Amp <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , promotores T7 y SP6	Promega	Clonaje de fragmentos
<b>pAD-GAL4-2.1</b>	Amp <sup>r</sup> , <i>leu2</i> , promotor ADH1	Stratagene	Escisión in vivo de insertos clonados en genoteca
<b>pHANNIBAL</b>	Amp <sup>r</sup> , intrón PDK, promotor CaMV 35S	Wesley <i>et al.</i> (2001)	Construcción RNAi
<b>pGreenII-nosbar</b>	Kan <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , Basta <sup>r</sup>	Benlloch, R. (Tesis Doctoral, 2005)	Construcción RNAi
<b>pSoup</b>	Tet <sup>r</sup>	Hellens <i>et al.</i> (2000)	Vector binario
<b>pBIN-JIT</b>	Kan <sup>r</sup> , promotor 2x35S	Ferrándiz <i>et al.</i> (2000)	Construcción expresión constitutiva
<b>pCAPE1</b>	Kan <sup>r</sup> , promotor CaMV 35S, PEBV RNA1	Constantin <i>et al.</i> (2004)	Construcción VIGS
<b>pCAPE2</b>	Kan <sup>r</sup> , promotor CaMV 35S, PEBV RNA2	Constantin <i>et al.</i> (2004)	Construcción VIGS

### 2.3.2 Digestiones del DNA con enzimas de restricción

Para cada enzima de restricción se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por las distintas casas comerciales. En el caso de digestiones dobles, se utilizaron tampones compatibles para la actividad de ambos enzimas. Las digestiones se llevaron a cabo en tubos de 1,5 mL con 5–10 U/μg DNA durante un mínimo de 2 h y un máximo de 24 h a la temperatura óptima para cada enzima. La incubación se realizó en un termobloque Thermomixer comfort (Eppendorf®).

### 2.3.3 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Tras separar las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE, las bandas de interés se visualizaron con luz ultravioleta y se cortaron del gel con una cuchilla. El DNA contenido en las mismas se purificó mediante el sistema QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN®), siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción y purificación de los fragmentos de DNA por este método se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en una membrana de gel de sílice, en presencia de una elevada concentración de sal. La elución se llevó a cabo en una solución baja en sales como tampón Tris-HCl pH 8,0 o agua.

### 2.3.4 Reacciones de ligación de DNA

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una relación estequiométrica inserto:vector de 3:1 o de 5:1. Para calcular esta relación molar entre un fragmento y un vector concreto se aplicó la ecuación:

$$\text{cantidad de inserto (ng)} = \frac{(\text{cantidad de vector [ng]})(\text{tamaño del inserto [kb]})}{\text{tamaño del vector [kb]}} \times \text{relación molar inserto : vector}$$

La reacción contenía las cantidades de inserto y vector (cortados y purificados) necesarias para obtener las proporciones molares mencionadas, 1X de tampón de ligación (Invitrogen®) y 1 U de T4 DNA ligasa (Invitrogen®) en un volumen total de 10 µL. Las reacciones se realizaron a 16 °C durante 16 h en un baño de agua (Thermomix® BU acoplado a Frigomix® U, B. Braun). En las ligaciones con el vector pGEM® T-easy (Promega) se utilizó el kit proporcionado por la casa comercial y se siguieron sus recomendaciones.

## 2.4 TRANSFORMACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

La cepa de *Escherichia coli* que se empleó en las transformaciones fue ElectroMAX™ DH10B™. Para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con el vector binario pBIN-JIT así como las plantas de *Medicago truncatula* y *Pisum sativum* con los vectores binarios pCAPE1 y pCAPE2 se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58/pMP90 (GV3101); para la transformación de *Medicago truncatula* con construcciones en el

plásmido binario pGreenII se utilizó la cepa C58/pMP90 que ya poseía el plásmido auxiliar pSoup.

#### 2.4.1 Preparación de células competentes y transformación por electroporación

La preparación de células competentes para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según el protocolo descrito en el catálogo Pulse controller, Accessory for bacterial and fungal electro-transformation (Bio-Rad) en el caso de *E. coli* y según Shen y Forde (1989) en el caso de *A. tumefaciens*.

Tras descongelar en hielo una alícuota de 40  $\mu$ L de células electrocompetentes, se añadió 1  $\mu$ L del vector transformante. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0,1 cm de separación entre electrodos (Bio-Rad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser™ (Bio-Rad). Las condiciones de electroporación fueron 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1,8 kV para *E. coli* y 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 1,8 kV para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico se añadió 0,75 mL de LB y se incubó con agitación suave 1 h a 37 °C para *E. coli* y 3 h a 28 °C para *A. tumefaciens*.

#### 2.4.2 Selección de recombinantes bacterianos

La selección de recombinantes se llevó a cabo mediante la siembra del sedimento bacteriano procedente del cultivo transformado en placas Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado según el plásmido utilizado. En la Tabla 4 se muestran los antibióticos utilizados para la selección de recombinantes bacterianos y las concentraciones usadas.

Tabla 4. Antibióticos y concentraciones utilizadas

Antibiótico	Concentración ( $\mu$ g/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicilina	100	-
Kanamicina	50	50
Rifampicina	-	100
Gentamicina	-	30

En los casos en que el vector empleado permitía seleccionar las células transformadas por  $\alpha$ -complementación, se añadió al medio 20 mg/mL del sustrato cromogénico 5-

bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal, Duchefa). Las placas se incubaron bajo las condiciones descritas en el apartado 1.2.2.

## 2.5 SECUENCIACIÓN

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA 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).

Se utilizaron tanto cebadores propios de los vectores plasmídicos como cebadores internos de los fragmentos de DNA objeto de estudio (ver Tabla 10).

### 2.5.1 Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó a través de aplicaciones de páginas web en internet. En la Tabla 5 se describen las páginas web y los programas en línea comúnmente utilizados en este trabajo.

Tabla 5. Páginas web utilizadas para el análisis de secuencias

Página web	Organización	Programa	Uso
<b>www.ebi.ac.uk</b>	European Bioinformatics	Align	Alinear dos secuencias
	Institute (EMBL)	ClustalW2	Alinear varias secuencias
<b>www.expasy.ch</b>	Swiss Institute of	Translate	Traducir cDNA a proteína
	Bioinformatics	Genewise	Comparar secuencia genómica con secuencia proteica
<b>www.ncbi.nlm.nih.gov</b>	National Center for Biotechnology Information	PROSITE	Determinar dominios y familias génicas en proteínas
		BLAST	Búsqueda de homologías
<b>www.bioinformatics.org</b>	Bioinformatics Organization, Inc.	Reverse complement	Generar secuencias reversas y/o complementarias
<b>//pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html</b>	Perrière y Gouy, 1996	NJplot	Generar árboles filogenéticos

## 2.6 ESCRUTINIO DE GENOTECA DE *Medicago truncatula*

Los clones de cDNA estudiados en este trabajo proceden del escrutinio de la genoteca de cDNA construida en nuestro laboratorio según las instrucciones del sistema “HybriZAP®-2.1 XR Library Construction Kit and HybriZAP®-2.1 XR cDNA Synthesis Kit”. La genoteca se construyó a partir de mRNA de ápices florales de *M. truncatula* en el vector HybriZAP®-2.1 (Benlloch, R. Tesis Doctoral, 2005).

### 2.6.1 Titulación y rastreo de la genoteca

La genoteca se tituló al inicio de cada rastreo primario siguiendo el manual de instrucciones del sistema “HybriZAP®-2.1 XR Library Construction Kit and HybriZAP®-2.1 XR cDNA Synthesis Kit”. Esta titulación permitió determinar la concentración de la genoteca en pfu/ $\mu$ L (“plaque forming units” o calvas).

En cada escrutinio primario de la genoteca se emplearon 15 placas Petri de 140 mm que contenían 50.000 pfu por placa, 750.000 pfu en total. Las placas Petri se incubaron a 37 °C durante 6–8 h hasta que las calvas de lisis eran visibles y entonces se procedía a la transferencia de las mismas a membranas circulares de nylon.

### 2.6.2 Transferencia a membrana

La transferencia de las calvas desde el medio sólido a las membranas de nylon (Hybond™-N+, Amersham) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Sobre cada placa se depositó una membrana durante 1 minuto, se numeró y orientó con la placa marcando mediante perforaciones de aguja. La membrana se separó y colocó 5 minutos sobre papel Whatman 3MM humedecido con solución desnaturalizante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) y después en solución neutralizante (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCL pH 7,5), dejando la cara de la membrana que no había estado en contacto directo con el medio sobre el papel. Las membranas se secaron sobre papel de filtro y finalmente el DNA se fijó por tratamiento con luz ultravioleta utilizando indistintamente las cámaras de irradiación UV Stratalinker® 1800 (Stratagene) o UVC 500 UV Crosslinker (Amersham). Este proceso se realizó por duplicado para cada placa.

### 2.6.3 Síntesis de sondas radiactivas

Las sondas radiactivas se sintetizaron mediante el sistema Ready-To-Go™ DNA Labeling Beads (-dCTP) (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este

sistema se basa en el uso de cebadores al azar que se unen al DNA molde permitiendo la síntesis de la cadena complementaria (Feinberg y Vogelstein, 1983). En cada reacción se utilizó 60 ng de DNA molde y 50  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$  (Amersham). Una vez sintetizadas las sondas, se purificaron para eliminar los nucleótidos no incorporados mediante columnas de cromatografía de exclusión molecular “Quick Spin Columns for radiolabeled DNA purification, Sephadex G-50” (Roche) según el procedimiento indicado por el fabricante.

#### **2.6.4 Hibridación y lavados**

El escrutinio de la genoteca se realizó con el objeto de aislar miembros de la familia de genes MADS-box de *Medicago truncatula*. Se utilizó como sonda un fragmento de 231 pb correspondiente a la secuencia codificante del dominio MADS aislado del gen *MtPISTILLATA* de *Medicago truncatula*, clonado previamente en el vector pGEM<sup>®</sup> T-easy (Benlloch, R., Tesis Doctoral, 2005).

Las hibridaciones se llevaron a cabo por duplicado en un horno de hibridación “Hybridization oven/shaker RPN 2510” (Amersham) en condiciones de alta y baja astringencia. Primero las membranas se incubaron durante 30 minutos en 50 mL de solución de prehibridación (0,3 M tampón fosfato pH 7,2, 7% SDS [p/v], 1 mM EDTA) y posteriormente se pasaron a 50 mL frescos de la misma solución, que contenía la sonda desnaturalizada 4 minutos a 95 °C. Tras un periodo de hibridación de al menos 16 h a 52 °C (baja astringencia), las membranas se lavaron 30 minutos en SSC 2X, SDS 0,1% (p/v) y posteriormente 30 minutos en SSC 0,5X, SDS 0,1% (p/v), controlando constantemente el proceso mediante un contador Geiger. Las réplicas de éstas membranas se procesaron de la misma manera, pero hibridando al menos 16 h a 65 °C (alta astringencia).

#### **2.6.5 Detección de la señal: autorradiografía**

Las membranas lavadas se sellaron en plástico y se expusieron a una película radiográfica FUJI Medical 100NIF X-ray film (FUJIFILM) en casetes de autorradiografía. Durante la exposición se mantuvo a -80 °C y finalmente se reveló en una procesadora automática X-OMAT 2000 Processor (Kodak).

#### **2.6.6 Identificación y aislamiento de clones positivos**

Para eliminar del rastreo clones del gen *MtPI*, se compararon las autorradiografías de las membranas hibridadas a 52 °C y a 65 °C y se aislaron aquellas calvas que tenían señal

positiva únicamente en condiciones de baja astringencia, haciendo coincidir las películas radiográficas con las placas Petri correspondientes. Las calvas positivas aisladas del escrutinio primario se sometieron a un segundo y tercer rastreo hasta aislar y purificar completamente el fago positivo. Los plásmidos que contenían el clon positivo se escindieron del fago siguiendo el protocolo indicado en el manual de instrucciones “HybriZAP®-2.1 XR Library Construction Kit and HybriZAP®-2.1 XR cDNA Synthesis Kit”. Una vez aislado el clon se procedió a su secuenciación.

## 2.7 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN

### 2.7.1 Análisis *Northern blot* y *Southern blot*

#### 2.7.1.1 Electroforesis de RNA y DNA para transferencia a membrana

Para el análisis Northern, la separación del RNA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel desnaturante de agarosa al 1% (p/v) y formaldehído 5% (v/v) en tampón MEN 1X (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 2 mM EDTA, pH 7,0), según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Cada muestra se componía de 15 µg de RNA total en un volumen de 15 µL, al que se añadió 23,4 µL de tampón de carga (4,5 µL formaldehído, 15 µL formamida, 3,8 µL MEN 10X, 0,1 µL bromuro de etidio), se desnaturizó a 65 °C durante 10 minutos y se cargó en el gel. La electroforesis se desarrolló a 90 V durante aproximadamente 1,5 h.

Para el análisis Southern, 10 µg de DNA genómico se digirieron con 2µL de diferentes enzimas de restricción en condiciones adecuadas, en un volumen total de 40 µL. Al inicio de la reacción se añadió la mitad del enzima y tras 2–3 h de incubación el resto, continuando con la incubación durante una noche. La reacción de restricción se detuvo añadiendo 3 µL de 0,5 M EDTA pH 8,0 y se comprobó cargando 2 µL en un gel de agarosa al 0,8% (p/v). Al DNA genómico digerido se añadió 9 µL de tampón de carga (6X DNA Loading Dye, Fermentas), se incubó durante 5 minutos a 65 °C e inmediatamente se cargó en un gel de agarosa al 0,7% (p/v) en TBE 1X. La electroforesis se desarrolló a un voltaje de 35–40 V durante aproximadamente de 20 h.

### 2.7.1.2 Transferencia y fijación de RNA y DNA a membrana

En el análisis Northern, antes de la transferencia a membrana, el gel se enjuagó 3 ó 4 veces en agua destilada, para eliminar el exceso de bromuro de etidio.

En el análisis Southern, antes de la transferencia a membrana, el gel se enjuagó durante 5 minutos en agua, posteriormente se lavó en HCl 0,125 M durante 15 minutos y nuevamente se enjuagó en agua. Después el DNA se desnaturalizó sumergiendo el gel en un tampón de desnaturalización (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) durante 30 minutos y se enjuagó en agua. Finalmente, el gel se incubó en un tampón de neutralización (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl) durante 30 minutos y se enjuagó en agua. Todos los lavados se realizaron en agitación.

Tanto el RNA como el DNA se transfirieron de gel a membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham) por capilaridad, en tampón SSC 20X, según el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989). La transferencia se realizó durante una noche y finalmente los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana con luz ultravioleta utilizando la cámara de irradiación UVC 500 UV Crosslinker (Amersham).

### 2.7.1.3 Marcaje de sondas radiactivas

La obtención y marcaje de sondas radiactivas se efectuó según el apartado 2.6.3. Los oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar las sondas de cada gen se muestran en la Tabla 10. Las secuencias nucleotídicas de las sondas obtenidas mediante PCR se comprobaron mediante restricción y secuenciación.

### 2.7.1.4 Prehibridación e hibridación

El proceso de hibridación se realizó como se indica en el apartado 2.6.4, enjuagando las membranas con SSC 2X antes de prehibridarlas. Las hibridaciones se realizaron a 65 °C durante 14–18 h, en un horno de hibridación Roller-Blot Hybridiser HB-3D (TECHNE). Aunque los lavados típicamente se realizaron como se indica en el apartado 2.6.4, estos variaban en función de la intensidad de la señal. Las membranas se expusieron a películas radiográficas FUJI Medical 100NIF X-ray film (FUJIFILM) en casetes de autorradiografía y finalmente se revelaron en una procesadora automática X-OMAT 2000 Processor (Kodak).



### 2.7.2 PCR cuantitativa a tiempo real

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos en las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) fueron diseñados a partir de las regiones génicas de interés con el programa Primer Express® v2.0 (Applied Biosystems) siguiendo los parámetros establecidos por defecto. En la Tabla 6 se muestran los genes analizados mediante qRT-PCR, así como los oligonucleótidos empleados en cada caso.

**Tabla 6. Genes analizados mediante qRT-PCR y oligonucleótidos empleados**

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Amplificación (pb)
<b>MtAGa</b>	qMtAGa1dir	AGAGCAAAGATAGCTGAAAGTGAGAG	54
	qMtAGa1rev	ATTAATATTGCTATGGTGGCTATGG	
<b>MtAGb</b>	qMtAGb2dir	ACATTGAGTATGGAGATTACACATTGG	52
	qMtAGb2rev	GAAAGTAGAATAAGGGTGATACATGCC	
<b>TC77416</b>	SecDIRqRT	TGGCTACTAGGGTTGCTGGC	51
	SecREVqRT	CCTCACCCAGTCCAGTGGAA	
<b>PsAGa</b>	qPsAGa1dir	GTGTATTACCTGGAGGCACAACTAT	52
	qPsAGa1rev	TGCTGAGTCTGAGATTGCATGG	
<b>PsAGb</b>	PsAGb2dir	GAGTTTCTGGTATTTGAATCTTGACA	51
	PsAGb2rev	CTTTACGCATACGCTATCATAAGATTG	
<b>Actina</b>	Actina11.DIR	AGGTGCTGTACCAACCATCCA	51
	Actina11.REV	CGTGAATTCCTGCTGCTTCC	

La extracción de RNA de las muestras utilizadas para qRT-PCR se realizó como se indica en el apartado 2.1.4. Tras la extracción, para eliminar el DNA genómico, se realizó un tratamiento de desoxirribonucleasa exógena (DNA-free™ DNase Treatment & Removal, Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído y purificado se utilizó el sistema PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa), partiendo de 4 µg de RNA y siguiendo las indicaciones del proveedor. Este kit sintetiza la primera hebra de cDNA a partir de RNA usando PrimeScript™, una retrotranscriptasa basada en el MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), y como cebador el Oligo dT. El cDNA obtenido se trató con ribonucleasa incubando cada muestra 20 minutos a 37 °C con 1 µL de RNasa H (Invitrogen).

La qRT-PCR se llevó a cabo en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System acoplado con el programa informático 7500 Fast System Software v1.3.1 (ambos de Applied Biosystems). Se utilizó el programa de amplificación recomendado por el fabricante para oligonucleótidos diseñados mediante Primer Express® y consistió en una atemperación de 2 minutos a 50 °C, una desnaturalización de 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de amplificación, que consistían en una desnaturalización de 15 segundos a 95 °C y una elongación de 1 minuto a 60 °C.

Las mezclas de reacción se prepararon en placas “MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode” (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µL, con 1200 ng de cDNA, 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), y los dos oligonucleótidos a una concentración final de 0,3 µM.

El cálculo de la eficiencia de los cebadores se realizó mediante qRT-PCR usando como molde diluciones (1/5, 1/25 y 1/125) de DNA que contenía el amplicón a estudiar. Se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia estuvo entre 90–100%.

Las cuantificaciones se realizaron a partir de las reacciones de qRT-PCR en las cuales cada muestra se determinó por triplicado. El ciclo umbral (Ct) fue calculado por el software del equipo y es el ciclo en el que comienza a detectarse el amplicón. Los resultados obtenidos se estandarizaron a los niveles de los genes constitutivos normalizadores, los cuales fueron: *TC77416* (homólogo a *Secret Agent* de *Arabidopsis thaliana* [Hartweck *et al.*, 2002]) en el caso de la qRT-PCR de *Medicago truncatula* y *Actina* (Foo *et al.*, 2005) en el caso de la qRT-PCR de *Pisum sativum*. Los niveles relativos de transcrito se calcularon usando el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001), que se resume en la expresión algebraica:

$$\text{Inducción} = 2^{[\Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{control})]}$$

$$\Delta Ct(\text{muestra}) = Ct(R)_m - Ct(R)_c$$

$$\Delta Ct(\text{control}) = Ct(P)_m - Ct(P)_c$$

Donde  $Ct(R)_m$  y  $Ct(R)_c$  son el valor de Ct para los genes normalizadores en el tratamiento analizado y en el que se considera como control, respectivamente. Del mismo modo,  $Ct(P)_m$  y  $Ct(P)_c$  son el valor de Ct del gen estudiado en el tratamiento analizado y en el que se considera como control, respectivamente.

Todos los análisis de expresión por qRT-PCR se realizaron sobre al menos dos réplicas biológicas, obteniéndose resultados similares. Los resultados que se muestran corresponden a una sola réplica significativa.

### 2.7.3 Hibridaciones *in situ* de mRNA

Las hibridaciones *in situ* de mRNA se realizaron sobre secciones longitudinales de ápices vegetativos, inflorescentes o frutos de *Medicago truncatula* siguiendo el protocolo descrito por Ferrándiz *et al.* (2000).

#### 2.7.3.1 Generación de ribosondas marcadas con digoxigenina

Las ribosondas monocatenarias se sintetizaron a partir de fragmentos de cDNA específicos para cada gen clonados en el vector pGEM® T-easy. Esta construcción se linearizó con los enzimas correspondientes y se transcribió para generar las ribosondas “antisentido”. También se generó una sonda “sentido” que se utilizó como control negativo frente a hibridaciones inespecíficas. En la Tabla 7 se detallan los fragmentos de cDNA utilizados como moldes para cada sonda.

**Tabla 7. Sondas utilizadas en las hibridaciones *in situ***

Clon (es)	Nombre <sup>a</sup>	Fragmento <sup>a</sup>
12.11.1	<i>MtAGa</i>	572-813
15.5.1	<i>MtAGb</i>	558-773
12.9.1	<i>MtTM6</i>	362-689
8.1.1	<i>MtNMH7</i>	289-734
6.6.1	<i>MtAGL6</i>	324-682
8.2.1	<i>MtAGL6-like</i>	267-686
12.1.1	<i>MtSOC1-like</i>	277-650
15.4.1	<i>MtSEP</i>	219-588
14.4.1	<i>MtSHP</i>	452-818
1.3.1	<i>MtSOC1a</i>	528-721
14.3.2	<i>MtSOC1b</i>	429-616

<sup>a</sup> Nombre asignado por homología a genes conocidos de otras plantas modelo

<sup>b</sup> Numeración referida a los nucleótidos del cDNA considerando la adenina del codón de inicio como 1.

Para la transcripción *in vitro* se usaron como molde 2 µg de plásmido linearizado para una reacción de 20 µL que contenía 2 µL 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 µL de inhibidor de RNasas (Protector RNase Inhibitor, Roche), 2 µL de la polimerasa de RNA correspondiente (T7 o SP6, Roche) y 2 µL del tampón 10X correspondiente (Roche). La reacción tuvo lugar a 37 °C durante 1,5 h.

Tras la incubación se trataron las sondas 15 minutos a 37 °C con 1 µL de DNase I RNase-free (Roche), se precipitaron con tRNA de levadura (10 µg/µL, Roche), 0,7 M acetato amónico y 220 µL de etanol 96% (v/v) y se almacenaron a -20 °C. La eliminación de DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v).

#### 2.7.3.2 Cuantificación de las sondas

Se centrifugaron las sondas a 13.000 rpm durante 15 minutos, se lavaron en etanol 80% (v/v) y una vez secas se resuspendieron en 10 µL de agua desionizada estéril. Con 1 µL de esta disolución se prepararon diluciones 1/250, 1/1000 y 1/2500 para cuantificar la sonda. Se aplicó 1 µL de cada dilución a una membrana de nylon (*dot blot*) que se secó y se fijó con luz ultravioleta.

La membrana se reveló junto con una tira de control de concentraciones de RNA “DIG Control Teststrips” (Roche) incubando ambas 2 minutos en TBS 1X (stock 10X: 1 M Tris-HCl, 4 M NaCl, pH 7,5) y a continuación 10 minutos en TBS 1X con 0,5% Blocking Reagent (Roche). Se lavó 5 minutos en TBS 1X con 1% BSA (p/v) y 0,3% Tritón X-100 (v/v) y luego 20 minutos en la misma solución adicionada con 2 µL de anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche). Tras lavar en tampón de detección 1X (stock 10X: 1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, 0,5 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) se reveló en 5 mL del mismo tampón 1X con sustrato [7,5 µL de NBT (100 mg/mL) y 150 µL de BCIP (50 mg/mL), Roche] hasta visualizar el último punto de la tira control. La concentración de sonda a utilizar en cada caso fue la que más se aproximó al penúltimo punto de esta tira control.

#### 2.7.3.3 Preparación de las muestras

Las muestras se recogieron directamente en FAE [50% etanol (v/v), 5% ácido acético glacial (v/v) y 3,7% formaldehído (v/v)]. Se infiltraron al vacío usando una bomba de paletas rotativas RV5 (EDWARDS) durante 30 minutos en total, repartidos en dos tandas de 15 minutos realizadas en 3 pulsos de 5 minutos cada uno. La solución fijadora se cambió por solución fresca entre cada tanda y al finalizar la infiltración, dejando reposar durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación las muestras se deshidrataron en series de etanol en concentraciones crecientes (70% y 95%) de 30 minutos cada una, tiñendo finalmente el tejido en Eosina-Y al 0,2% en etanol al 96% a 4 °C durante la noche.

Posteriormente, las muestras se incubaron por duplicado en etanol al 100% y luego en concentraciones crecientes (25%, 50%, 75% y dos al 100%) de disolvente histológico Histo-Clear® (National Diagnostics), durante 1,5 h cada incubación. Finalmente se añadió un volumen de parafina Paraplast® Plus (McCormick Scientific) fundida a 58 °C y se incubó una noche a esa temperatura.

Al día siguiente se sustituyó la mezcla por parafina 100%, realizando cambios de parafina cada 3 horas hasta la total eliminación del Histo-Clear®. Las muestras se acomodaron en moldes de aluminio (Selecta) con parafina líquida, se cubrieron con un soporte plástico y se dejaron solidificar a 4 °C.

Se obtuvieron cortes histológicos de 8 µm de espesor de las muestras vegetales incluidas en parafina utilizando un microtomo MICROM HM 330 con cuchillas Accu-Edge® (Sakura), los cuales se colocaron en portaobjetos.

#### 2.7.3.4 Prehibridación e hibridación

El tejido se desparafinó en los portaobjetos con Histo-Clear® y se rehidrató en series de etanol a concentraciones decrecientes de 2 minutos cada una. Se hidrolizaron las proteínas durante 20 minutos con HCl 0,2 M y posteriormente se incubó 15 minutos a 37 °C con “Proteinase K, recombinant PCR Grade” (1 µg/µL, Roche). Los portaobjetos se lavaron con PBS 1X (stock 20X: 2,75 M NaCl, 50 mM KCl, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 35 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) y se bloqueó la acción de la proteinasa incubando 2 minutos en 1X PBS con glicina al 0,2% (p/v). Tras lavar con PBS 1X se refijó el tejido durante 10 minutos con una solución de PBS 1X y formaldehído al 4% (v/v), seguido de dos lavados con PBS 1X. Se deshidrató el tejido en series crecientes de etanol de 2 minutos hasta llegar al etanol absoluto y se dejó secar.

Para la hibridación, se precalentaron los portaobjetos con el tejido en una placa calefactora (Multiplaces, JP Selecta) a 55 °C. Las sondas se diluyeron en tampón de hibridación [SSC 6X (stock 20X: 3 M NaCl, 0,3 M citrato sódico, pH 7,0), 1,5% SDS (p/v), 50% formamida (v/v), tRNA de levadura (100 µg/mL)] hasta la concentración establecida en la cuantificación y se desnaturalizaron a 80 °C durante 2 minutos. Se aplicaron 300 µL de la solución de hibridación a cada portaobjetos y se colocaron enfrentados uno a uno a modo de emparedado. Los portaobjetos apareados se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 53 °C.

### 2.7.3.5 Inmunodetección colorimétrica de la señal

Tras separar los portaobjetos por inmersión en SSC 2X con 50% formamida (v/v), se realizaron dos lavados de 1,5 h cada uno en esta misma solución, a 53 °C. Los portaobjetos se incubaron en TBS 1X durante 5 minutos, luego 1 h en TBS 1X con 0,5% Blocking Reagent (Roche) y 30 minutos en TBS 1X con 1% BSA (p/v) y 0,3% Tritón X-100 (v/v). A continuación, se incubaron 1,5 h en esta última solución con el anticuerpo Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche) en dilución 1:3.000. Se lavaron tres veces con la misma solución sin anticuerpo y se añadió tampón de detección, compuesto por una mezcla 1:1 de tampón A 1X y tampón B 1X (Tampón A 10X: 1M Tris-HCl, 1M NaCl, pH 9,5. Tampón B 10X: 0,5 M MgCl<sub>2</sub>, 4M NaCl) sin sustratos durante 5 minutos. Finalmente se reemplazó por tampón de detección fresco suplementado con los sustratos NBT y BCIP, 1,5 µL de cada uno por cada mL de tampón (NBT/BCIP Stock Solution, Roche). Se incubó en oscuridad durante el tiempo requerido para observar señal. La reacción se detuvo reemplazando la solución de detección por agua.

Las muestras se visualizaron como se describe en el apartado 4.2.2.

## 3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

### 3.1 DISEÑO DE CONSTRUCCIONES

#### 3.1.1 Construcciones generadas para el silenciamiento de los genes *AGAMOUS* de *Medicago truncatula* mediante RNA interferente

Las construcciones para el silenciamiento de los genes *MtAGa* y *MtAGb* se generaron utilizando el plásmido pHANNIBAL. Este plásmido presenta dos sitios de clonación separados por un intrón, lo que permite clonar el mismo fragmento del gen en sentido y antisentido, consecutivamente. El fragmento utilizado para el gen *MtAGa* fue de 241 pb y se amplificó con los cebadores AGaRNAid y AGaRNAir (Tabla 10), que añaden los sitios de corte *XhoI*–*XbaI* en el cebador directo y *HindIII*–*EcoRI* en el cebador reverso. Por otro lado, el fragmento usado para el gen *MtAGb* fue de 215 pb y se amplificó con los cebadores AGbRNAid y AGbRNAir (Tabla 10), que añaden *XhoI*–*XbaI* en el cebador directo y *BamHI*–*EcoRI* en el cebador reverso. Los fragmentos amplificados se purificaron y clonaron en el pGEM® T-easy, de donde posteriormente se escindieron

mediante restricción, generando cuatro fragmentos distintos: *XhoI*–*MtAGa*–*EcoRI*, *XhoI*–*MtAGb*–*EcoRI*, *XbaI*–*MtAGa*–*HindIII* y *XbaI*–*MtAGb*–*BamHI*.

La clonación de los fragmentos en pHANNIBAL se realizó en dos pasos. Primero se clonaron los fragmentos *XhoI*–*EcoRI*, dando lugar a [pHANNIBAL–fragmento “sentido”], comprobando a continuación esta clonación por restricción con los mismos enzimas. Se prosiguió con la clonación de los fragmentos *XbaI*–*MtAGa*–*HindIII* y *XbaI*–*MtAGb*–*BamHI* digiriendo la construcción transitoria [pHANNIBAL–fragmento “sentido”] con los enzimas que flanqueaban el fragmento a insertar. La clonación de los fragmentos “sentido” y “antisentido” se comprobó por restricciones simples y dobles y por secuenciación.

El vector pHANNIBAL no puede utilizarse para transformar plantas, por lo que la construcción se subclonó en el vector pGreenII-nosbar. El casete, que contenía el promotor CaMV 35S y las dos copias del fragmento génico separadas por el intrón PDK, se escindió de la construcción transitoria pHANNIBAL mediante digestión con *NotI* y se clonó en el sitio *NotI* del vector pGreenII-nosbar (Benlloch, R. Tesis Doctoral, 2005). En la Figura 9 se esquematiza la generación de las construcciones de silenciamiento de los genes *MtAGa* y *MtAGb* mediante RNA interferente (RNAi).

Las construcciones pGreenII-nosbar RNAi *MtAGa* y pGreenII-nosbar RNAi *MtAGb* se introdujeron en la cepa de *A. tumefaciens* C58/pMP90 que ya contenía el vector pSoup (vector binario que permite la replicación del pGreen y la transferencia del T-DNA). Dicha cepa se utilizó para generar plantas transgénicas de *M. truncatula*.

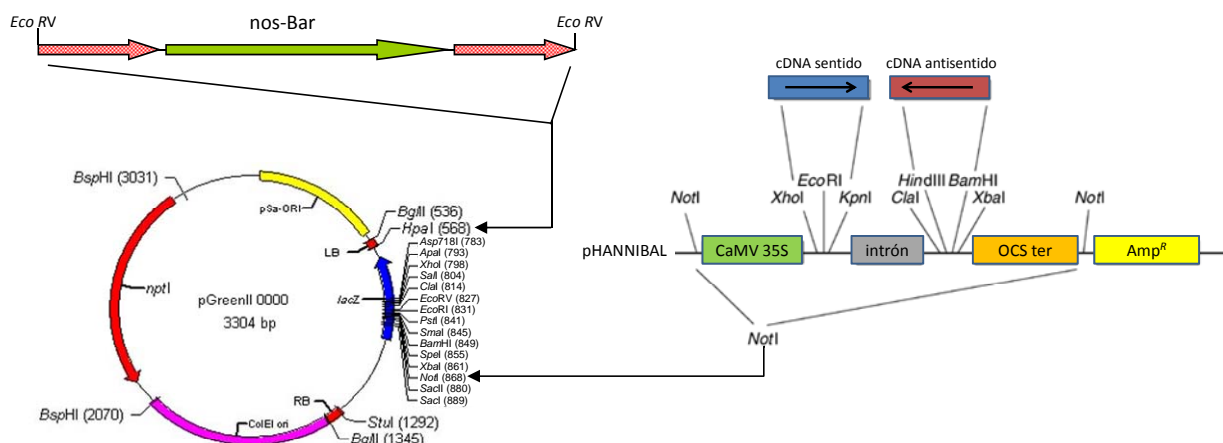
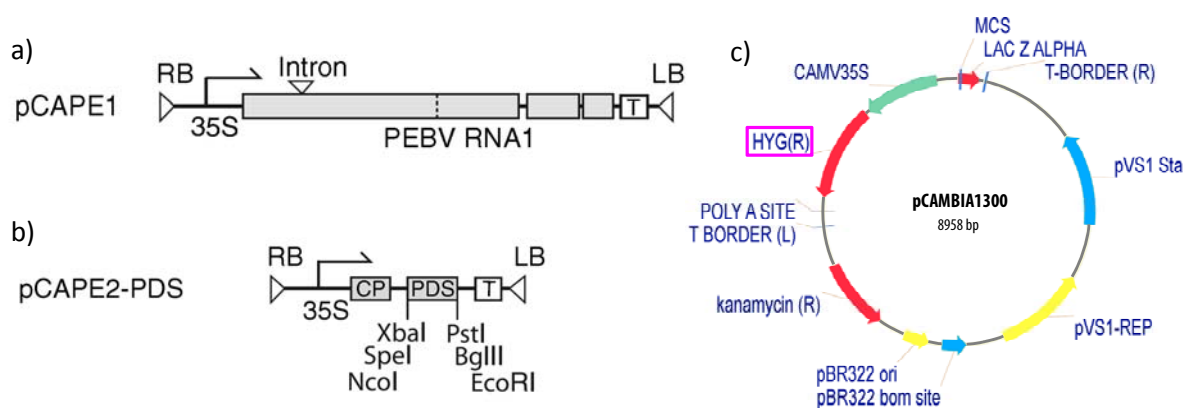


Figura 9. Generación de las construcciones de silenciamiento génico mediante RNAi

### 3.1.2 Construcciones generadas para el silenciamiento de los genes *AGAMOUS* de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* mediante silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

En los experimentos de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) tanto de *Pisum sativum* como de *Medicago truncatula*, se utilizaron los vectores pCAPE1 y pCAPE2-PDS, cedidos por la Dra. Elisabeth Johansen (Aarhus University, Dinamarca).

Estos vectores contienen, respectivamente, el RNA1 y el RNA2 del *Pea early-browning virus* (PEBV), bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador NOS, clonados en el vector binario pCAMBIA-1300 (CambiaLabs), en el cual reemplazan al casete de resistencia a higromicina (Figura 10). La descripción completa de la construcción de estos vectores se detalló en Constantin *et al.*, (2004).



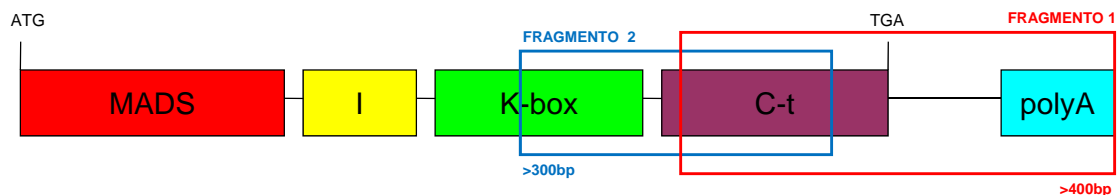
**Figura 10. Descripción de los vectores pCAPE1 y pCAPE2.** Los casetes RNA1 y RNA2 de expresión del PEBV insertados entre los bordes izquierdo y derecho de un vector derivado del pCAMBIA-1300 se integran entre el promotor 35S y el terminador NOS (T). a) pCAPE1 contiene el cDNA completo del RNA1 y un intrón insertado para estabilizar el plásmido en la bacteria. b) pCAPE2-PDS contiene el cDNA del RNA2 con una inserción de un fragmento de 470 pb del *PsPDS* supliendo a los genes requeridos para la transmisión de nemátodos; CP es la región codificante de la proteína de la cápside (Imágenes tomadas de Constantin *et al.*, 2004). c) Mapa del plásmido pCAMBIA-1300. En el recuadro rosa se señala el casete de resistencia a la higromicina eliminado para la generación de las construcciones pCAPE.

Las construcciones VIGS de los genes que se deseaba silenciar se generaron utilizando el vector pCAPE2-PDS. En este vector la región codificante *PsPDS* está flanqueada por los sitios de restricción *NcoI*, *SpeI* y *XbaI* al inicio y *PstI*, *BglII* y *EcoRI* al final, lo que permite suplir el fragmento *PsPDS* con fragmentos de cDNA de los genes que se desea silenciar.

Por cada gen se diseñaron dos construcciones, con la finalidad de estudiar las diferencias en el efecto del silenciamiento generado al utilizar diferentes fragmentos del mismo gen. Se utilizaron fragmentos superiores a 300 pb que solapan en menos del 50% de la secuencia, intentando que uno de ellos fuera de más de 400 pb. En la Figura 11 se



puede ver el esquema general de los genes MADS-box, en el cual se delimitan los fragmentos utilizados en las construcciones VIGS. El fragmento de mayor tamaño (Fragmento 1) siempre fue aquel que permitía una mayor especificidad del silenciamiento del gen, al incluir parte de la región C-terminal y la región no codificante del mismo, zonas que son específicas para cada uno de los genes MADS-box.



**Figura 11. Esquema de la ubicación de los fragmentos VIGS en los genes MADS-box**

Los fragmentos de cDNA utilizados para las construcciones oscilaban entre 300 y 500 pb. Estos fragmentos se amplificaron utilizando cebadores específicos que añaden al inicio y al final del fragmento sitios de restricción que posteriormente permitirán clonar dichos fragmentos en el vector pCAPE2-PDS.

Los fragmentos amplificados se purificaron y clonaron en pGEM<sup>®</sup> T-easy, de donde posteriormente se escindieron mediante restricción doble con los enzimas correspondientes. Estos fragmentos se subclonaron directamente en el vector pCAPE2-PDS linealizado mediante restricción con los mismos enzimas. Esta clonación supuso la sustitución del fragmento *PsPDS* del vector por el fragmento de cDNA del gen de interés.

Se diseñó también una construcción que permitía el silenciamiento simultáneo de ambos genes *AGAMOUS* de *Pisum sativum*. Para generar dicha construcción, se utilizaron dos fragmentos, uno de 322 pb del gen *PsAGa* y uno de 320 pb del gen *PsAGb*, que se amplificaron utilizando cebadores específicos que añaden al inicio y al final del fragmento sitios de restricción que posteriormente permitirán clonar dichos fragmentos en el vector pCAPE2-PDS en tándem. Así pues, se amplificaron los fragmentos *NcoI-PsAGa-XbaI* y *XbaI-PsAGb-PstI*, que se clonaron de manera independiente en pGEM<sup>®</sup> T-easy para confirmar mediante secuenciación la integración de los sitios de restricción. Los fragmentos se escindieron y seguidamente el fragmento *NcoI-PsAGa-XbaI* se clonó en pCAPE2-PDS linealizado con *NcoI* y *XbaI*. Finalmente, tras comprobar la inserción mediante restricción, el fragmento *XbaI-PsAGb-PstI* se subclonó a la construcción

transitoria [pCAPE2-fragmento *PsAGa*], linearizada con los enzimas *XbaI* y *PstI*. También se diseñó una construcción equivalente para silenciar a la vez ambos genes *AGAMOUS* de *Medicago truncatula*.

En la Tabla 8 se resumen los diferentes fragmentos utilizados, así como los enzimas usados para la clonación de los mismos. En todos los casos se comprobó la clonación de los fragmentos en pCAPE2 por restricciones dobles y por secuenciación, y se procedió a la transformación de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58/pMP90 (GV3101) con las construcciones generadas, para su utilización posterior en la agroinfiltración de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula*.

**Tabla 8. Fragmentos utilizados para las construcciones VIGS**

Construcción	Fragmento (pb)	Ubicación <sup>a</sup>	S.R.A. <sup>b</sup> inicio	S.R.A. final
<i>pCAPE2-MtAGa</i>	478	572-1050	<i>NcoI</i>	<i>EcoRI</i>
<i>pCAPE2-MtAGabis</i>	396	312-708	<i>NcoI</i>	<i>EcoRI</i>
<i>pCAPE2-MtAGb</i>	486	564-1050	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>
<i>pCAPE2-MtAGbbis1</i>	399	312-711	<i>NcoI</i>	<i>EcoRI</i>
<i>pCAPE2-MtAGbbis2</i>	357	312-669	<i>NcoI</i>	<i>EcoRI</i>
<i>pCAPE2-MtAGdoble</i>	310 ( <i>MtAGa</i> )	572-882	<i>NcoI</i>	<i>XbaI</i>
	338 ( <i>MtAGb</i> )	564-902	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>
<i>pCAPE2-PsAGa</i>	413	572-985	<i>NcoI</i>	<i>EcoRI</i>
<i>pCAPE2-PsAGabis</i>	373	324-697	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>
<i>pCAPE2-PsAGb</i>	451	561-1012	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>
<i>pCAPE2-PsAGbbis1</i>	383	321-704	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>
<i>pCAPE2-PsAGbbis2</i>	341	321-662	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>
<i>pCAPE2-PsAGdoble</i>	322 ( <i>PsAGa</i> )	572-894	<i>NcoI</i>	<i>XbaI</i>
	320 ( <i>PsAGb</i> )	561-881	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>

<sup>a</sup> Numeración referida al cDNA considerando la adenina del codón de inicio como número 1.

<sup>b</sup> "Sitio de restricción añadido"

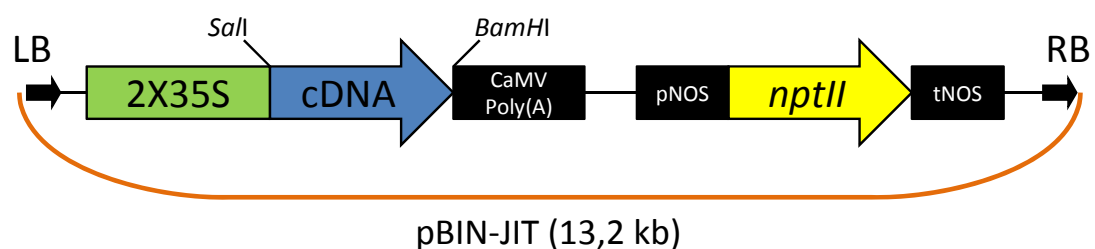
### 3.1.3 Construcciones generadas para la expresión constitutiva de los genes *AGAMOUS* de *Medicago truncatula* en *Arabidopsis thaliana*

Para ensayar los efectos de la expresión constitutiva de *MtAGa* y *MtAGb* en plantas transgénicas, el cDNA de cada uno de estos genes se clonó en el vector binario de expresión en plantas pBIN-JIT (Figura 12). El plásmido pBIN-JIT contiene una repetición en tándem del promotor 35S del CaMV y la secuencia de poliadenilación del CaMV,

procedentes del plásmido pJIT60 (Guerineau y Mullineaux, 1993) introducidas en el plásmido binario pBIN19. Para generar las construcciones, los cDNAs completos de *MtAGa* (782 pb) y *MtAGb* en sus formas L (“Long”, 734 pb) y S (“Short”, 692 pb) se amplificaron con los cebadores AGaSBXdir, AGaSBXrev, AGbSBXdir y AGbSBXrev (Tabla 10), que añaden el sitio de corte *Sall* en el cebador directo y *BamHI* en el cebador reverso.

Los fragmentos amplificados se purificaron y clonaron en el pGEM® T-easy, de donde posteriormente se escindieron mediante restricción doble *Sall*–*BamHI*. Estos fragmentos se subclonaron directamente en el vector pBIN-JIT linearizado también mediante digestión con *Sall*–*BamHI*, asegurando así la orientación del inserto en el vector.

Se comprobó la clonación de los fragmentos en pBIN-JIT por restricciones simples, dobles y por secuenciación, y se procedió a la transformación de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58/pMP90 con las construcciones generadas, para su utilización posterior en la transformación de *Arabidopsis thaliana*.



**Figura 12.** Construcciones utilizadas para la expresión constitutiva de los genes *AGAMOUS* de *M. truncatula*. El plásmido pBIN-JIT contiene el promotor CaMV 35S con el enhancer duplicado (2X35S), la secuencia de poliadenilación del CaMV y el gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina flanqueado por el promotor y el terminador NOS (del gen nopalina sintetasa).

## 3.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

### 3.2.1 Transformación estable de *Medicago truncatula*

El método de transformación genética utilizado para generar plantas en las que se silencian los genes *AGAMOUS* mediante RNA interferente está descrito en detalle en Trinh *et al.* (2001). Consiste en la infiltración de explantes de hoja de *M. truncatula* (2HA) con una suspensión de *A. tumefaciens* que contiene la construcción genética de

interés (ver apartado 3.1.1) y la posterior obtención de plantas transgénicas mediante embriogénesis somática.

Para cada experimento se utilizaron 50-100 explantes, que consistían en folíolos individuales de plantas de un mes. Los folíolos se lavaron en agua con una gota de detergente común, se enjuagaron y se esterilizaron por 14 minutos en agitación con lejía al 25% (v/v). Tras lavar varias veces con agua estéril, los folíolos se cortaron en cuadros con ayuda de un bisturí en condiciones de esterilidad. Un día antes se preparó un cultivo con 100 mL de LB líquido y los antibióticos correspondientes, que se inoculó con 50 µL de un precultivo saturado de una colonia aislada de *A. tumefaciens*. El cultivo se creció toda la noche a 28 °C en agitación. Posteriormente se centrifugó y el precipitado se resuspendió en medio líquido SH3a (Tabla 9) hasta DO<sub>600</sub> final de 0,2, calculando 50 mL de esta suspensión por cada 50 explantes a infiltrar.

Los folíolos cortados se infiltraron al vacío con esta suspensión durante 15 minutos y después se dejaron recuperar del estrés mediante una incubación de 1 h con agitación suave. Se secaron ligeramente y se colocaron en medio sólido SH3a, sobre el cual se incubaron 3 días a 24 °C en oscuridad. Pasado este tiempo los explantes se limpiaron del exceso de *A. tumefaciens* pasando cada explante varias veces por medio SH3a sólido con ayuda de pinzas y luego se transfirieron a medio SH3a sólido suplementado con 800 mg/L *Augmentine* (amoxicillin sodium / clavulanate potassium, Duchefa) y 0,55 mg/L *Basta* (PPT: dl-phosphinothricin, Duchefa). Las placas se incubaron 2 semanas a 24 °C en cámara de cultivo *in vitro* con 16 h de luz. Posteriormente los explantes se pasaron a medio CIM (Tabla 9), que favorece la formación de callo, suplementado con 400 mg/L de *Augmentine* y 0,55 mg/L de *Basta* incubando por 2 semanas y después al medio de proembriogénesis y selección EIM (Tabla 9) con 200 mg/L de *Augmentine* y 0,55 mg/L de *Basta* durante 4 semanas. La embriogénesis y desarrollo de plántulas se realizó en el siguiente medio EMB (Tabla 9) suplementado con 200 mg/L de *Augmentine* y 0,55 mg/L de *Basta* durante 4-5 semanas y finalmente las plántulas desarrolladas se enraizaron en medio PLANT (Tabla 9) con 200 mg/L de *Augmentine* durante 4-6 semanas.

Cuando las plántulas desarrollaron suficiente raíz, se transfirieron a macetas con una mezcla de turba y arena 3:1 (v/v) y se taparon con plástico para mantener las condiciones de humedad. Las condiciones del invernadero fueron las descritas en el

apartado 1.1.1.1 y, tras la aclimatación, se retiró el plástico y se realizó el seguimiento del crecimiento normal de las plantas.

**Tabla 9. Medios de cultivo utilizados en la transformación genética de *M. truncatula***

Medio	Composición (por litro)
<b>SH3a líquido</b>	100 mL macro N6major, 1 mL micro SHminor, 1 mL vitaminas SHvit, 100 mg myo-inositol, 20 mL EDFS, 5 mL 2,4-D (1 mg/mL), 0,5 mL BAP (1 mg/mL), 30 g sacarosa, pH 5,8
<b>SH3a sólido</b>	SH3a sólido suplementado con 3 g phytigel
<b>CIM</b>	50 mL macro UM, 10 mL micro UM, 10 mL vitaminas UM, 10 mL FeEDTA, 1 mL 2,4-D (1 mg/mL), 2 g hidrolizado de caseína, 0,25 g bactotripton, 0,9 g MES, 30 g sacarosa, 7,6 g agarosa, pH 5,8, 5 mL zeatina (0,4 mg/mL)
<b>EIM</b>	50 mL macro UM, 10 mL micro UM, 10 mL vitaminas UM, 10 mL FeEDTA, 2 g hidrolizado de caseína, 0,9 g MES, 30 g sacarosa, 7,6 g agarosa, pH 5,8, 2,5 mL zeatina (0,4 mg/mL)
<b>EMB</b>	50 mL macro UM, 10 mL micro P4, 10 mL vitaminas UM, 10 mL FeEDTA, 0,5 mL BAP (1 mg/mL), 0,1 mL NAA (1 mg/mL), 0,2 mL GA <sub>3</sub> (1 mg/mL), 0,25 g hidrolizado de caseína, 10 g sacarosa, 7,6 g agarosa, pH 5,8
<b>PLANT</b>	25 mL macro UM, 10 mL micro SH, 10 mL vitaminas SH, 1 g myo-inositol, 10 mL FeEDTA, 0,01 mL NAA (1 mg/mL), 10 g sacarosa, 2 g agarosa, 2 g agar Kalys, pH 5,9

**Composición de macroelementos, microelementos y vitaminas usados para preparar los medios:**

	Nombre	Composición
<b>Macroelementos</b>	N6 mayor	para 1 L: 1,85 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 28,3 g KNO <sub>3</sub> , 4,63 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1,66 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	UM	para 0,5 L: 19 g KNO <sub>3</sub> , 16,5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 3,7 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 1,7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4,4 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
<b>Microelementos</b>	SHminor	para 100 mL: 1 g MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 500 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 100 mg ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 100 mg KI, 10 mg NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 20 mg CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 10 mg CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
	UM	para 500 mL: 680 mg MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 430 mg ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 41,5 mg KI, 310 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 12,5 mg NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 1,25 mg CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 1,25 mg CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
	P4	para 500 mL: 500 mg MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 100 mg ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 37,5 mg KI, 150 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 12,5 mg NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 1,25 mg CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 1,25 mg CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
	SH	para 500 mL: 500 mg MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 50 mg ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 50 mg KI, 250 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 5 mg NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 10 mg CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, 5 mg CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
<b>Vitaminas</b>	SHvit	para 100 mL: 500 mg ácido nicotínico, 500 mg piridoxina HCl, 500 mg tiamina HCl
	UM	para 500 mL: 250 mg ácido nicotínico, 500 mg piridoxina, 500 mg tiamina, 100 mg glicina, 5 g myo-inositol
	SH	para 500 mL: 250 mg ácido nicotínico, 25 mg piridoxina, 250 mg tiamina

### 3.2.2 Transformación transitoria de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula*

La técnica de agroinfiltración usada en este trabajo para conseguir una transformación transitoria de las plantas de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* mediante silenciamiento génico inducido por virus se describe en detalle en Constantin *et al.* (2004).

Se inició con dos cultivos independientes de *Agrobacterium tumefaciens*: el que contenía el vector pCAPE1 y el que contenía la construcción generada en el vector pCAPE2 (ver apartado 3.1.2), crecidos sobre medio TYP sólido suplementado con 100 µg/mL rifampicina y 50 µg/mL kanamicina. A partir de una colonia aislada se prepararon precultivos en 3 mL medio TYP líquido suplementado con los antibióticos, que se dejaron

crecer toda la noche en agitación a 28 °C. Se prepararon los cultivos bacterianos calculando alrededor de 130 mL de cada cultivo por 10 plantas para agroinfiltrar. El cultivo consistió en medio TYP líquido suplementado con los antibióticos correspondientes e inoculado con 50 µL del precultivo por cada 100 mL de cultivo. Los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación de 180 rpm durante cerca de 17 h, hasta  $DO_{550}$  de 1,2–1,5 y se centrifugaron a 6.000 rpm en un rotor Sorvall SS34 (Thermo Scientific®) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el precipitado en medio de infiltración IVIM (10mM NaCl, 1,75 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 µM acetosiringona), calculando el volumen necesario mediante la fórmula:

$$mL\ IVIM = (0,1)(mL\ cultivo\ inicial)(DO_{550})$$

A continuación se incubó el cultivo resuspendido a temperatura ambiente durante 2 h sin agitación. Los cultivos, que contenían el vector pCAPE1 y la construcción pCAPE2 se mezclaron 1:1 y esta mezcla se utilizó para infiltrar los dos pares de hojas superiores más jóvenes de las plantas, por el envés, utilizando una jeringa de 1 mL sin aguja.

Para agroinfiltrar se usaron plantas de guisante cv. Bonneville cultivadas durante 2 semanas y plantas de *M. truncatula* cultivadas cerca de 1 mes en el invernadero antes de ser infiltradas (ver apartado 1.1.1).

A los 5 ó 6 días post inoculación (dpi) se recortaron los últimos 2–3 nodos de la planta, lo que impulsó la aparición de tallos secundarios. En el momento de realizar esta “decapitación” también se eliminaba cualquier tallo secundario existente. En el caso de *M. truncatula*, se decapitó el tallo principal alrededor del quinto o sexto nodo contando desde la base de la planta. Aproximadamente 14–20 dpi se desarrollaron las ramas secundarias. En guisante se eliminaron conservando únicamente una, la más grande que surge en la parte más baja de la rama principal que ha sido decapitada. Todas las demás ramas secundarias se fueron eliminando durante 1 a 2 semanas hasta que no aparecieron nuevas. Para *M. truncatula* se eliminaron los tallos secundarios dejando 3 ó 4 de ellos, eliminando después todos los que surgían en el tallo principal.

### **3.2.3 Transformación estable de *Arabidopsis thaliana* y análisis de plantas transgénicas**

Para la obtención plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron plantas silvestres del ecotipo *Columbia* (Col). La transformación se realizó siguiendo el método

descrito por Bechtold *et al.* (1993), modificado mediante la utilización del detergente Silwet® L-77 (HELENA®; Clough y Bent, 1998). Aproximadamente unas 60 semillas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 11 cm de diámetro, tal y como se describe en el apartado 1.1.1.3.2. Tras 2 semanas desde la siembra, se hizo un aclareo del exceso de plántulas favoreciendo el crecimiento homogéneo de la población; tras 2 semanas más, aproximadamente, cuando las plantas habían producido el tallo y la última hoja caulinar se había separado unos 2–3 cm del ápice de la inflorescencia principal, éste se decapitó para inducir la proliferación de las inflorescencias laterales. Una vez decapitadas, las plantas se cultivaron unos 4 días más antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración se preparó un precultivo de 10 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL rifampicina y 50 µg/mL kanamicina, se inoculó con la cepa de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés (apartado 3.1.3) y se incubó una noche en oscuridad, a 28 °C, con agitación de 200 rpm. Al día siguiente se preparó un cultivo de 600 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, se inoculó con el volumen total del precultivo y se incubó 48 h a 28 °C con agitación.

El día de la infiltración el cultivo se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos, el sedimento se resuspendió en 200 mL de medio de infiltración (2,2 g/L “Murashige & Skoog medium including vitamins” (Duchefa), sacarosa 5% (p/v), 0,05 mg/L BAP, 100 mg/L MES, pH 5,9) y se le adicionó 100 µL del detergente Silwet® L-77. Antes de la infiltración, las plantas se limpiaron de silicuas fertilizadas y flores abiertas. Para la infiltración a vacío, las macetas se invirtieron y se introdujeron en un recipiente con los 200 mL de la suspensión de *A. tumefaciens*, de manera que las plantas completas quedaban sumergidas en el líquido. El montaje se colocó dentro de una campana de vacío conectada a una bomba de vacío RV3 (EDWARDS) y se sometió a vacío durante 1 minuto. Después las plantas se secaron ligeramente con papel absorbente, se cubrieron con bolsas de plástico y se pasaron a las cabinas del invernadero. Para aclimatar las plantas, durante los 2–3 días siguientes a la infiltración se hicieron perforaciones en las bolsas y finalmente se eliminaron por completo, dejando crecer las plantas hasta obtener semillas maduras. Las silicuas maduras de las plantas transformadas se recogieron, se separaron de las semillas y éstas se guardaron en bolsas de celofán, secándolas en una estufa a 37 °C durante al menos una semana.

La selección de los transformantes primarios ( $T_1$ ) se hizo conforme a lo descrito en el apartado 1.1.1.3.1 y se realizó un análisis fenotípico de esta generación hasta el momento de recoger las semillas  $T_2$ .

## 4 TÉCNICAS DE FOTOGRAFÍA Y MICROSCOPIA

### 4.1 FOTOGRAFÍA DIGITAL

Para adquirir las imágenes deseadas de plantas transgénicas de *M. truncatula*, *P. sativum* y *A. thaliana* a gran escala, se utilizó una cámara digital COOLPIX P80 (Nikon) de 10,1 megapíxeles y con un objetivo NIKKOR zoom de 18 aumentos. Esta cámara permitió tomar fotografías de las plantas completas, así como flores completas o montajes de despieces de flores de guisante cuyo tamaño superaba el campo de visión de un microscopio estereoscópico.

### 4.2 MICROSCOPIA

#### 4.2.1 Microscopía estereoscópica

Las imágenes de flores enteras o despiezadas de plantas transgénicas de *Medicago truncatula* se adquirieron utilizando el microscopio estereoscópico SMZ800 acoplado con una cámara ColorView 12 (ambos de Nikon), provisto de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Intralux® 4000-1 ESD, Volpi) y ligado al software de procesamiento de imágenes AnalySIS software (versión 3.2, Nikon). Las imágenes de flores o racimos florales de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y los tejidos despiezados de flores transgénicas de *Pisum sativum* se adquirieron utilizando indistintamente el microscopio anterior o un microscopio estereoscópico MZ16F acoplado con una cámara DFC300 FX (ambos de Leica Microsystems). El software de procesamiento de imágenes ligado a este microscopio es Leica Application Suite (versión 2.6.0 R1). Este microscopio permite adquirir imágenes de hasta 115 aumentos, sin la necesidad de separar los tejidos de interés de la planta.



#### 4.2.2 Microscopía óptica

Los cortes histológicos hibridados mediante hibridación *in situ* y montados sobre portaobjetos se fotografiaron utilizando el microscopio óptico Eclipse E800 acoplado con una cámara DXM1200F (ambos de Nikon) y ligado al software de procesamiento de imágenes ACT-1 (versión 2.70, Nikon). Se utilizó iluminación de campo claro y la técnica de Nomarski (contraste diferencial por interferencia), que permite detectar cierto volumen en las muestras.

#### 4.3 CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El uso del criomicroscopio evitó la necesidad de fijar las muestras para su estudio. Se utilizó para fotografiar a nivel celular los tejidos de las flores de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Las muestras se procesaron en el servicio de microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia, donde se utilizó un microscopio electrónico de barrido JSM-5410 (JEOL) acoplado al instrumental de criomicroscopía “CryoTrans 1500 Cryo-Preparation System” (Oxford Instruments).

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en amplificaciones por PCR y reacciones de secuenciación

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Tamaño <sup>a</sup>	Tm <sup>b</sup>	Uso
MADS 3'	ACGGGGAGAAAAGAAAAGGA	20	58	Amplificar sonda para el rastreo de genes MADS-box
MADS 5'	CGTGGTAGAAGGGCTGATGT	20	62	
pADGAL (dir)	GATCGAATTAGGATCCTCTG	20	58	Secuenciar clones del rastreo
MtAGadir	GGAACCATAGCCACCATAGC	20	62	Amplificar sondas para Northern y Southern blot e hibridación <i>in situ</i>
MtAGarev	CTTTCATACTTCTCTCAAGCAC	22	62	
MtAGbdir	GATATCAGAAAGTGAGCAGAG	21	60	
MtAGbrev1	GTCTTTGCTCTTCTCAACCG	20	60	
MtTM6 362 (dir)	GCTTCCAGCAACTGCCTAG	19	60	
MtTM6 698 (rev)	CAACCCAGGCGCAAATCGT	19	60	
8.1.1 DIR	GTCAATAGGAATCTTCGCAAGG	22	64	
8.1.1 REV	GTGGAAAAGTGATTGTGGAGTATTG	24	68	
6.6.1 DIR	GAGGCAGTTGCTTGGGGAAG	20	64	
6.6.1 REV	CATACTGGTACTGTTGGTATCC	22	64	
8.2.1 DIR	GATGCTAAGAGTCAAGCAATGA	22	62	Amplificar sondas para Northern blot e hibridación <i>in situ</i>
8.2.1 REV	CATCCAATGTTCTTGTGCGAC	22	64	
MtSOC1-like 3'	GGAATGTGATATCGACAC	18	52	
MtSOC1-like 5'	GTTGCTGGTTTCAGCTCTC	19	58	
MtSEPdir	CAGCTATGGTGCAGTAGAAG	20	60	
MtSEPprev	GATTACCATATGCCATACTTG	21	58	
MtSHPdir	GCAGAGTTAGATCTAGAAAGC	21	60	
MtSHPprev	CTTCATGCAACTATTCAAGTAG	22	60	
1.3.1 DIR	GCCGCAGCCAACAACAAAGG	20	64	

<b>1.3.1 REV</b>	GTTGCTTAGTTGCAAAATGTTTC	23	62	Amplificar sondas para <i>Northern blot</i> e hibridación <i>in situ</i>
<b>14.3.2 DIR2</b>	GACTAAGGTTTTCAGGGAGC	20	60	
<b>14.3.2 REV</b>	GAGGCCATGAACAATCAGTTCC	22	66	
<b>MtAGaGENdir1</b>	GAGCTGTTATTGCTGAAATTGA	23	62	Obtener secuencia genómica <i>MtAGa</i>
<b>MtAGaGENrev1</b>	CTGATTCTGAGACTGCATAGG	21	62	
<b>MtAGaGENdir4</b>	CACTGGATCTGCTACTGAGG	20	62	
<b>MtAGaGENrev2</b>	TCAATTTTCAGCAAATAACAGCTC	23	62	
<b>MtAGaGENdir5</b>	CTATTATATTTTGGCCAATTTACC	24	62	
<b>MtAGaGENrev3</b>	AAGAGTTAGTGGTGAGACACAT	22	62	
<b>MtAGaGENdir6</b>	TCTACAATGTTCTGATAAATCATG	24	62	
<b>MtAGaGENrev4</b>	TGAAATCATGGTTATAAATGTTAGT	25	62	
<b>MtAGaGENdir8</b>	CTCTATGAGTATGCTAATAACAG	23	62	
<b>MtAGaGENrev6</b>	GTACCTTGCAATAGTCTCTTTG	22	62	
<b>MtAGbsplicingdir</b>	GAACCTGAGTACATGCAGAAG	21	60	Amplificar ambas formas de <i>MtAGb</i>
<b>MtAGbsplicingrev</b>	CATTATGGTTGCTCCTCTGC	20	60	
<b>AGaRNAid</b>	CTCGAGTCTAGAGGAACCATAGCCACCATAGC	32	62	Amplificar fragmentos para construcciones RNAi
<b>AGaRNAir</b>	GAATTCAAGCTTCTTTCATACTTCTCTCAAGCAC	34	62	
<b>AGbRNAid</b>	CTCGAGTCTAGAGATATCAGAAAGTGAGCAGAG	33	60	
<b>AGbRNAir</b>	GAATTCGGATCCGTCTTTGCTCTTCTCAACCG	32	60	
<b>35Sdir</b>	CGGGAAACCTCCTCGGATTC	20	64	Confirmar transgénesis plantas RNAi
<b>BASTAdir</b>	GAGCCCAGAACGACGCCCG	19	66	
<b>BASTArev</b>	TATCCGAGCGCCTCGTGC	18	60	
<b>AGaSBXdir</b>	TGTCGACATGGATTTTCCAAATGAATCCAT	23	60	Amplificar fragmentos para construcciones expresión constitutiva (SBX)
<b>AGaSBXrev</b>	TGGATCCTCAAACCTAATTGAAGGGACATG	22	60	
<b>AGbSBXdir</b>	TGTCGACATGAGTTTCCAAACGAATCC	21	58	
<b>AGbSBXrev</b>	TGGATCCTTACACAAATGAAGAGACATC	22	58	
<b>2X35S (directo)</b>	TATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTCC	21	64	Secuenciar construcciones SBX
<b>KAN DIR</b>	GACGAGGCAGCGCGGCTAT	19	64	Confirmar transgénesis plantas expresión constitutiva
<b>KAN REV</b>	AAGAAGGCGATAGAAGGCGA	20	60	
<b>MtAGaGENrev1</b>	CTGATTCTGAGACTGCATAGG	21	62	
<b>MtAGaGENdir2</b>	GCAAAAGAAGAAATGGTTTGTG	23	62	
<b>MtAGaGENdir3</b>	CTTCTCTAGCCGTGGACGG	19	62	
<b>MtAGaVIGSdir</b>	GCCATGGAACCATAGCCACCATAG	19	58	Amplificar fragmentos para construcciones VIGS de <i>M. truncatula</i>
<b>MtAGaVIGSrev</b>	CGAATTCAATGTGTCTTTTCCATAATC	23	60	
<b>MtAGabisVIGSdir</b>	GCCATGGTTACCAGCAAGAGGCAGAC	19	58	
<b>MtAGabisVIGSrev</b>	CGAATTCTGGATTGTAATCCAGAAACT	21	58	
<b>MtAGbVIGSdir</b>	GTCTAGAAAAGTGAGCAGAGGAGCA	20	60	
<b>MtAGbVIGSrev</b>	CCTGCAGATTGCAATTAATTAGTAAAATTG	25	60	
<b>MtAGbbisVIGSdir</b>	GCCATGGTATTACCAGCAAGAAGCTG	20	58	
<b>MtAGbbisVIGSrev</b>	CCTGCAGCCTGGCATACTGATCATTG	20	60	
<b>MtAGaVIGS2rev</b>	CTCTAGACTTAGCACTCATCTGCTATC	20	58	
<b>MtAGbVIGS2rev</b>	CCTGCAGATACAAAGCCACTACATAG	21	58	
<b>PsAGaVIGSdir</b>	GCCATGGAACCACCACATAATATTAA	22	60	Amplificar fragmentos para construcciones VIGS de <i>P. sativum</i>
<b>PsAGaVIGSrev</b>	CGAATTCCTGTCTCCATAACCTTAG	21	60	
<b>PsAGabisVIGSdir</b>	GTCTAGAAGCAGATAAATTGCGTGT	21	58	
<b>PsAGabisVIGSrev</b>	CCTGCAGGATTGTAATCCGGAAACTTG	21	60	
<b>PsAGbVIGSdir</b>	GTCTAGAAAATGATCAGAGGAACAAC	22	60	
<b>PsAGbVIGSrev</b>	CCTGCAGTACAATTTGACAAACATGTC	22	58	
<b>PsAGbbisVIGSdir</b>	GTCTAGAAGCCGCGAAACTGCCA	19	60	
<b>PsAGbbisVIGSrev</b>	CCTGCAGCCTGGCATACTGATTATTAG	21	60	
<b>PsAGaVIGS2rev</b>	CTCTAGATTCTTACAAACCTTCTCA	21	58	

<b>PsAGbVIGS2rev</b>	CCTGCAGCCACTACATAGTATTGAAAG	22	60	Amplificar fragmentos para construcciones VIGS de <i>P. sativum</i>
<b>pCAPE2dir</b>	CTTGTGTCTGCTGATAAGATC	21	60	Secuenciar construcciones VIGS
<b>pCAPE2rev</b>	GAACGACCACAAGTACAGTC	20	60	
<b>AGb-F</b>	TCCAAACGAATCCATGCCAGATTC	24	70	Genotipar mutantes insercionales Tnt1
<b>Tnt1-F</b>	ACAGTGCTACCTCCTCTGGATG	22	68	
<b>AGb-Rgenomic</b>	GTTTATCCAAGCTGAGATTTGAGG	24	68	
<b>T7</b>	Servicio de secuenciación			Secuenciar insertos en pGEM®T-easy
<b>SP6</b>	Servicio de secuenciación			
<b>M13 directo</b>	Servicio de secuenciación			Secuenciar insertos en pGreenII
<b>M13 reverso</b>	Servicio de secuenciación			

<sup>a</sup> Tamaño del oligonucleótido en pares de bases (pb)

<sup>b</sup> Temperatura de fusión estimada del oligonucleótido (°C)



---

# CAPÍTULO I

---

**A**ISLAMIENTO Y  
CARACTERIZACIÓN  
DE MIEMBROS DE  
LA FAMILIA MADS-  
box EN *Medicago*  
*truncatula*

---



---

# **CAPÍTULO I**

---

## **R**ESULTADOS

---





# 1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MIEMBROS DE LA FAMILIA MADS-box EN *Medicago truncatula*

## 1.1 AISLAMIENTO DE ONCE CLONES DIFERENTES CON HOMOLOGÍA A GENES MADS-box

A partir del escrutinio de la genoteca de cDNA de ápices florales (generada por Benlloch, R., Tesis Doctoral, 2005) se aislaron 42 clones. Para ello se utilizó como sonda la secuencia codificante del dominio MADS del gen *MtPI*, caracterizado por Benlloch *et al.* (2009). Estos clones consistían en fragmentos de entre 850 y 1200 pb clonados en el vector pAD-GAL4-2.1 (Stratagene).

Tabla 11. Características de los clones estudiados

Clon	Nombre <sup>a</sup>	Tamaño del inserto (pb)	5' <sup>b</sup>	3' <sup>b</sup>	ORF <sup>c</sup>	Codón finalización	Proteína <sup>d</sup>	P.M. <sup>e</sup>	P.I. <sup>f</sup>
15.4.1	<i>MtSEP</i>	1167	196	218	750	TGA	250	28,75	9,26
6.6.1	<i>MtAGL6</i>	883	21	106	753	TAA	251	29,17	8,45
8.2.1	<i>MtAGL6-like</i>	948	0	228	717	TGA	239	27,58	8,33
1.3.1	<i>MtSOC1a</i>	982	89	251	639	TGA	213	24,46	10,09
14.3.2	<i>MtSOC1b</i>	1152	240	237	672	TAG	224	25,70	9,55
12.1.1	<i>MtSOC1-like</i>	851	63	170	615	TGA	205	23,79	9,28
14.4.1	<i>MtSHP</i>	1027	38	254	732	TGA	244	28,12	9,67
12.11.1	<i>MtAGa</i>	1208	131	294	780	TGA	260	29,67	9,71
15.5.1	<i>MtAGb</i>	1099	46	318	732	TAA	244	28,10	9,75
12.9.1	<i>MtTM6</i>	1082	89	294	696	TGA	232	27,07	9,68
8.1.1	<i>MtNMH7</i>	1030	83	257	687	TAG	229	26,61	9,68

<sup>a</sup> Nombre asignado al gen por homología de secuencia a genes conocidos de otras plantas modelo

<sup>b</sup> Tamaño en pares de bases de las regiones 3' y 5' no traducidas incluidas en el clon

<sup>c</sup> Tamaño en pares de bases del "Open Reading Frame" o marco de lectura abierto más largo

<sup>d</sup> Tamaño predicho de la proteína codificada por el gen, en aminoácidos

<sup>e</sup> Peso molecular predicho de la proteína codificada, en kDa

<sup>f</sup> Punto isoeléctrico teórico de la proteína codificada

Todos los insertos se secuenciaron íntegramente y se descartaron 9 clones que contenían el gen *MtPI*, encontrándose once insertos diferentes entre los 33 clones restantes. A excepción de un clon que carecía del extremo 5', todos los insertos contenían un codón ATG de inicio de transcripción, un codón de terminación en el

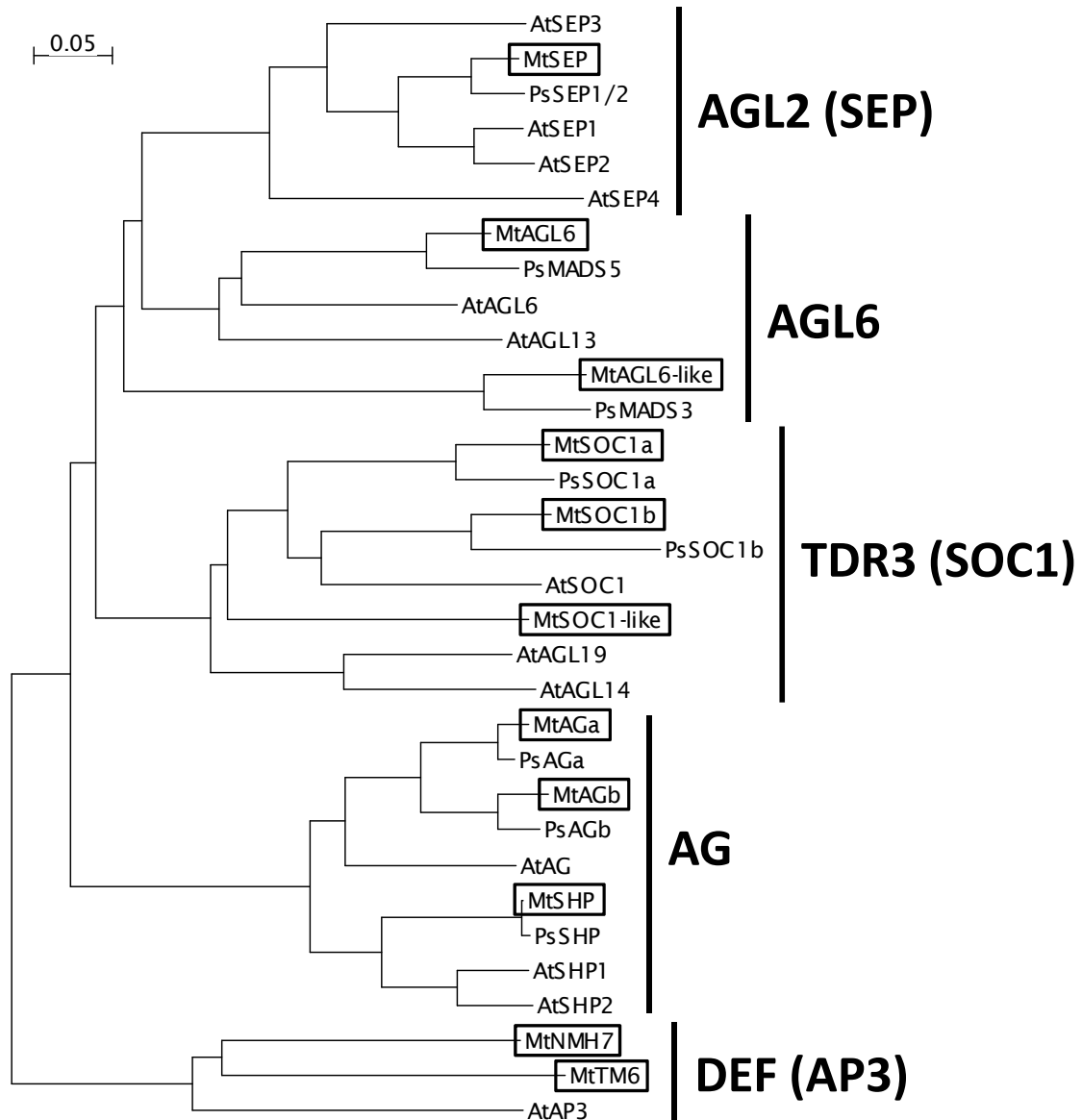
extremo 3' y regiones 5' y 3' no traducidas, por lo que se consideraron como clones de longitud completa. En la Tabla 11 se describen las principales características de los once clones estudiados.

Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), DFCI Gene Index Project (Dana Farber Cancer Institute, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>) y TIGR Plant Transcript Assemblies database (<http://plantta.jcvi.org>), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se encontraron homologías significativas con genes de clase MADS-box de diferentes especies. Las secuencias aminoacídicas deducidas de todos los clones aislados comparten los rasgos característicos de las proteínas MADS-box de plantas, incluyendo el altamente conservado dominio MADS y el dominio K (Shore y Sharrocks, 1995).

La Figura 13 representa un árbol no enraizado que muestra las relaciones de similitud entre los clones estudiados y genes MADS-box representativos de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum*. Las secuencias de los clones estudiados se distribuyen en cinco de los 14 grupos de genes MADS-box descritos por Becker y Theissen (2003). No se encontraron clones homólogos a genes pertenecientes a los grupos *STMADS11* (*SVP*), *AGL17* (*ANR1*), *GGM13* (*TT16*), *AGL12*, *SQUA* (*AP1*), *TM8*, *AGL15* y *FLC* (Becker y Theissen, 2003; Hecht *et al.*, 2005). *MtPI*, cuya región MADS se utilizó como sonda, también se aisló en el escrutinio. Este gen pertenece al grupo *GLO* (*PI*), pero no se ha incluido en el árbol al haber sido caracterizado previamente (Benlloch *et al.*, 2009).

---

**Figura 13. Representación de las relaciones de similitud de secuencia existentes entre los genes MADS-box de *Medicago truncatula* aislados en el rastreo y genes representativos de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum*.** El alineamiento de los dominios M-, I- y K- se generó usando ClustalW2 con los parámetros de alineamiento múltiple "gap distances" 8 y "gap extension" 1.0. El árbol se construyó con el programa NJplot (Perrière y Gouy, Pôle Bioinformatique Lyonnais, 1996), utilizando el algoritmo Neighbor Joining. La clasificación de los subgrupos se hizo según Becker y Theissen (2003). At: *Arabidopsis thaliana*; Ps: *Pisum sativum*; Mt: *Medicago truncatula*. Los genes de *Medicago truncatula* se encierran en un rectángulo.



## 1.2 *MtSEP*: UN GEN CON HOMOLOGÍA A GENES MADS-box DEL GRUPO *AGL2 (SEP)*

### 1.2.1 Aislamiento y análisis de secuencia de *MtSEP*

El clon 15.4.1 se denominó *MtSEP*, en base a su alta homología con genes del grupo *AGL2 (SEP)*. Los genes *SEPALLATA* constituyen una clase adicional de genes homeóticos florales en el modelo ABC, llamada clase E (Theissen, 2001). Este clon, de 1167 pb, presenta una región 5' no traducida de 196 pb, una pauta de lectura abierta de 750 pb, un codón de parada de traducción TGA y una región 3' no traducida de 218 pb. La proteína deducida *MtSEP*, de 250 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de 28,75 kDa y un PI teórico de 9,26. Esta secuencia se comparó con las secuencias

incluidas en la base de datos del NCBI mediante BLAST y resultó que corresponde a la secuencia de un mRNA “desconocido” con número de acceso GenBank BT051279.1 (clon genómico MTYF1\_F2\_F3\_F41G-A-4 de *Medicago truncatula*), que codifica una proteína MADS-box “desconocida” con número de acceso ACJ83943.1.

La secuencia completa de nucleótidos y la deducida de aminoácidos del clon se representa en la Figura 14.

```

2 ATATCATTGTTCTCTCTCTCTACACTTTCTCTCTCTAGGGTTTCAAGTATAAAAAATGTTT 61
62 CTATTGTCTTTACAAATATGGTACTGACCTAAGAAAAGAAGGATTTAAGAAGTGGTAAG 121
122 TTAAAGAGGAAGATAGAGAAATTGTTATAATAAATAAATAAATAAAGTGAAATATTATTA 181

1 M G R G R V E L K R I E N K I 15
182 TTTTGAAGTTGAATATGGGAAGAGGAAGAGTGGGAATTGAAAAGGATAGAGAATAAGATA 241

16 N R Q V T F A K R R N G L L K K A Y E L 35
242 AACAGACAAGTAACATTTGCAAAGAGAAGAAATGGACTTCTTAAGAAAGCTTATGAATTA 301

36 S V L C D A E V A L I I F S N R G K L Y 55
302 TCTGTTCTTTGTGATGCTGAAGTTGCTCTTATTATCTTCTCCAATAGAGGCAAGCTTTAT 361

56 E F C S S P S M L K T L D R Y Q K C S Y 75
362 GAGTTTTGTAGCAGTCTAGCATGCTCAAGACGCTTGATAGGTACCAAAAATGCAGCTAT 421

76 G A V E V N K P A K E L E S S Y R E Y L 95
422 GGTGCAGTAGAAGTTAACAAACCTGCCAAGAGCTTGAGAGCAGTTACCGTGAGTACTTG 481

96 K L K A R F E S L Q R T Q R N L L G E D 115
482 AAGCTGAAAGCAAGATTTGAATCTCTTCAAAGGACTCAAAGAAACCTTCTTGGTGAAGAC 541

116 L G P L G T K D L E Q L E R Q L D S S L 135
542 TTAGGTCCATTAGGTACCAAAGATCTTGAGCAGCTTGAACGCCAACTTGATTCACTCTCTC 601

136 K Q V R S T K T Q F M L D Q L A D L Q N 155
602 AAGCAAGTCAGGTCCACCAAGACCCAATTCATGCTGGACCAATTAGCTGATCTTCAAAAT 661

156 K E H M L V E A N R S L S M K L E E I N 175
662 AAGGAGCATATGTTGGTAGAAGCAAACAGATCTTTGTCTATGAAGCTGGAAGAAATCAAT 721

176 I N S R N Q Y R Q T W E A G D Q S M A Y 195
722 ATCAATTCAGAAACCAGTATAGGCCAAACATGGGAAGCTGGTGATCAAAGTATGGCATAT 781

196 G N Q N A H S Q S F F Q P L E C N P T L 215
782 GGTAATCAAAAATGCTCACTCACAAAGCTTCTTTTCAGCCTTTGGAGTGCAATCCAACATTG 841

216 Q I G T D Y R Y S P P V A S D Q L T A T 235
842 CAGATAGGGACTGATTACAGGTACAGTCTCCAGTAGCATCAGATCAGCTAACTGCAACA 901

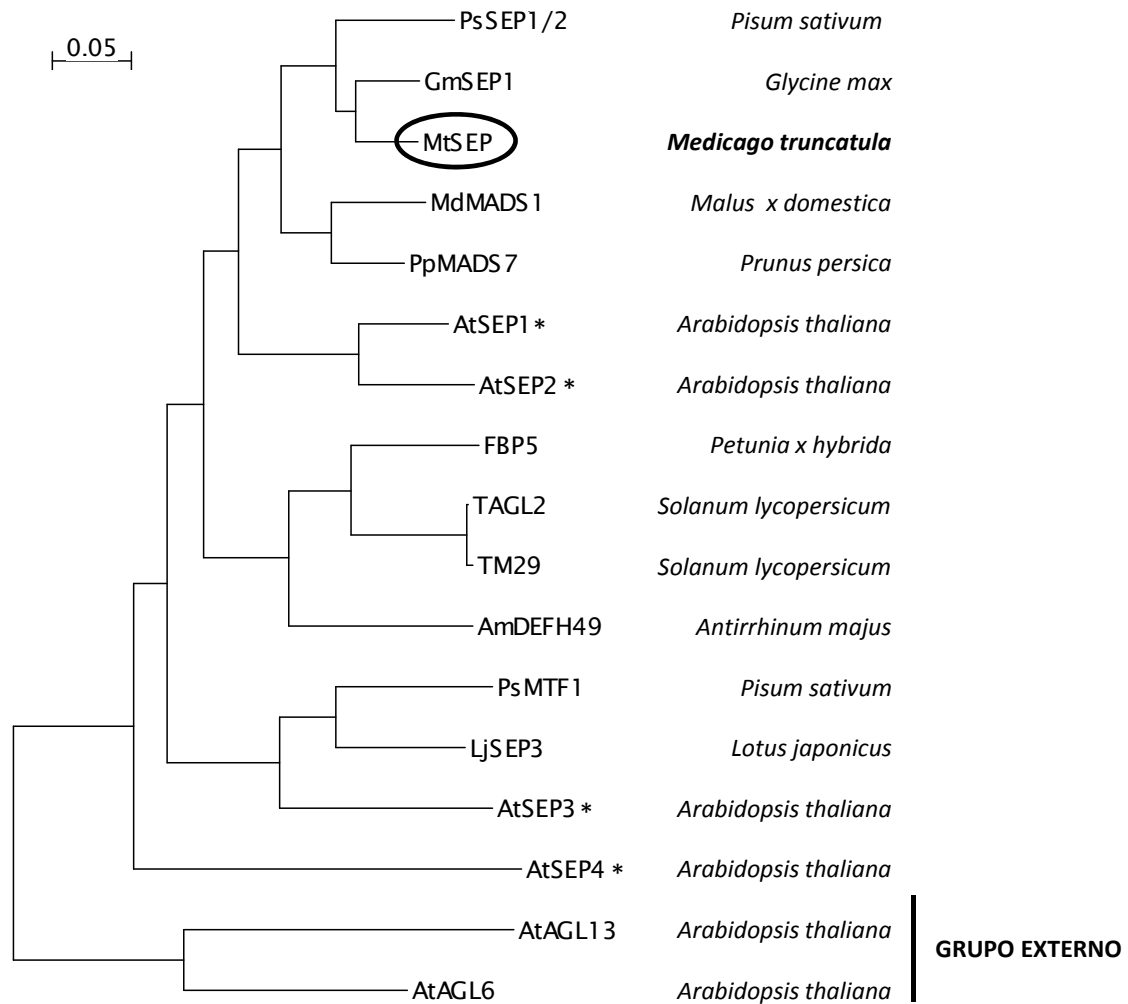
236 T Q A Q Q V N G F I P G W M L * 250
902 ACTCAAGCTCAACAAGTTAATGGATTTATTCCTGGATGGATGCTTTGAGCTAAGCTCATT 961
962 ATTTCTCTATTTGCATAAAAAGCAAAAAGACAAAAAATGCCTTTTGGTTTTGACATTGTTG 1021
1022 TAAATGCTGCATGTGCTTCTTTCTGGTTAACTTGTGTTTGTCTATAAAAACAGCAGTGACTG 1081
1082 AATTAAACTATTGAACTTTTAGCCATAGATATATATGGCATATATGAAGTTTTTAGT 1141
1142 ATTTTGAIAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1167

```

**Figura 14. Secuencia del clon *MtSEP*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.

La Figura 15 muestra un árbol filogenético en el que se utilizaron secuencias proteicas codificadas por genes MADS-box de clase E que han sido descritos en diversas especies, así como *MtSEP*. *MtSEP* se localiza en la misma rama filogenética que las proteínas

AtSEP1 y AtSEP2 (Ma *et al.*, 1991) de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, mientras que AtSEP3 (Fan *et al.*, 1991) y AtSEP4 (Ma *et al.*, 1991) se distribuyen en ramas independientes.



**Figura 15. Árbol filogenético de las secuencias proteicas predichas para genes del grupo AGL2.** Se utilizó la secuencia proteica íntegra de los siguientes proteínas: *Arabidopsis thaliana*: AtSEP1, AtSEP2, AtSEP4 (Ma *et al.*, 1991; Acc NP\_001119230.1, NP\_186880.1, NP\_178466.1), AtSEP3 (Fan *et al.*, 1997; Acc NP\_850953.1); *Pisum sativum*: PsSEP1/2 (Hecht *et al.*, 2005; Acc AAX69068.1), PsMTF1 (Buchner y Boutin, 1998; Acc CAA11258); *Solanum lycopersicum*: TM29 (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002; Acc CAC83066), TAGL2 (Busi *et al.*, 2003; Acc AAM33104); *Glycine max*: GmSEP1 (Huang *et al.*, 2009; Acc AAZ86071.1); *Malus x domestica*: MdMADS1 (Sung y An, 1997; Acc AAC25922); *Prunus persica*: PpMADS7 (Xu *et al.*, 2008; Acc ABO27622); *Lotus japonicus*: LjSEP3 (Dong *et al.*, 2005; Acc AAX13298); *Petunia x hybrida*: FBP5 (Immink *et al.*, 2002; Acc AAK21248); *Antirrhinum majus*: AmDEFH49 (Davies *et al.*, unpublished; Acc CAA64741.1); *Medicago truncatula*: MtSEP (este trabajo). La proteína MtSEP se encierra en un óvalo y las proteínas del grupo AGL2 de *Arabidopsis thaliana* se señalan con un asterisco. El árbol se enraizó con AtAGL6 y AtAGL13 de *Arabidopsis thaliana* (Acc NP\_182089.1, NP\_191671.1).

El análisis filogenético indica que *MtSEP* está estrechamente relacionado con la subfamilia *SEP1/2*, situándose entre ortólogos *SEP1/2* de leguminosas como *GmSEP1*

(Huang *et al.*, 2009; Acc DQ159905.1) de *Glycine max* o *PsSEP1/2* (Hecht *et al.*, 2005; Acc AY884290.1) de *Pisum sativum*. Existe además proximidad filogenética entre *MtSEP* y genes descritos como ortólogos de *SEP1/2* en otras especies, como las leñosas *Malus x domestica* (*MdMADS1*; Sung y An, 1997) o *Prunus persica* (*PpMADS7*; Xu *et al.*, 2008).

La proteína *MtSEP* presenta altos porcentajes de homología de secuencia con proteínas MADS-box consideradas ortólogas de *SEP1/2* en leguminosas como *Glycine max* (*GmSEP1*; Huang *et al.*, 2009) o *Pisum sativum* (*PsSEP1/2*; Hecht *et al.*, 2005). Comparada con proteínas del grupo AGL2 de otras plantas modelo, *MtSEP* tiene alta homología con *AtSEP1* y *AtSEP2* (Ma *et al.*, 1991) de *Arabidopsis thaliana* y *AmDEFH49* (Davies *et al.*, unpublished) de *Antirrhinum majus*. En la Tabla 12 se muestran dichos porcentajes de homología. En la Figura 16 se representa un alineamiento múltiple entre *MtSEP* y las proteínas arriba mencionadas. En el alineamiento se puede ver la presencia de los motivos SEP I y SEP II, conservados en la región C-terminal de la mayoría de las proteínas de la familia SEP. Estructuralmente, estos motivos contienen principalmente aminoácidos hidrófobos y polares y no se parecen a ningún motivo de función conocida (Zahn *et al.*, 2005a).

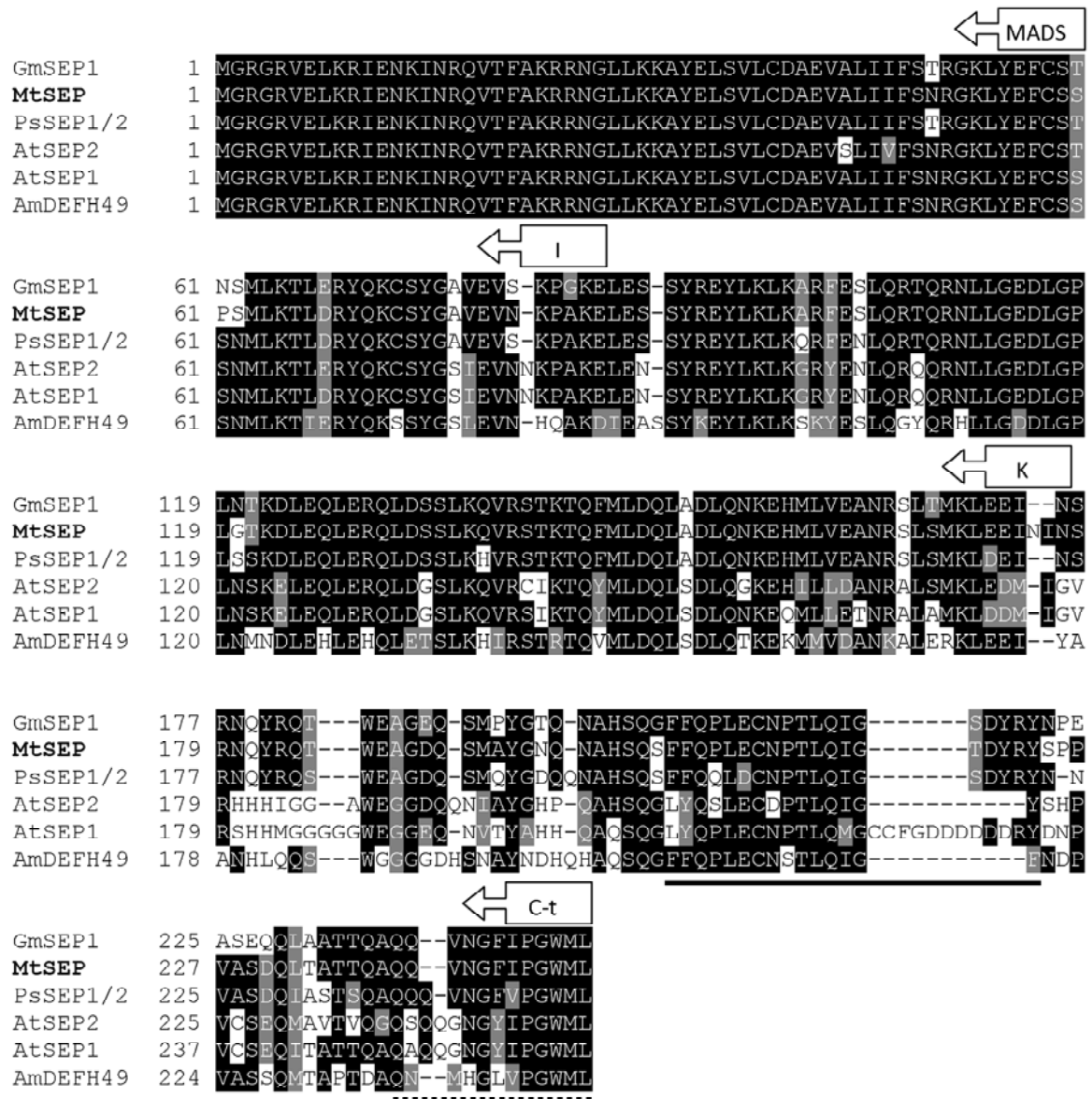
**Tabla 12. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de *MtSEP* y las proteínas representativas con las que presenta homología**

	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>GmSEP1</b>	<b>91</b>	96	84	97	83
<b>PsSEP1/2</b>	<b>86</b>	96	88	93	69
<b>AtSEP2</b>	<b>74</b>	95	61	75	54
<b>AtSEP1</b>	<b>76</b>	100	65	75	57
<b>AmDEFH49</b>	<b>68</b>	100	61	64	52

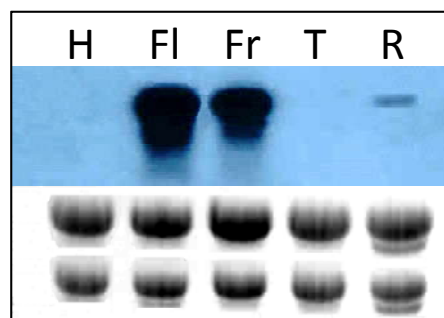
Gm: *Glycine max*; Ps: *Pisum sativum*; At: *Arabidopsis thaliana*; Am: *Antirrhinum majus*

### 1.2.2 Patrón de expresión de *MtSEP*

El patrón de expresión de *MtSEP* en plantas silvestres de *Medicago truncatula* se analizó mediante hibridación *Northern blot* en varios tejidos de la planta (Figura 17). Para evitar la hibridación cruzada con otros genes MADS-box, se utilizó la región C-terminal del cDNA de *MtSEP* como sonda. La expresión de *MtSEP* no se detecta en hoja ni en tallo y es leve en tejido de raíz. La expresión del gen es muy intensa en flores y en frutos.

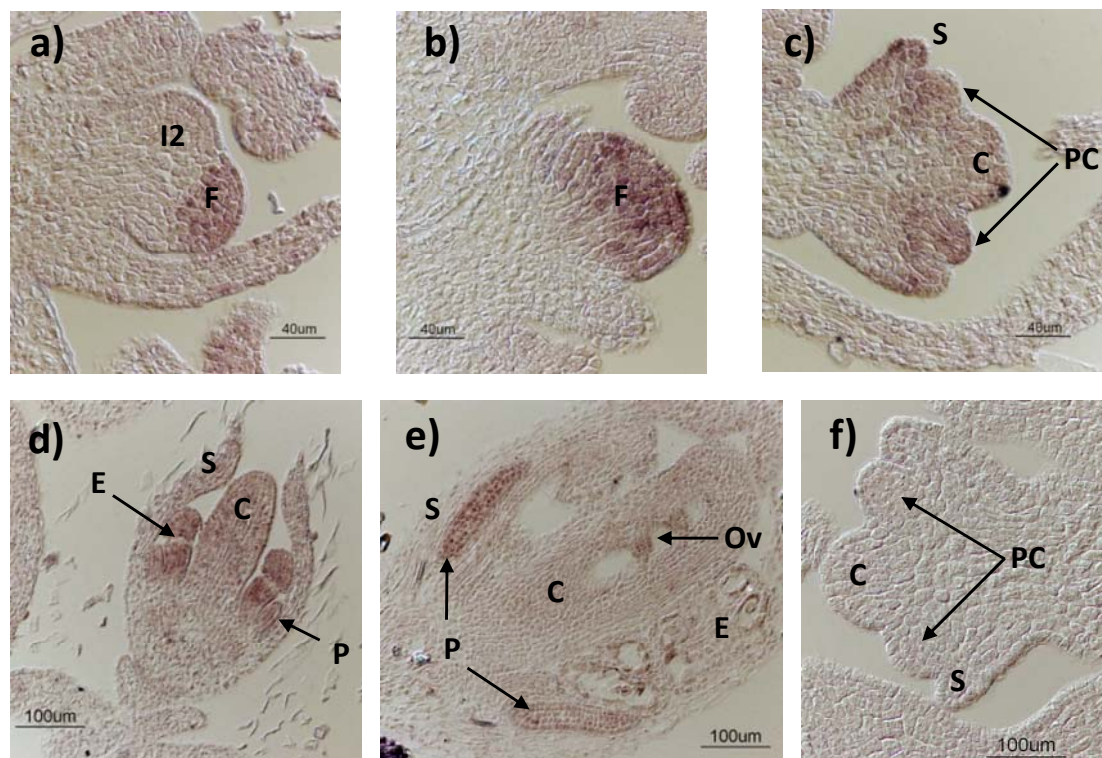


**Figura 16.** Alineamiento de las secuencias proteicas de *MtSEP* y de genes *MADS*-box de clase E con los que presenta homología. Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios *MADS* y *K* así como las regiones *I* y *C*-terminal se señalan con flechas. El motivo *SEP I* se subraya con una línea continua y el motivo *SEP II* con una línea punteada.



**Figura 17.** Análisis del patrón de expresión de *MtSEP* mediante *Northern blot*. Se utilizó RNA de diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R).

El análisis del patrón de expresión tisular de *MtSEP* durante el desarrollo floral se llevó a cabo mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de plantas silvestres de *Medicago truncatula* (Figura 18). Se utilizó como molde para la síntesis de la sonda el fragmento C-terminal del cDNA de *MtSEP* utilizado para la hibridación *Northern blot*.



**Figura 18. Análisis del patrón de expresión de *MtSEP* mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*.** a) Expresión generalizada en el meristemo floral en estadio de desarrollo 2 temprano. b) Expresión generalizada en el meristemo floral en estadio de desarrollo 2 tardío. c) Expresión generalizada pero debilitada en el meristemo floral en estadio 4. d) Flor en estadio 6. La expresión se centra en pétalos y estambres, debilitándose en carpelo y sépalos. e) Expresión detectada en pétalos y óvulos en la flor en estadio 7. f) Hibridación *in situ* con la sonda "sentido". I2, Meristemo inflorescente secundario; F, Meristemo floral; PC, Primordio común; S, Sépalo; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo; Ov, Óvulo.

El transcrito de *MtSEP* está ausente en el meristemo inflorescente secundario, pero se detecta en todo el meristemo floral desde el estadio 2 temprano (ontogenia floral según Benlloch *et al.*, 2003) (Figura 18, a). En el estadio 2 tardío la expresión se mantiene en todo el meristemo floral y es el estadio en el que *MtSEP* presenta su expresión máxima (Figura 18, b). En el estadio 4, cuando se han diferenciado los primordios comunes, *MtSEP* aún se expresa de manera general en el meristemo floral, pero disminuye su intensidad (Figura 18, c). En el estadio 6, diferenciados ya los



primordios comunes en primordios de pétalo y estambre, la expresión puede detectarse en estos órganos, así como débilmente en el carpelo. La expresión en sépalos prácticamente ha desaparecido (Figura 18, d). En estadios tardíos del desarrollo floral (estadio 7, Figura 18, e) la expresión de *MtSEP* es detectable en células de pétalo y ligeramente en los óvulos. No se detectó ninguna señal de hibridación en secciones de tejido hibridadas con la sonda “sentido” utilizada como control negativo (Figura 18, f).

### **1.3 *MtAGL6* Y *MtAGL6-like*: GENES CON HOMOLOGÍA A GENES MADS-box DEL GRUPO *AGL6***

#### **1.3.1 Aislamiento y análisis de secuencia de *MtAGL6* y *MtAGL6-like***

En el escrutinio de la genoteca se aislaron dos clones de cDNA cuyas secuencias corresponden a genes del grupo *AGL6*. Dichos clones, el 6.6.1 y el 8.2.1 se denominaron *MtAGL6* y *MtAGL6-like*, respectivamente, en base a su homología con genes de diferentes plantas pertenecientes a dicho grupo.

El clon 6.6.1, de 883 pb, tiene una región 5' no traducida de 21 pb, una pauta de lectura abierta de 753 pb que codifica una proteína de 251 aminoácidos, un codón de parada de traducción TAA y una región 3' no traducida de 106 pb. La proteína deducida *MtAGL6* tiene un peso molecular calculado de 29,17 kDa y un PI teórico de 8,45. La secuencia de nucleótidos de *MtAGL6* y su traducción en aminoácidos se representan en la Figura 19.

El clon 8.2.1, de 948 pb, tiene una región 3' no traducida de 228 pb y no incluye región 5' no traducida. Presenta una pauta de lectura abierta de 717 pb y un codón de parada de traducción TGA. La proteína deducida *MtAGL6-like*, de 239 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de 27,58 kDa y un PI teórico de 8,33. La secuencia de nucleótidos y la traducida de aminoácidos se muestran en la Figura 20.

Se realizó una comparación de las secuencias de ambos clones con las secuencias incluidas en las bases de datos mediante BLAST. El cDNA de *MtAGL6* está parcialmente contenido en la secuencia del clon genómico mth2-132a8 de *Medicago truncatula* (“WORKING DRAFT SEQUENCE, 33 unordered pieces”; GenBank AC233100.10). Las primeras 488 pb del clon *MtAGL6* no están contenidas en el clon genómico. El resto se

distribuye en 3 exones (43, 152 y 94 pb) interrumpidos por 2 intrones. Estos exones del gen *MtAGL6* se sitúan entre las bases 102.956 y 103.847 del clon genómico.

1	<b>M G R G R V E L I E N K I</b>	13
1	GGCACGAAGAGAGAGTGATCC <u>ATGGGAAGAGGAAGAGTTGAATTGATAGAGAACAAAATA</u>	60
14	<b>N R Q V T F S K R R N G L L K K A Y E L</b>	33
61	AACCGGCAGGTAACCTTTCTCAAAAAGAAGAAATGGTTTCTCAAGAAAGCTTATGAACTG	120
34	<b>S V L C D A E V A L I I F S S R R D G K</b>	53
121	TCTGTTCTCTGTGATGCTGAAGTTGCCCTTATCATTCTCTAGCCGAAGAGATGGCAAA	180
54	<b>I Y E F G S V G T T K T I E R Y Q R C S</b>	73
181	ATCTATGAATTTGGAAGTGTGGAACTACCAAACTATTGAGCGATACCAACGGTCTCA	240
74	<b>F N P Q Q D D H Q I D C D T Q S W Y Q E</b>	93
241	TTTAATCCTCAACAAGATGACCACCAAATTGATTGTGACACACAGAGTTGGTACCAAGAG	300
94	<b>V S K L K A K Y E S L Q R T Q R Q L L G</b>	113
301	GTGCTAAACTGAAGGCAAAGTATGAATCTCTTCAAAGGACTCAGAGGCAGTTGCTTGGG	360
114	<b>E D L G P L N I K E L Q N L E K Q L E G</b>	133
361	GAAGATCTTGGACCTTTGAACATAAAGGAGTTGCAGAATCTTGAAAAACAGCTTGAAGGT	420
134	<b>A L A Q A R Q R K T Q I M I E Q M E E L</b>	153
421	GCATTAGCACAAGCAAGGCAAAGAAAGACAAAATTATGATTGAACAAATGGAAGAGCTT	480
154	<b>R K R E R H L G D L N K Q L R I K L E G</b>	173
481	CGCAAAAGGGAACGTCATCTAGGAGACTGAACAAGCAACTAAGGATCAAGCTTGAAGGA	540
174	<b>E G F N L K A M E S L W S S N S V A G N</b>	193
541	GAGGGATTTAATCTTAAAGCAATGGAAAGTTTATGGAGCTCTAATTCAGTTGCTGGAAAT	600
194	<b>C N F T F Q Q P Q T N P M N M S M D I Q</b>	213
601	TGCAACTTTACCTTTTACGAGCCTCAAACCTTAAACCTATGAATATGAGTATGGATATCCAA	660
214	<b>A E P F L Q I G Y Q Q Y Q Y V Q A E P S</b>	233
661	GCAGAACCCTTTTGCAAATAGCATAACCAACAGTACCAGTATGTTCAAGCTGAACCATCT	720
234	<b>N V S K S M A C E T N F M Q G W M L *</b>	251
721	AATGTTTCCAAGAGCATGGCTTGTGAGACTAACTTCATGCAGGGATGGATGCTTTAATGA	780
781	TAACCTTAATCAATATTCAAGTATAAGATTAATTTACCTTATTGTTTATATGCTTTCTAG	840
841	ATTTATGTTTGGCAATTATTATCACCACAAAATTGGAGTATC	883

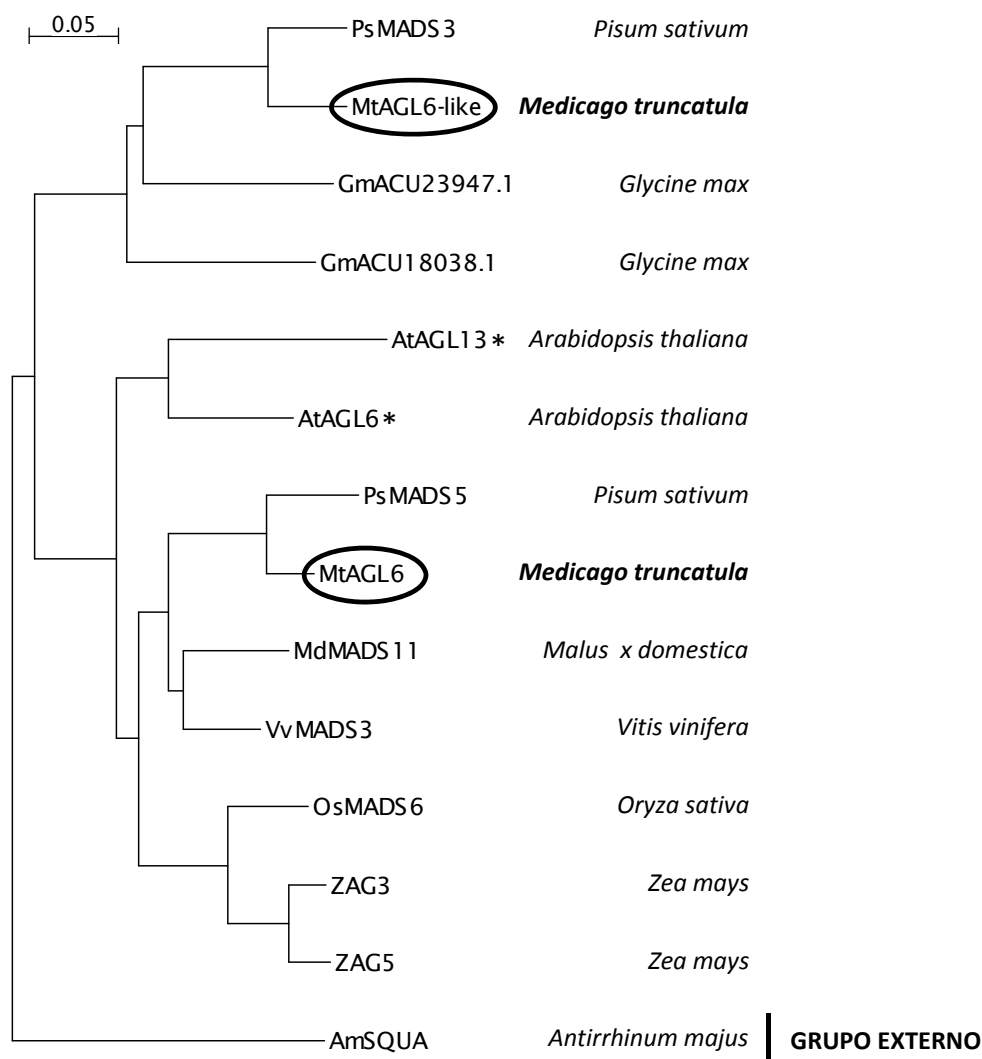
**Figura 19. Secuencia del clon *MtAGL6*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.

El clon *MtAGL6-like* equivale en secuencia a un cDNA denominado Medtr1g129880.1 de la base de datos “*Medicago truncatula* SEQUENCING RESOURCES” ([www.medicago.org](http://www.medicago.org)). Este cDNA ha sido deducido del clon genómico mth2-49g13 de *Medicago truncatula* (“complete sequence”; GenBank AC148527.20). *MtAGL6-like* se divide en 8 exones (182, 85, 62, 100, 42, 42, 101 y 106 pb) y 7 intrones. La secuencia genómica de *MtAGL6-like* está contenida entre las bases 62.645 y 66.185 del clon genómico mencionado.

1	<b>M G R G K V I M E R I H N K I N R Q V T</b>	20
1	<u>ATGGGAAGAGGGGAGGTGATTATGGAGAGAATACATAACAAGATCAATAGACAAGTAACA</u>	60
21	<b>F S K R R S G L L K K A F E L S V L C D</b>	40
61	TTTTCAAAGAGAAGAAGTGGTTTGGTTGAAGAAAGCTTTTGAACCTTTCTGTGTTATGTGAT	120
41	<b>A E V A L I I F S S L G K L F Q Y S T T</b>	60
121	GCTGAAGTTGCTCTTATCATCTTCTCCAGTCTTGGCAAGCTTTTTCAATACAGTACTACT	180
61	<b>D L N K I I E K Y R Q C C F N N M S E N</b>	80
181	GACTTGAACAAAATCATTGAGAAGTATCGTCAATGTTGCTTCAACAATATGTCTGAGAAT	240
81	<b>G Y L G E H E S Q G L Y Q E L L M L R V</b>	100
241	GTTTACTTAGGAGAACATGAGTCACAGGGCTTATACCAGGAGCTTTTGATGCTAAGAGTC	300
101	<b>K H E S L A R T Q R N F L G E E I N A L</b>	120
301	AAGCATGAATCTCTTGCCCGGACACAAAGGAATTTTTTGGGGGAAGAAATCAATGCACTT	360
121	<b>S I K D L Q S L E K Q L E R T L A Q A R</b>	140
361	AGCATAAAAGATTGCAAAGTCTAGAGAAACAACCTGGAGAGAACGCTTGCTCAAGCTCGA	420
141	<b>K H Q M Q K L M E R V D E L R E E V H K</b>	160
421	AAGCACCAAATGCAAAAGCTAATGGAAAGACTTGATGAATTACGTGACGAGGTGCACAAG	480
161	<b>V E E V N K E L E S K I C D N S T D S T</b>	180
481	GTGGAGGAGGTCAACAAAGAATTAGAATCCAAGATTTGTGACAATTCTACGGATTCCACC	540
181	<b>I S S N N N I I T N L L D A Q A N P F E</b>	200
541	ATCTCGAGTAACAACAATATCATTACCAATTTGCTTGATGCACAAGCCAATCCGTTTGAA	600
201	<b>H V T T G Q F L H L Q D A S K R Q A T D</b>	220
601	CATGTGACAACCTGGACAGTTTCTGCACCTACAAGATGCTTCAAAAAGACAAGCAACAGAT	660
221	<b>I R T D I G Q S S R N K N I G W M N I *</b>	239
661	<u>ATAAGGACTGACATAGGACAAAGCAGTCGCAACAAGAACATTGGATGGATGAATATTTGA</u>	720
721	ATTTTCATTTATGCCTAAAAATACTCATTGATAAGAGCCTATTTGGTTTAATTTATGATA	780
781	GGGATTTTCTTTCTTTTCAGAATCCAGCATAAAATGTTGTCTCAATTGTATTATGTA	840
841	TTGGGTAATGTTTCGATAGACACACTTTGTTGTCATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	900
901	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	948

**Figura 20. Secuencia del clon *MtAGL6-like*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.

Las secuencias proteicas de *MtAGL6* y *MtAGL6-like* se han colocado en el árbol filogenético de la Figura 21. Este árbol se ha generado utilizando secuencias proteicas codificadas por genes pertenecientes al grupo *AGL6* descritos en diferentes especies, incluyendo leguminosas como *Pisum sativum* y *Glycine max*. Puede verse que *MtAGL6* se agrupa con *PsMADS5* (Hecht *et al.*, 2005) y que dicha rama es filogenéticamente más cercana a los genes del grupo *AGL6* de *Malus x domestica* (Yao, 1999), *Vitis vinifera* (Boss *et al.*, 2002), *Arabidopsis thaliana* (Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995) e incluso de monocotiledóneas como *Oryza sativa* (Li *et al.*, 2010) o *Zea mays* (Mena *et al.*, 1995). Por otro lado, *MtAGL6-like* forma una rama totalmente independiente con *PsMADS3* (Hecht *et al.*, 2005) de *Pisum sativum* y los genes aislados, pero aún no caracterizados, de soja (*Glycine max*, Cheung *et al.*, unpublished).



**Figura 21. Árbol filogenético de las secuencias proteicas predichas para genes del grupo AGL6.** Se utilizó la secuencia proteica íntegra de las siguientes proteínas: *Arabidopsis thaliana*: AtAGL6 (Ma *et al.*, 1991; Acc NP\_182089.1), AtAGL13 (Rounsley *et al.*, 1995; Acc NP\_191671.1); *Pisum sativum*: PsMADS3, PsMADS5 (Hecht *et al.*, 2005; Acc AAX69066.1, AAX69067.1); *Glycine max*: GmACU18038.1, GmACU23947.1 (Cheung *et al.*, unpublished; Acc ACU18038.1, ACU23947.1); *Zea mays*: ZAG3, ZAG5 (Mena *et al.*, 1995; Acc NP\_001105332.1, NP\_001105692.1); *Malus x domestica*: MdMADS11 (Yao, 1999; Acc CAA04325.1); *Vitis vinifera*: VvMADS3 (Boss *et al.*, 2002; Acc AAM21343.1); *Oryza sativa*: OsMADS6 (Li *et al.*, 2010; Acc AAB64250.1); *Medicago truncatula*: MtAGL6, MtAGL6-like (este trabajo). Las proteínas MtAGL6 y MtAGL6-like se encierran en óvalos y las proteínas del grupo AGL6 de *Arabidopsis thaliana* se señalan con un asterisco. El árbol se enraizó con AmSQUA de *Antirrhinum majus* (Acc CAA45228.1).

Las proteínas MtAGL6 y MtAGL6-like presentan entre ellas un 41% de homología al comparar las secuencias completas de polipéptidos. Presentan un 67% de homología en la región correspondiente a la caja MADS, 28% en la región I, 45% en la región de la caja K y 13% en la región C-terminal. En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de homología de MtAGL6 y MtAGL6-like con proteínas de la leguminosa *Pisum sativum* y de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* codificadas por genes del grupo AGL6. Según

Dayhoff *et al.* (1978), dos proteínas de especies cercanas son ortólogas si conservan entre sí una homología de 75 – 90%. Según los porcentajes de homología de secuencia (>80%), se podría decir que MtAGL6 y PsMADS5 son probablemente proteínas ortólogas, así como MtAGL6-like y PsMADS3. Existe considerable homología (>50%) entre MtAGL6 y las proteínas AtAGL6 y AtAGL13 de *Arabidopsis thaliana*, mientras que MtAGL6-like solo presenta una homología de 38 – 39% con las mismas.

**Tabla 13. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de a) MtAGL6 y proteínas del grupo AGL6 de *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana*, b) MtAGL6-like y proteínas del grupo AGL6 de *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana***

a) MtAGL6	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>PsMADS5</b>	<b>85</b>	94	84	90	75
<b>PsMADS3</b>	<b>40</b>	75	28	45	10
<b>AtAGL6</b>	<b>63</b>	93	29	69	43
<b>AtAGL13</b>	<b>51</b>	78	43	60	30

b) MtAGL6-like	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>PsMADS5</b>	<b>35</b>	78	24	41	8
<b>PsMADS3</b>	<b>83</b>	93	92	81	63
<b>AtAGL6</b>	<b>39</b>	77	25	37	11
<b>AtAGL13</b>	<b>38</b>	73	17	41	8

Ps: *Pisum sativum*; At: *Arabidopsis thaliana*

En la Figura 22 se representa un alineamiento múltiple entre MtAGL6, MtAGL6-like y las proteínas de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum* de la Tabla 13.

Se observa que las secuencias proteicas de MtAGL6, PsMADS5, AtAGL6 y AtAGL13 alinean muy bien entre ellas. Todas estas proteínas se agrupan dentro de la misma rama filogenética. Por otro lado, MtAGL6-like y PsMADS3 se alinean bien entre ellas, pero difieren de las primeras. Como se comentó previamente, *MtAGL6-like* y *PsMADS3* pertenecen a una rama filogenética independiente dentro de los genes *AGL6*.

Se ha descrito que las proteínas AGL6 suelen presentar dos secuencias bien conservadas en la región C-terminal, conocidas como motivos AGL6-I y AGL6-II. El motivo AGL6-I se localiza en la parte media de la región C-terminal, con una secuencia consenso “DCEPTLQIGY”; el motivo AGL6-II se encuentra al final de la misma región y tiene una secuencia consenso “ENNFMLGWVL” (Ohmori *et al.*, 2009). En el alineamiento

puede verse que MtAGL6, PsMADS5, AtAGL6 y AtAGL13 conservan ambos motivos. Sin embargo, MtAGL6-like y PsMADS3 conservan pocos residuos aminoacídicos de dichos motivos.

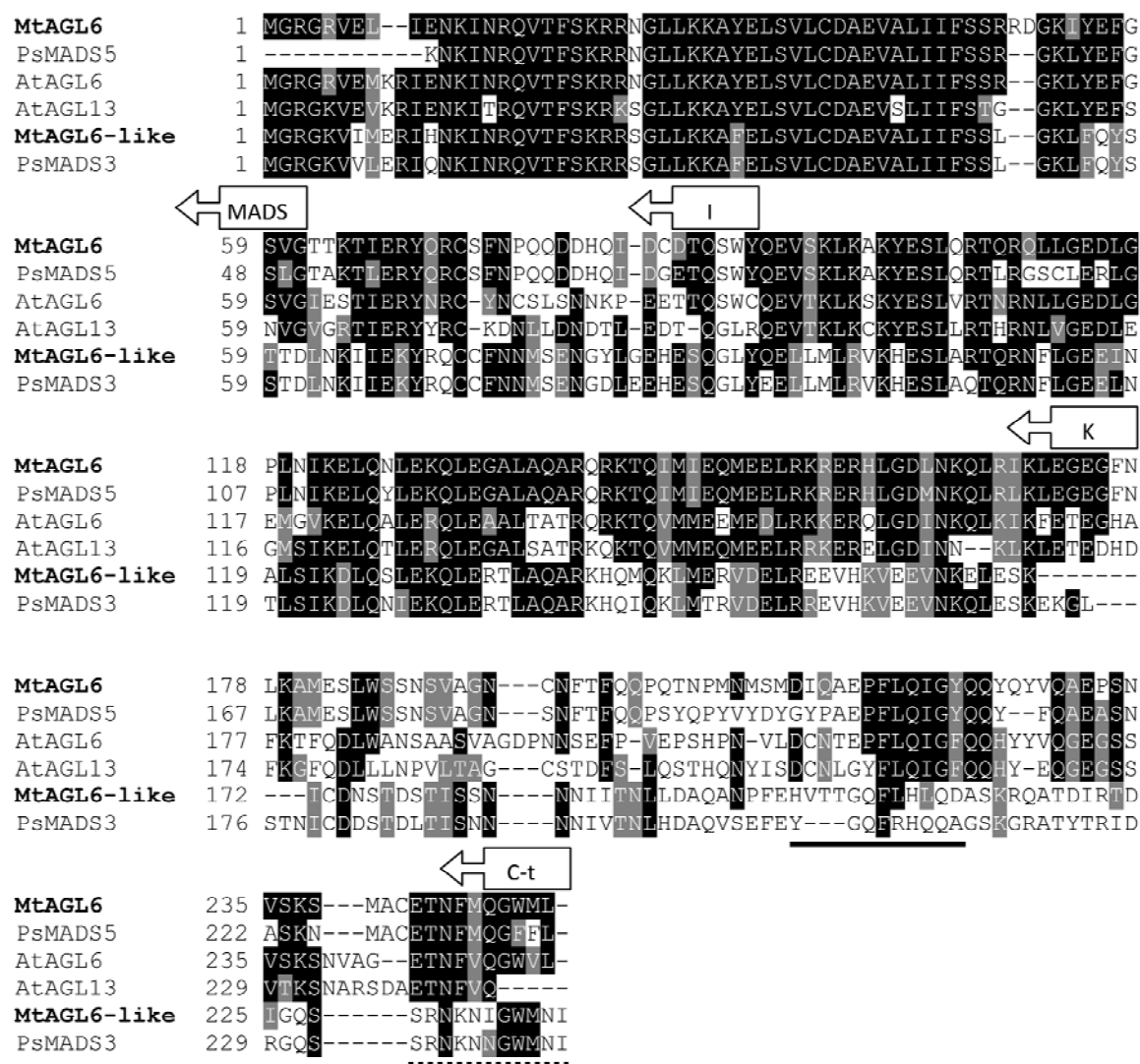


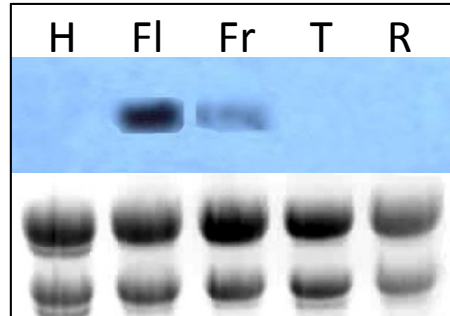
Figura 22. Alineamiento de las secuencias proteicas de *MtAGL6*, *MtAGL6-like* y de genes MADS-box homólogos de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum*. Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios MADS y K así como las regiones I y C-terminal se señalan con flechas. El motivo AGL6-I se subraya con una línea continua y el motivo AGL6-II con una línea punteada.

### 1.3.2 Patrón de expresión de *MtAGL6* y *MtAGL6-like*

Se analizó el patrón de expresión de ambos genes mediante hibridación *Northern blot* en diferentes tejidos de la planta (Figuras 23 y 26). Se usó la región C-terminal del cDNA de cada gen como sonda, a fin de evitar hibridación cruzada. El análisis del patrón de expresión tisular se realizó mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *Medicago truncatula* (Figuras 24 y 27).

### 1.3.2.1 Patrón de expresión de *MtAGL6*

Mediante hibridación *Northern blot*, la expresión de *MtAGL6* se detecta intensa en flores y leve en fruto. No se detecta en los demás tejidos analizados (Figura 23).



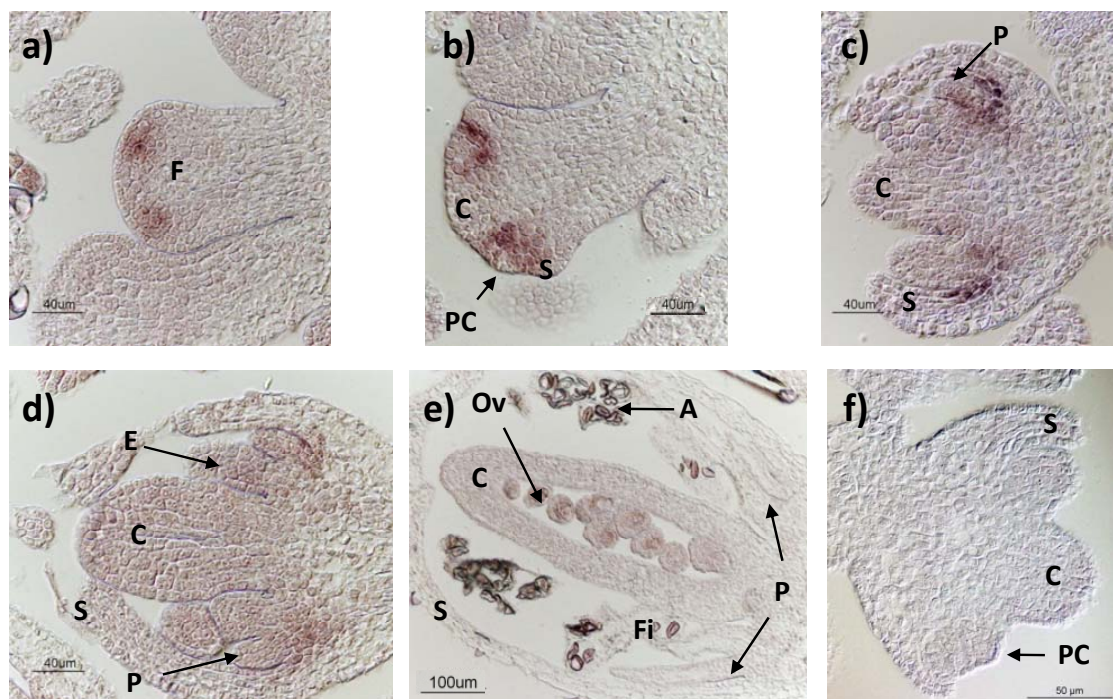
**Figura 23.** Análisis del patrón de expresión de *MtAGL6* mediante *Northern blot*. Se utilizó RNA de diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R).

La hibridación *in situ* muestra que la expresión de *MtAGL6* se detecta desde el estadio 2 de desarrollo floral en dos regiones bien definidas del meristemo floral, que darán lugar a los primordios comunes (Figura 24, a). En el estadio 4, al comenzar a diferenciarse los primordios comunes, la expresión se detecta en la base de estos en forma de cuña (Figura 24, b). Cuando en el estadio 5 se diferencian los primordios de pétalos y estambres, la expresión se detecta en la base de estos órganos, manteniendo la forma característica de cuña (Figura 24, c). Posteriormente, en el estadio 6 la expresión disminuye notablemente, aunque aún puede detectarse en la zona de la base de los pétalos (Figura 24, d). Finalmente, en el estadio 7, tras la diferenciación de las anteras, la expresión se detecta principalmente en la parte interna de los óvulos (Figura 24, e). No se detectó ninguna señal de hibridación en ninguna sección de tejido hibridada con la sonda “sentido”, utilizada como control negativo (Figura 24, f).

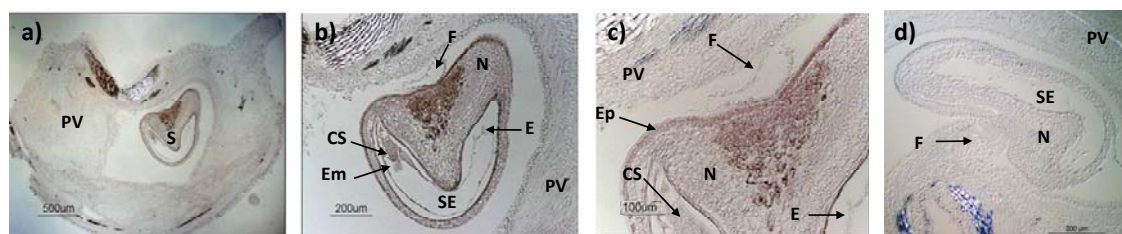
Para hacer el seguimiento de la expresión de *MtAGL6* detectada en óvulos, se realizaron hibridaciones *in situ* en frutos de *Medicago truncatula*, cuyo estadio de desarrollo era aproximadamente “Pod age: 6 DPP (días post-polinización)”, según la caracterización del desarrollo de vainas y semillas de *Medicago truncatula* propuesto por Wang y Grusak (2005). En este momento del desarrollo del fruto, con un tamaño aproximado de 5 mm, los embriones de las semillas están cercanos al estado globular y la estructura enrollada del fruto es definitiva. En la Figura 25 (a-c) se muestra un corte transversal a 90° del eje de enrollado del fruto, en el que puede verse la expresión del



gen concentrada en una región grande de la nucela, adyacente a la zona de unión de la semilla o funículo, así como en la epidermis de la semilla. No se detectó ninguna señal de hibridación en tejido hibridado con la sonda “sentido” (Figura 25, d).



**Figura 24. Análisis del patrón de expresión de *MtAGL6* mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*.** a) Expresión en dos regiones definidas del meristemo floral en estadio de desarrollo 2. b) Expresión en forma de cuña en la base de los primordios comunes en el estadio 4. c) Expresión en la base de los primordios de pétalo y estambre durante el estadio 5. d) La expresión se debilita en la base de los pétalos y estambres en el estadio 6 del desarrollo floral. e) Expresión detectada en óvulos en la flor en estadio 7. f) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. F, Meristemo floral; PC, Primordio común; S, Sépalo; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo; Fi, Filamento; A, Antera; Ov, Óvulo.

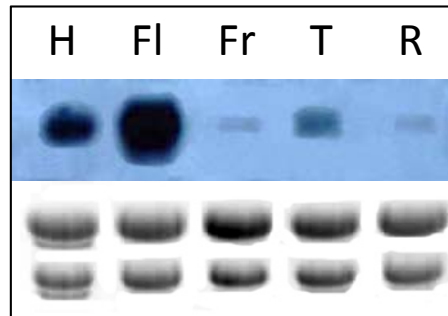


**Figura 25. Análisis del patrón de expresión de *MtAGL6* en frutos.** Patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en corte transversal del fruto y la semilla de *Medicago truncatula* a). Se distingue la semilla y el tejido de la vaina. b) Semilla. La expresión de *MtAGL6* está contenida en una región definida del tejido nucelar. c) Expresión en la región nucelar próxima al funículo y en la epidermis. d) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. PV, Pared de la vaina; S, Semilla; N, Nucela; F, Funículo; SE, Saco embrionario; E, Endospermo; CS, Células basales del suspensor; Em, Embrión, Ep, Epidermis.



### 1.3.2.2 Patrón de expresión de *MtAGL6-like*

La expresión de *MtAGL6-like*, analizada mediante *Northern blot*, se detecta en todos los tejidos estudiados, siendo muy intensa en flores e intensa en hojas. Es leve en tallos, frutos y raíces (Figura 26).

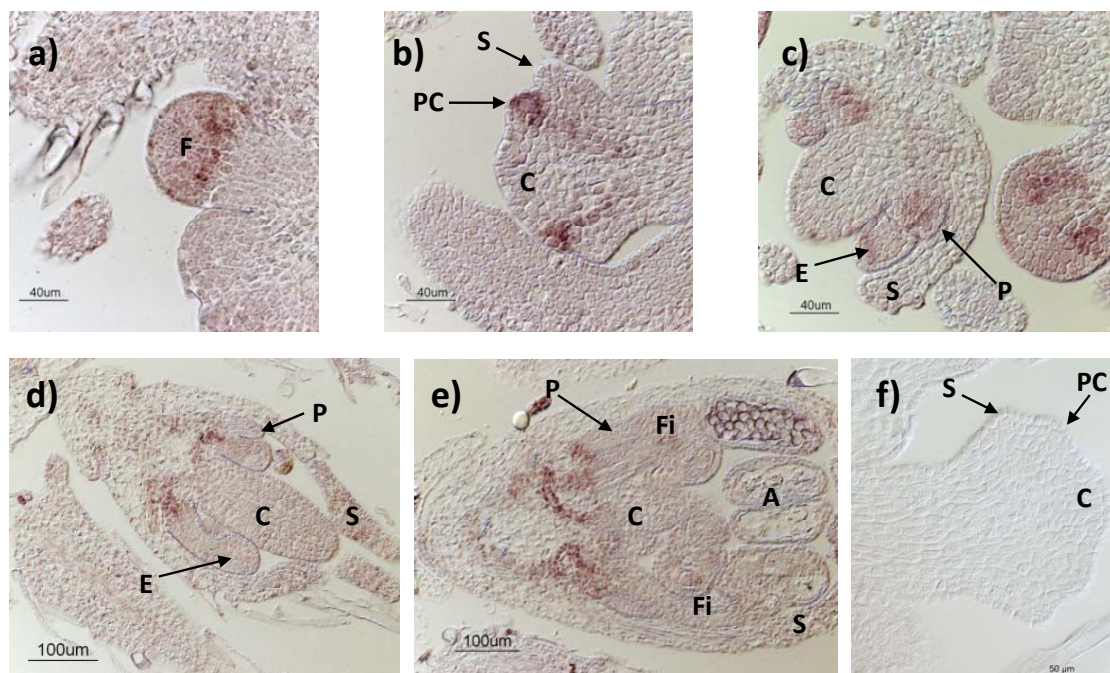


**Figura 26. Análisis del patrón de expresión de *MtAGL6-like* mediante *Northern blot*.** Se utilizó RNA de diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R).

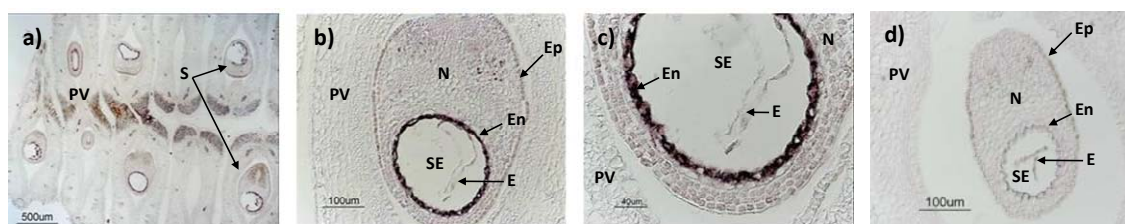
La hibridación *in situ* muestra que el transcrito de *MtAGL6-like* se detecta en todo el meristemo floral desde el estadio 2, tendiendo a centrarse en la zona interior del mismo (Figura 27, a). En el estadio 4 la expresión se define en los primordios comunes y en las capas celulares subyacentes a dichos primordios hacia la parte central del meristemo (Figura 27, b). En el estadio 5, cuando se han diferenciado los primordios de estambres y pétalos, la expresión de *MtAGL6-like* se extiende por dichos primordios y es leve, haciéndose más intensa hacia el interior de su región basal (Figura 27, c). En el estadio 6, la expresión se centra principalmente en la base de los primordios de estambre (Figura 27, d). En estadios tardíos del desarrollo floral la expresión de *MtAGL6-like* se mantiene en la región subyacente a la base de los estambres y en franjas hacia el centro de la flor (estadio 7, Figura 27, e). No se detectó ninguna señal de hibridación en ninguna sección de tejido hibridada con la sonda “sentido”, utilizada como control negativo (Figura 27, f).

A pesar de que se observó mediante hibridación *Northern blot* una expresión mucho menor de este gen en fruto, se realizaron estudios de expresión mediante hibridación *in situ* de *MtAGL6-like* en frutos de *Medicago truncatula*. Se utilizaron frutos en el estadio descrito anteriormente (Pod age: 6 DPP). En este caso, se realizaron cortes longitudinales del fruto, paralelos al eje de enrollado del mismo. En la Figura 28 (a-c) se muestra un corte en el que puede verse una expresión muy intensa de *MtAGL6-like* en el

endotelio de la semilla. No se detectó ninguna señal de hibridación en tejidos hibridados con la sonda “sentido” (Figura 28, d).



**Figura 27. Análisis del patrón de expresión de *MtAGL6-like* mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*.** a) Expresión generalizada en el meristemo floral en estadio de desarrollo 2. b) Expresión en los primordios comunes y franjas celulares hacia el interior del meristemo en el estadio 4. c) Expresión concentrada en la base de los primordios de pétalo y estambre y expresión leve en la extensión de los mismos durante el estadio 5. d) La expresión se define al interior de la base de estambres en el estadio 6 del desarrollo floral. e) Expresión mantenida en la base de los estambres y franjas hacia el interior de la flor en estadio 7. f) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. F, Meristemo floral; PC, Primordio común; S, Sépalo; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo; Fi, Filamento; A, Antera.



**Figura 28. Análisis del patrón de expresión de *MtAGL6-like* en frutos.** Patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en corte longitudinal del fruto y la semilla de *Medicago truncatula* a). Se distinguen las semillas y el tejido de la vaina. b) Semilla. La expresión de *MtAGL6-like* está limitada al endotelio. c) Expresión de *MtAGL6* en el endotelio. d) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. PV, Pared de la vaina; S, Semilla; N, Nucela; SE, Saco embrionario; E, Endospermo; Ep, Epidermis; En, Endotelio.

## 1.4 *MtSOC1a*, *MtSOC1b* Y *MtSOC1-like*: GENES CON HOMOLOGÍA A GENES MADS-box DEL GRUPO *TDR3* (*SOC1*)

### 1.4.1 Aislamiento y análisis de secuencia de *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like*

Se aislaron tres clones diferentes con secuencias relacionadas con genes del poco caracterizado grupo *TDR3*, también llamado *SOC1*. Mediante la comparación de las secuencias de los clones y las secuencias contenidas en las bases de datos se pudo ver que dos de ellos, 1.3.1 y 14.3.2, están más cercanamente relacionados por homología de secuencia al gen *AtSOC1* (Lee *et al.*, 2000) de *Arabidopsis thaliana* que a cualquier otro miembro del grupo *SOC1* de esta planta. Estos clones se denominaron *MtSOC1a* (clon 1.3.1) y *MtSOC1b* (clon 14.3.2). El tercer clon, el 12.1.1, está menos relacionado con *AtSOC1* y no corresponde claramente a ningún gen de *Arabidopsis thaliana* del grupo *SOC1*, así que se le llamó *MtSOC1-like*.

El clon *MtSOC1a* (clon 1.3.1) tiene una longitud de 982 pb (Figura 29) y contiene una región 5' no codificante de 89 pb, una pauta de lectura abierta de 639 pb y una región 3' no traducida de 251 pb. La proteína predicha *MtSOC1a* tiene 213 aminoácidos, una masa molecular de 24,46 kDa y un punto isoelectrico teórico de 10,09.

El clon *MtSOC1b* (clon 14.3.2) tiene 1152 pb (Figura 30), con una región 5' no codificante de 240 pb y una región 3' no codificante de 237 pb. Presenta una pauta de lectura abierta de 672 pb que codifica un polipéptido de 224 aminoácidos (25,70 kDa) con un punto isoelectrico teórico de 9,55.

En la Figura 31 se muestra la secuencia del clon *MtSOC1-like* (clon 12.1.1) con la secuencia aminoacídica de la proteína predicha. La longitud completa del clon es de 851 pb y contiene una pauta de lectura abierta de 615 pb que codifica una proteína de 205 pb con un peso molecular predicho de 23,79 kDa y un punto isoelectrico teórico 9,28. La región 5' no traducida tiene una longitud de 63 pb y la región 3' no traducida, de 170 pb.

El dominio MADS de estos tres genes del grupo *SOC1* difiere de otros genes homeóticos florales pues contiene cuatro residuos de aminoácidos relativamente raros dentro de la caja MADS, incluyendo la valina (V) en la posición 2, tirosina (T) en la 6, fenilalanina (F) en la 33 y prolina (P) en la 50 (esta última ausente en el gen *MtSOC1-like*). Esta combinación es característica de una pequeña familia de genes MADS-box

(Theissen *et al.*, 1996) representada por los genes *TDR3* (Pnueli *et al.*, 1991) de *Solanum lycopersicum* y *AtSOC1* (Lee *et al.*, 2000) de *Arabidopsis thaliana*. El hecho de que *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like* presenten estos aminoácidos característicos indica que estos genes efectivamente pertenecen al grupo *SOC1*.

3	TCGTTAAGTGTGTAATCACAAACCCCTTCTCCACAACACTACTGGAGTAGTTTCTTTTCTTCT	62
	▼	
1	M V R G K T Q M K R I	11
63	TTGCTGCTGGTAGAGAAATTAATCAAAATGGTGGAGAGAAAGACACAAATGAAGCGTATA	122
12	<b>E N A T S R Q V T F S K R R N G L L K K</b>	31
123	GAGAATGCTACAAGCAGACAAGTGACATTCTCAAAGAGGCGTAATGGTTTGGTGAAGAAA	182
	▼	
32	<b>A F E L S V L C D A E V A L I I F S P R</b>	51
183	GCATTTGAGCTATCTGTTCTCTGTGATGCTGAAGTTGCTCTTATCATCTTCTCTCCAAGA	242
52	<b>G K L Y E F S S S C S M Q D T I E R Y R</b>	71
243	GGAAAACCTTTATGAATTTTCAAGCTCCTGCAGCATGCAGGACACAATTGAACGCTACCGT	302
72	<b>R N T R S A Q P M Q R S D E Q N M Q N L</b>	91
303	AGGAATACCAGGAGTGCTCAACCAATGCAAAGATCAGATGAACAAAATATGCAGAATTTG	362
92	<b>K H E T A S L M K K I E L L E A S K R K</b>	111
363	AAGCATGAAACAGCAAGTTTGATGAAGAAAATTGAGCTTCTTGAAGCTTCGAAACGGAAA	422
112	<b>L M G E G L G S C S L D E L Q Q I E Q Q</b>	131
423	CTCATGGGAGAAGGTTTGGGGTCATGCTCTTGGATGAACTACAACAGATAGAACAGCAG	482
132	<b>L E K S V S V V R A R K N Q A Y K H Q I</b>	151
483	TTGGAAAAGAGTGTAGCGTTGTTTCGAGCAAGAAAGAATCAGGCATACAAGCATCAAATT	542
152	<b>D Q L K E K E K N L V A E N A R L S K Q</b>	171
543	GACCAACTAAAAGAAAAGGAAAAAACCTAGTTGCTGAAAATGCCAGGCTCTCTAAGCAG	602
172	<b>P P Q P Q P Q P T T K D H Q R E D Q Q P</b>	191
603	CCCCCGCAGCCGACCCGAGCCAACAACAAGGATCATCAAAGAGAAGATCAACAACCC	662
192	<b>Y A E S S P S S D V V T E L F I G L H R</b>	211
663	TATGCTGAAAGCAGTCCAAGCTCAGATGTAGTGACTGAATTGTTTCATTGGACTTCACAGG	722
212	<b>S S *</b>	213
723	TCTAGTTGAAGATAATCAAACCTAATTATGTAGTGTTTGGTTTGGTTTACATTCCAATGCA	782
783	TTTAAATGAACATTTTGCAACTAAGCAACAAAATCCTTCTTTTGGCATGGATTTGTCCAT	842
843	ATTTTTATAAAAGACACATTCATATCCCTGCTTTTTTGTGTCAGTTAGTAGGGGAAGCCA	902
903	TGCTAAGGTAACCTTTATGACAGGTTGCCGATTTTGCTAAAAAACCAGGGTTTAA	962
963	AGTCCTGGGCATGCGGATTT	982

**Figura 29. Secuencia del clon *MtSOC1a*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Con puntas de flecha negras se indican los aminoácidos característicos para el grupo SOC: V, valina (posición 2); T, tirosina (posición 6); F, fenilalanina (posición 33) y P, prolina (posición 50).

Se realizó una comparación de estas secuencias con las secuencias contenidas en las bases de datos mediante BLAST. El cDNA de *MtSOC1a* corresponde en secuencia a un gen contenido en el cromosoma 7 de *Medicago truncatula*, que se deduce del clon genómico mte1-40a8 (“complete sequence”; GenBank AC184047.1). El gen *MtSOC1a*

está formado por 7 exones (182, 85, 62, 100, 42, 42 y 129 pb) y 6 intrones. La secuencia genómica de *MtSOC1a* está contenida entre las bases 6.171 y 24.793 del clon mencionado.

```

1   CCGAGGAAAGATAGTCCCCCAATCCAATCCTTTTCCTTGAATTTACCTCAATTATGT   60
61  ATCACTACTTTTCATTTGATTCCTTAAATCTTATTTATTTTACCCTTTTCTCCTTTCTT   120
121 TTCTTTTTTAGACACAACCCTTTATTCCTCCTATCCCTTCCCTGGTTCATTTTTCTTT   180
181 TATTTTCCAATTTGGTGCAAATCTGCTTCTTTTGTGCTGCAAAGAAAAGGAAAAAAA   240
      ▼
1   M V R G K T Q M K R I E N A T S R Q V T   20
241 ATGGTGAGAGGAAAGACACAAATGAAGCGTATAGAGAACGCAACAAGTAGACAAGTAACA   300
      ▼
21  F S K R R N G L L K K A F E L S V L C D   40
301 TTCTCAAAGAGAAGAAATGGTTTGTGAAGAAGGCCTTTGAACTGTCAGTGTATGTGAT   360
      ▼
41  A E V A L I V F S P R G R L Y E F A S S   60
361 GCTGAGGTTGCTCTTATTGTTTTCTCACCAAGAGGGAGGCTTTATGAATTTGCTAGCTCT   420

61  S I L E T I E R Y R S H T R I N N T P T   80
421 AGCATTCTAGAAACAATTGAACGATACCGCAGTCATACCAGGATTAATAATACTCCAACA   480

81  T S E S V E N T Q Q L K E E A E N M M K   100
481 ACATCTGAATCAGTTGAAAATACTCAGCAATTGAAGGAAGAAGCAGAAAACATGATGAAG   540

101 K I D L L E T S K R K L L G E G L G S C   120
541 AAGATTGACCTTCTTGAGACTTCAAACGGAAACTCTTAGGAGAAGGTTTAGGGTCTTGT   600

121 S I D E L Q K I E Q Q L E K S I N K I R   140
601 TCCATTGATGAACTACAAAAGATAGAACAACAGTTGGAGAAAAGCATAAACAAAATTCGA   660

141 V K K T K V F R E Q I D Q L K E K E K A   160
661 GTCAAAAAGACTAAGGTTTTTCAGGGAGCAAATTGATCAGCTAAAAGAAAAGGAAAAGCC   720

161 L V A E N V R L S E K Y G N Y S T Q E S   180
721 CTAGTTGCTGAAAATGTCAGGCTCTCTGAGAAGTATGGTAACTATTCAACACAGGAATCA   780

181 T K D Q R E N I A E A E P Y A D Q S S P   200
781 ACAAAGGATCAGAGAGAAAATATAGCTGAAGCTGAACCTTATGCAGATCAAAGTAGTCCA   840

201 S S D V E T E L F I G L P E T R S R R I   220
841 AGTTCAGATGTGGAGACTGAATTGTTTCATTGGTCTTCCAGAAAACAAGATCAAGGCGCATT   900

221 S P K V *   224
901 TCTCCAAAGGTGTAGCTAGTTTAGGATTAATTAATCCATGACTATGCAATTGAAAATAAG   960
961 GGTGAGGCAAATGTCATCAATGTATATTGGATATGTTTCCCTTAATTATGCTCTCATT   1020
1021 AAATAAGTGGTGAATTGTGAGAGTATTGACACTTTTATGGTTGATTTTCAAACCTATGT   1080
1081 CTGTATTGATGCTTTTATGTGACAGACTCATAAGTATAGACTTCCACTATATTGTA        1140
1141 AAAAAAAAAA                        1152

```

**Figura 30. Secuencia del clon *MtSOC1b*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Con puntas de flecha negras se indican los aminoácidos característicos para el grupo SOC: V, valina (posición 2); T, tirosina (posición 6); F, fenilalanina (posición 33) y P, prolina (posición 50).

*MtSOC1b* corresponde en secuencia a un mRNA “desconocido” con número de acceso GenBank ACJ86138.1 (deducido del clon genómico MTYFP\_FQ\_FR\_FS1G-E-5 de *Medicago truncatula*), que codifica una proteína MADS-box “desconocida” con número de acceso BT053478.1.

```

1  TTCCATTCTTTTCTTCCACTAAATATTTGTGAGTTCAGATCTTACCCTCAAAGAGAGTTC 60
      ▼           ▼
1      M V R G K T Q M K R I E N E S N R Q V 19
61  ATAATGGTGAGAGGAAAACTCAAATGAAACGCATCGAAAATGAGTCAAACAGACAAGTA 120
      ▼
20  T F S K R R N G L L K K A F E L S V L C 39
121  ACTTTCTCAAAGAGAAGAAATGGACTGCTTAAAAAGGCCTTTGAACTTTCAGTGCCTTGT 180
      ▼
40  D A E V A L I V F S T T G K L Y E F S S 59
181  GATGCTGAAGTCGCACTCATCGTCTTCTCTACCACAGGGAACTCTATGAGTTTTCTAGT 240
60  S S I S K T V E R Y Q G K V K E L V L S 79
241  TCAAGTATAAGCAAGACAGTGAACGCTATCAAGGGAAAAGTCAAGGAACTGGTTCTCAGC 300
80  T K G I Q E N T Q H L K E C D I D T T K 99
301  ACCAAAGGAATCCAAGAAAATACACAGCATCTAAAGGAATGTGATATCGACACAACAAAG 360
100 K L E H L E L S K R K L L G E E L G S C 119
361  AAGTTGGAACACCTAGAACTTTCCAAAAGGAAGCTGTTGGGAGAAGAATTGGGTTTCATGT 420
120 A F D E L Q Q I E N Q L E R S L S K I R 139
421  GCTTTTGACGAATTACAACAGATTGAAAATCAACTTGAACGTAGCTTAAGCAAATAAAGG 480
140 A R K N Q L L K E Q I E K L K D K E R L 159
481  GCAAGAAAGAATCAATTGCTCAAGGAGCAAATGAAAAGCTAAAAGACAAGGAAAGGTTA 540
160 L L E E N K R L C K Q C G I G Q N D C L 179
541  CTTCTTGAAGAAAATAAACGCTTATGCAAGCAGTGTGGAATTGGACAAAATGATTGTTTA 600
180 N K Q Q E S V H D E E V E T E L F I G R 199
601  AATAAACAACAAGAAAGTGTGCATGACGAGGAGGTGGAGACAGAATTGTTTCATAGGGCGA 660
200 P K K R M N * 205
661  CCAAAGAAAAGAATGAATTGAGAGCTGAAACCAGCAACATAAGAAGAATATAATTAACAT 720
721  TGAAAGTTAATAATGTCTATATAAATAAATATTCATCCGCATTGAAAGTTTATGTTATAT 780
781  CTAATTAATAACGTAACCTTTTGTGTACTGCATCAATAATATTAATCACAACGTACGATG 840
841  CTTGTGAAAAA 851

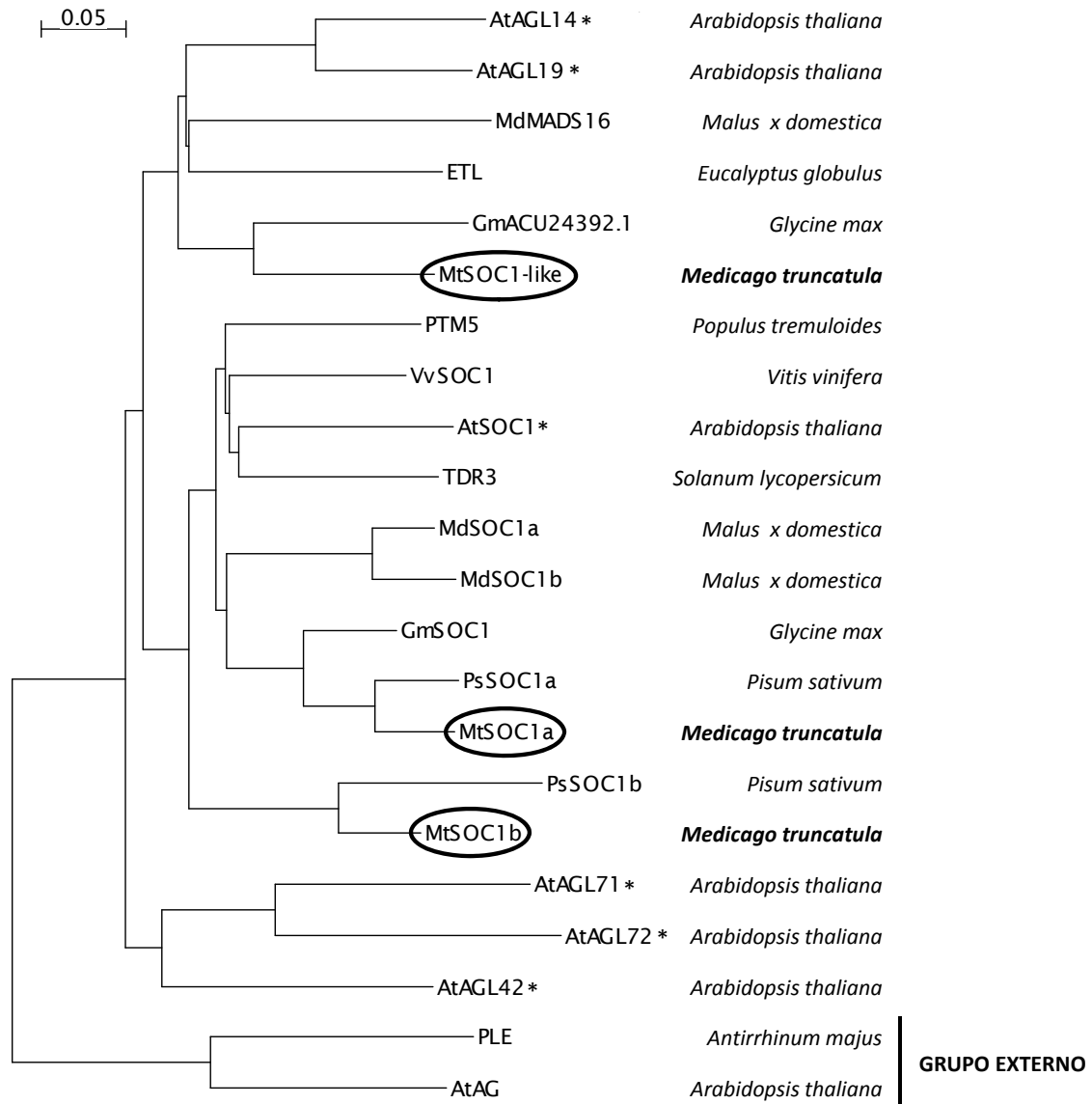
```

**Figura 31. Secuencia del clon *MtSOC1-like*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Con puntas de flecha negras se indican los aminoácidos característicos para el grupo SOC: V, valina (posición 2); T, tirosina (posición 6); F, fenilalanina (posición 33). Con punta de flecha gris se indica la posición 50, donde en lugar de prolina (P) esta proteína posee una T (tirosina).

La comparación de *MtSOC1-like* con las secuencias de la base de datos “TIGR Plant Transcript Assemblies” (<http://plantta.icvi.org/>), reflejó que el cDNA del clon equivale a un EST (“Expressed sequence tag” o marcador de secuencia expresada) con número de referencia TA24069\_3880. Este EST tiene en NCBI un número de acceso GenBank BQ255341 (“MTNAH10TKM KVKC *Medicago truncatula* cDNA clone pKVKC-8a10”).

En la Figura 32 se muestra el árbol filogenético que se obtuvo utilizando secuencias proteicas predichas para *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like* y proteínas MADS-box del grupo SOC1 de diferentes especies. Se utilizó una colección de proteínas SOC1 de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2000) o *Solanum lycopersicum* (Pnueli *et al.*, 1991) y leguminosas como *Glycine max* (Xu *et al.*, unpublished) o *Pisum sativum* (Hecht *et al.*, 2005). Además se incluyeron proteínas SOC1 descritas en otras

especies, como *Malus x domestica* (Kotoda *et al.*, 2010), *Eucalyptus globulus* (Decroocq *et al.*, 1999), *Populus tremuloides* (Cseke *et al.*, 2003) y *Vitis vinifera* (Fang *et al.*, unpublished).



**Figura 32. Árbol filogenético de las secuencias proteicas predichas para genes del grupo SOC1.** Se utilizó la secuencia proteica íntegra de las siguientes proteínas: *Arabidopsis thaliana*: AtSOC1 (Lee *et al.*, 2000; Acc NP\_182090.1), AtAGL14 (Rounsley *et al.*, 1995; Acc NP\_192925.1), AtAGL19 (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b; Acc NP\_194026.1), AtAGL42, AtAGL71, AtAGL72 (Pařenicová *et al.*, 2003; Acc NP\_568952.1, NP\_199999.1, NP\_200000.3); *Pisum sativum*: PsSOC1a, PsSOC1b (Hecht *et al.*, 2005; Acc AAX47171.2, AAX33629.1); *Glycine max*: GmSOC1 (Xu *et al.*, unpublished; Acc ABC75835.1), GmACU24392.1 (Cheung *et al.*, unpublished; Acc ACU24392.1); *Malus x domestica*: MdMADS16 (Shigeta *et al.*, unpublished; Acc BAG48169.1), MdSOC1a, MdSOC1b (Kotoda *et al.*, 2010; Acc BAI49494.1, BAI49495.1); *Vitis vinifera*: VvSOC1 (Fang *et al.*, unpublished; Acc ACZ26527.1); *Populus tremuloides*: PTM5 (Cseke *et al.*, 2003; Acc AAP46287.1); *Eucalyptus globulus*: ETL (Decroocq *et al.*, 1999; Acc AAD16052.1); *Solanum lycopersicum*: TDR3 (Pnueli *et al.*, 1991; Acc CAA43168.1); *Medicago truncatula*: MtSOC1a, MtSOC1b, MtSOC1-like (este trabajo). Las proteínas MtSOC1a, MtSOC1b y MtSOC1-like se encierran en óvalos y las proteínas del grupo SOC1 de *Arabidopsis thaliana* se señalan con un asterisco. El árbol se enraizó con PLE de *Antirrhinum majus* (Acc AAB25101.1) y AtAG de *Arabidopsis thaliana* (Acc NP\_567569.3).



*MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like* se distribuyen en dos grandes ramas o subgrupos dentro del árbol filogenético. En una de las ramas, la que incluye el gen *AtSOC1* (Lee *et al.*, 2000) de *Arabidopsis thaliana*, que da nombre al grupo, se localizan los genes *MtSOC1a* y *MtSOC1b*. *MtSOC1a* se agrupa con sus ortólogos en leguminosas *PsSOC1a* (Hecht *et al.*, 2005) de *Pisum sativum* y *GmSOC1* (Xu *et al.*, unpublished) de *Glycine max*. El análisis filogenético indica que *MtSOC1a* es el que está más estrechamente relacionado con los genes representativos del grupo *SOC1*: *AtSOC1* (Lee *et al.*, 2000) de *Arabidopsis thaliana* y *TDR3* (Antes *TM3*; Pnueli *et al.*, 1991) de *Solanum lycopersicum* y sus ortólogos en otras plantas como *Vitis vinifera* (*VvSOC1*; Fang *et al.*, unpublished), *Populus tremuloides* (*PTM5*; Cseke *et al.*, 2003) o *Malus x domestica* (*MdSOC1a* y *MdSOC1b*; Kotoda *et al.*, 2010). Un poco más alejado, pero dentro del mismo subgrupo, se encuentran *MtSOC1b* y *PsSOC1b* (Hecht *et al.*, 2005) de *Pisum sativum*.

Por otro lado, *MtSOC1-like* forma una rama con *AtAGL14* (Rounsley *et al.*, 1995) y *AtAGL19* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b), dos genes descritos como específicos de raíz en *Arabidopsis thaliana*, un gen bien caracterizado de *Eucalyptus globulus* llamado *ETL* (Decroocq *et al.*, 1999) y el gen *GmACU24392.1* (Cheung *et al.*, unpublished), aislado pero aún no caracterizado, de la leguminosa *Glycine max*.

Las proteínas *MtSOC1a* y *MtSOC1b* presentan entre sí una homología del 62% al comparar las secuencias aminoacídicas completas. Tienen un 93% de homología en la región correspondiente a la caja MADS, 34% en la región I, 61% en la región de la caja K y 42% en la región C-terminal. En la Tabla 14 se muestran los porcentajes de homología de *MtSOC1a* y *MtSOC1b* con proteínas de la misma rama o subgrupo filogenético, como *TDR3* (Pnueli *et al.*, 1991) de *Solanum lycopersicum*, *AtSOC1* (Lee *et al.*, 2000) de *Arabidopsis thaliana* y las proteínas *SOC1* aisladas en leguminosas.

Por homología de secuencia se podría decir que *MtSOC1a*, *PsSOC1a* y *GmSOC1* son proteínas ortólogas, así como *MtSOC1b* y *PsSOC1b*. Ambas proteínas de *Medicago truncatula* tienen una homología de 64 – 66%, con las proteínas referentes de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*.



**Tabla 14. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de a) MtSOC1a y las proteínas representativas con las que presenta homología, b) MtSOC1b y las proteínas representativas con las que presenta homología**

a) MtSOC1a	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
PsSOC1a	88	100	96	83	71
PsSOC1b	53	76	30	54	37
GmSOC1	81	95	80	76	62
AtSOC1	66	93	44	63	45
TDR3	66	93	15	61	-

b) MtSOC1b	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
PsSOC1a	64	93	36	59	51
PsSOC1b	79	87	80	82	65
GmSOC1	70	95	40	64	59
AtSOC1	66	91	24	68	37
TDR3	64	93	19	56	-

Ps: *Pisum sativum*; Gm: *Glycine max*; At: *Arabidopsis thaliana*; TDR3: Antes TM3, de *Solanum lycopersicum*

El resultado del alineamiento múltiple de MtSOC1a y MtSOC1b con las proteínas SOC1 arriba mencionadas se muestra en la Figura 33, que revela además la presencia de 11 residuos de aminoácidos en la región C-terminal, llamados “motivo SOC1”, que se conservan en secuencias de proteínas SOC1 previamente publicadas. El motivo SOC1, altamente conservado, está presente en proteínas del grupo SOC1 de gimnospermas y angiospermas (Nakamura *et al.*, 2005).

**Figura 33. Alineamiento de las secuencias proteicas de MtSOC1a, MtSOC1b y de genes MADS-box del grupo SOC1 de la misma rama filogenética con los que presenta homología.** Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios MADS y K así como las regiones I y C-terminal se señalan con flechas. El motivo SOC1 se subraya con una línea continua.

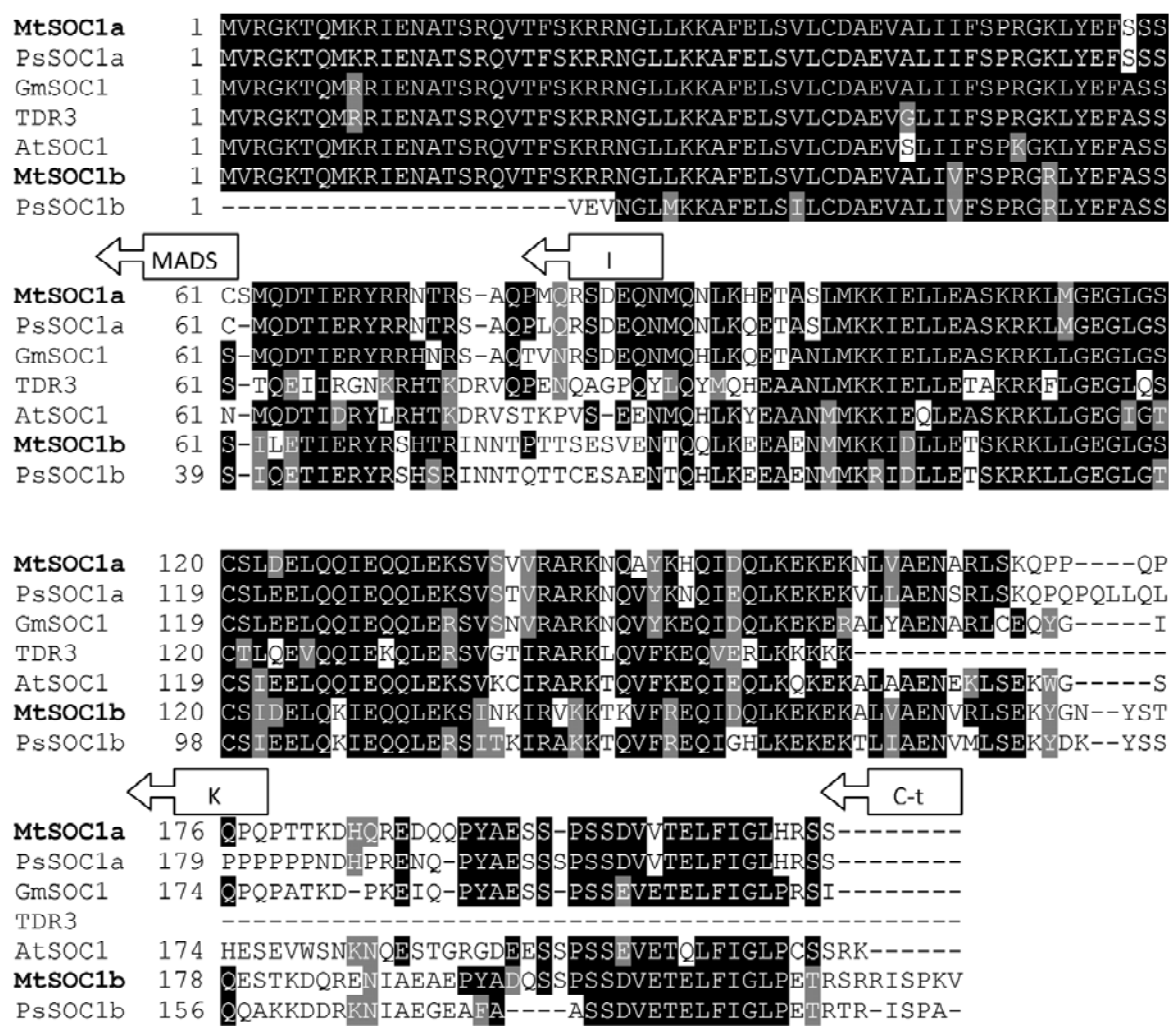


Figura 33. Alineamiento de las secuencias proteicas de *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y de genes MADS-box del grupo *SOC1* de la misma rama filogenética con los que presenta homología.

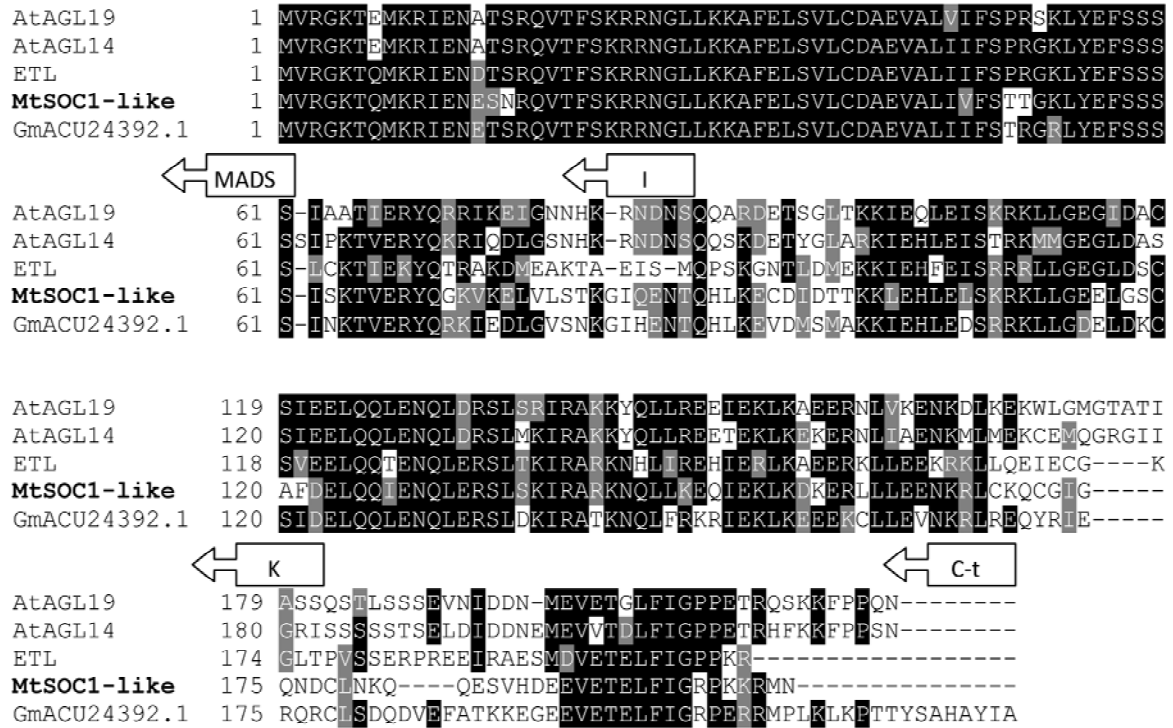
La proteína MtSOC1-like, contenida en una rama filogenética distinta de *MtSOC1a* y *MtSOC1b*, tiene un 59 – 60% de homología con dichas proteínas. En la Tabla 15 pueden verse los porcentajes de homología de MtSOC1-like con proteínas de su mismo subgrupo filogenético. Por homología de secuencia, la proteína de soja con número de acceso GenBank ACU24392.1 probablemente sea ortóloga de MtSOC1-like.

Tabla 15. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de MtSOC1-like y las proteínas con las que presenta mayor homología

	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>GmACU24392.1</b>	<b>71</b>	91	64	63	50
<b>ETL</b>	<b>60</b>	90	34	53	35
<b>AtAGL14</b>	<b>58</b>	88	36	50	32
<b>AtAGL19</b>	<b>59</b>	85	33	52	35

Gm: *Glycine max*; ETL: TM3-like de *Eucalyptus globulus*; At: *Arabidopsis thaliana*

El alineamiento múltiple entre las proteínas del subgrupo se muestra en la Figura 34. Todas las proteínas muestran residuos de aminoácidos que componen el motivo SOC1.



**Figura 34. Alineamiento de la secuencia proteica de *MtSOC1-like* y de genes MADS-box del grupo *SOC1* de la misma rama filogenética con los que presenta homología.** Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios MADS y K así como las regiones I y C-terminal se señalan con flechas. El motivo SOC1 se subraya con una línea continua.

### 1.4.2 Patrón de expresión de *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like*

#### 1.4.2.1 Patrón de expresión de *MtSOC1a* y *MtSOC1b*

Se han analizado los patrones de expresión de *MtSOC1a* y *MtSOC1b* en varios tejidos de *Medicago truncatula* mediante *Northern blot* (Figuras 35, a y 36, a). Estos genes se expresan preferentemente en tejidos vegetativos. Ambos genes presentan una expresión fuerte en hoja, así como ausencia de expresión en fruto. *MtSOC1a* se expresa además fuertemente en tallo y con bajo nivel de transcrito en raíz. No se observa expresión en flores (Figura 35, a). *MtSOC1b* se expresa en raíz y la expresión en tallo y flor es muy débil (Figura 36, a).

El gen *SOC1* (antes *AGL20*) de *Arabidopsis thaliana* está involucrado en el control del tiempo de floración. Este gen se activa en los meristemos apicales del brote durante la transición floral (Borner *et al.*, 2000). A fin de ver las diferencias en la expresión de *MtSOC1a* y *MtSOC1b* en ápices vegetativos o inflorescentes tempranos, en la hibridación

*in situ* se incluyeron ambos tipos de ápices (Figuras 35, b-f y 36, b-f). Los patrones de expresión de *MtSOC1a* y *MtSOC1b* analizados mediante esta técnica son similares para ambos genes.

Ambos transcritos se detectan en el meristemo vegetativo, principalmente en el extremo distal del mismo, así como a lo largo de los haces vasculares del mismo. También se detectan en los primordios de hoja (Figuras 35, b y 36, b). Tras la transición floral, durante el estadio 2 de desarrollo floral, ambos genes se expresan en los meristemas florales tempranos que han emergido del meristemo inflorescente secundario. A partir del estadio 3 del desarrollo floral, la expresión de *MtSOC1a* desaparece del meristemo floral (Figura 35, c). No se detecta tampoco durante el estadio 4, cuando se han formado los primordios comunes (Figura 35, d). En el caso de *MtSOC1b*, en estadio 3 aún se detecta expresión leve del gen en la región central del meristemo floral, pero no se detecta en estadios posteriores del desarrollo floral, como en el estadio 4 (Figura 36, c y d). Los transcritos de ambos genes son indetectables en yemas florales adultas en estadio 6 de desarrollo floral (Figuras 35, e y 36, e).

En ninguna sección de estos tejidos hibridada con las sondas “sentido” se detectó señal de hibridación (Figuras 35, f y 36, f).

---

**Figura 35. Análisis del patrón de expresión de *MtSOC1a*.** a) Hibridación *Northern blot* de *MtSOC1a* en diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R). b-f) Análisis del patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en ápices vegetativos e inflorescentes de *M. truncatula*. b) Expresión en el ápice del meristemo vegetativo y los haces vasculares. c) Expresión en meristemo floral emergente del meristemo inflorescente secundario en el estadio 2 del desarrollo floral. No hay expresión en meristemas florales más desarrollados. d) Ausencia de expresión en el estadio 4. e) Ausencia de expresión en flores en estadio 6 de desarrollo. f) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. V, Meristemo vegetativo; H, Hoja; HV, Haces vasculares; I2, Meristemo inflorescente secundario; F, Meristemo floral; PC, Primordio común; S, Sépalo; C, Carpelo; P, Pétalo; E, Estambre.

**Figura 36. Análisis del patrón de expresión de *MtSOC1b*.** a) Hibridación *Northern blot* de *MtSOC1b* en diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R). b-f) Análisis del patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en ápices vegetativos e inflorescentes de *M. truncatula*. b) Expresión en el ápice del meristemo vegetativo y los haces vasculares. c) Expresión en meristemo floral durante el estadio 2 del desarrollo floral. Leve expresión en la región central del meristemo floral en estadio 3. d) Ausencia de expresión en el estadio 4. e) Ausencia de expresión en flores en estadio 6 de desarrollo. f) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. V, Meristemo vegetativo; HV, Haces vasculares; H, Hoja; F, Meristemo floral; S, Sépalo; PC, Primordio común; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo.

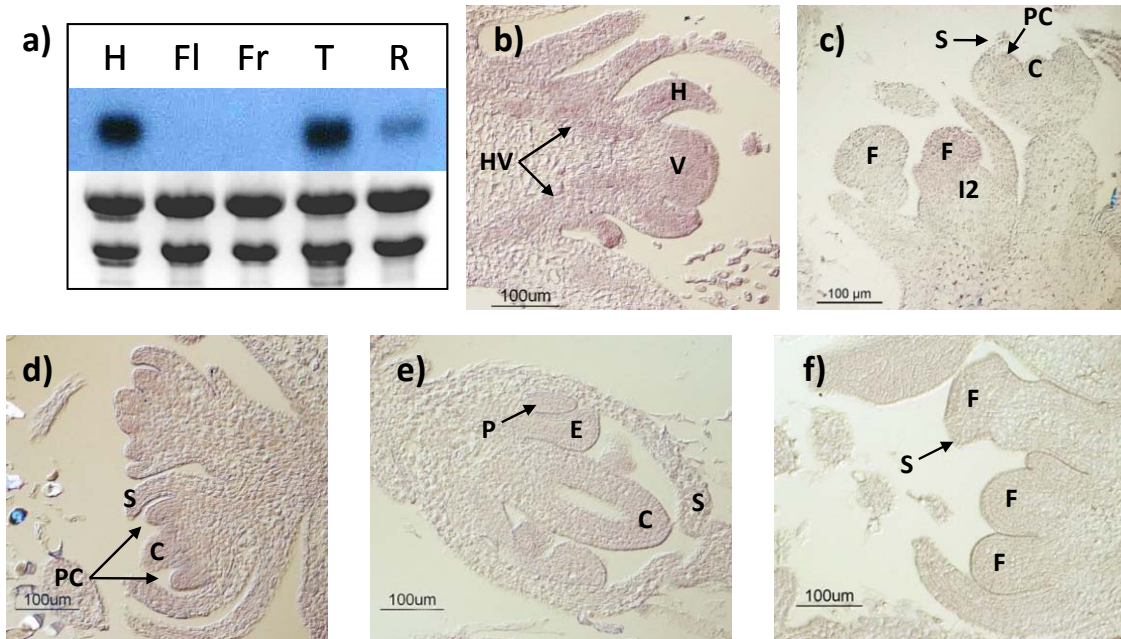


Figura 35. Análisis del patrón de expresión de *MtSOC1a*.

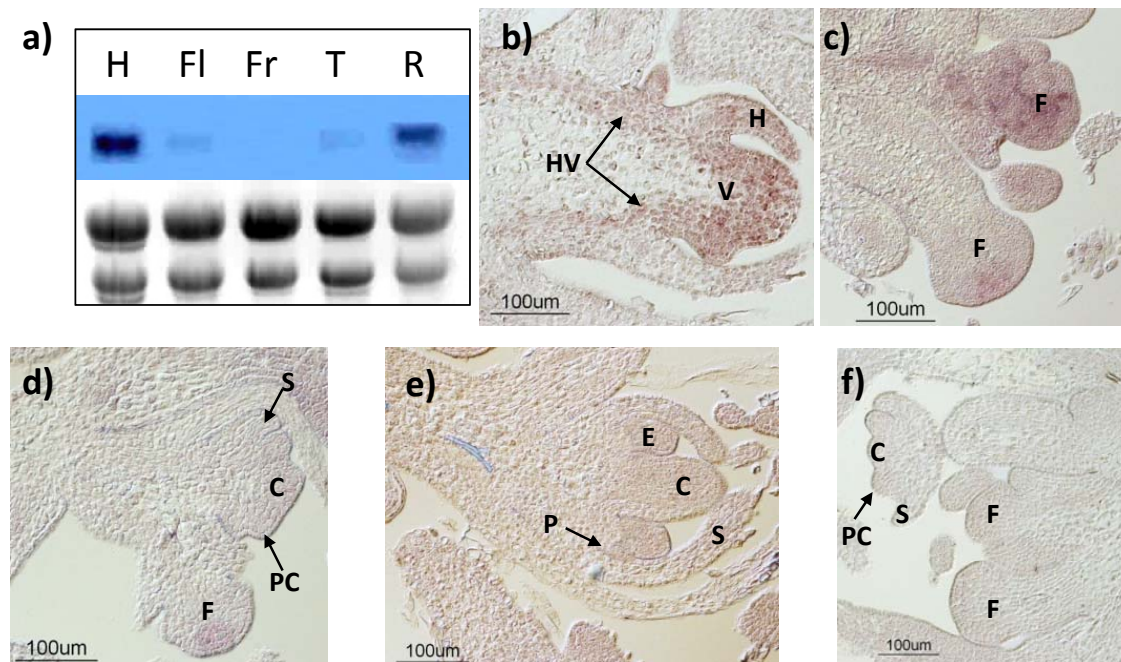


Figura 36. Análisis del patrón de expresión de *MtSOC1b*.

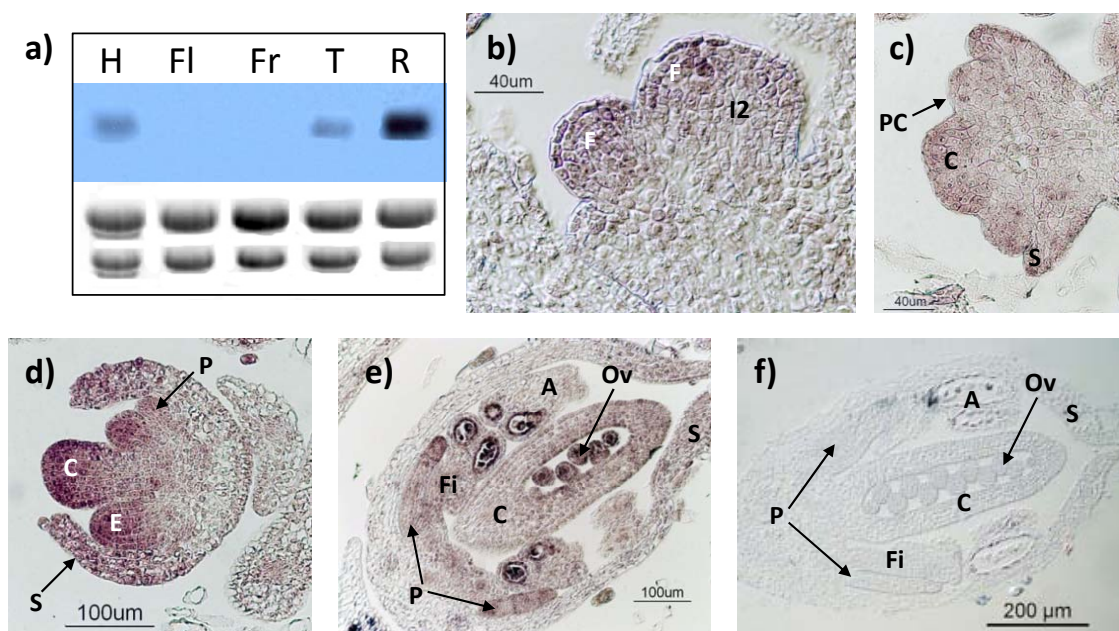
1.4.2.2 Patrón de expresión de *MtSOC1-like*

Se ha analizado la expresión de *MtSOC1-like* en varios tejidos de *Medicago truncatula* mediante *Northern blot*. La hibridación se realizó con una sonda derivada de la región C-terminal del cDNA, a fin de evitar hibridaciones cruzadas. *MtSOC1-like* se expresa en los



órganos vegetativos de la planta, fuertemente en raíz y con menor nivel de expresión en hojas y tallos. No se detecta expresión en flores en antesis ni en frutos (Figura 37, a).

Debido a que el aislamiento de los genes se hizo a partir de una genoteca de ápices florales de *Medicago truncatula*, se realizó un seguimiento de la expresión de este gen mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes (Figura 37, b-f).



**Figura 37. Análisis del patrón de expresión de *MtSOC1-like*.** a) Hibridación *Northern blot* de *MtSOC1-like* en diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (FI), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R). b-f) Análisis del patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*. b) Expresión en los meristemos florales en el estadio 2 de desarrollo. c) Expresión débil y generalizada sobre el meristemo floral durante el estadio 4 temprano. d) La expresión en el estadio 5 del desarrollo floral se detecta en todos los primordios de órganos, principalmente los reproductores. e) Expresión debilitada en flor adulta en estadio 7. Se detecta en pétalos, óvulos, estambres y carpelo. f) Hibridación *in situ* con la sonda "sentido". I2, Meristemo inflorescente secundario; F, Meristemo floral; S, Sépalo; PC, Primordio común; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo; Ov, Óvulo; Fi, Filamento; A, Antera.

Durante el estadio 2 del desarrollo floral, *MtSOC1-like* se expresa en los meristemos florales que emergen del meristemo inflorescente secundario, pero su expresión es más leve en este último (Figura 37, b). En el estadio 4, cuando se han diferenciado los primordios comunes, la expresión es débil y se observa de manera generalizada sobre el meristemo floral (Figura 37, c). El gen se expresa fuertemente durante el estadio 5 del desarrollo floral, principalmente en el carpelo y los primordios de estambres y pétalos, aunque puede detectarse en todos los órganos florales (Figura 37, d). Después la expresión del gen disminuye. En el estadio 7, cuando la flor se ha desarrollado

completamente, puede detectarse la expresión en óvulos, pétalos, y más débilmente en filamentos de estambres y región distal del carpelo. Se observa expresión en el tapetum de las anteras (Figura 37, e). No se detectó ninguna señal de hibridación en los controles negativos (Figura 37, f).

Probablemente, la expresión de *MtSOC1-like* se pierde durante el posterior crecimiento de la flor, lo que dificulta su detección mediante hibridación *Northern blot*, en el cual se utilizó RNA de flores maduras en anthesis.

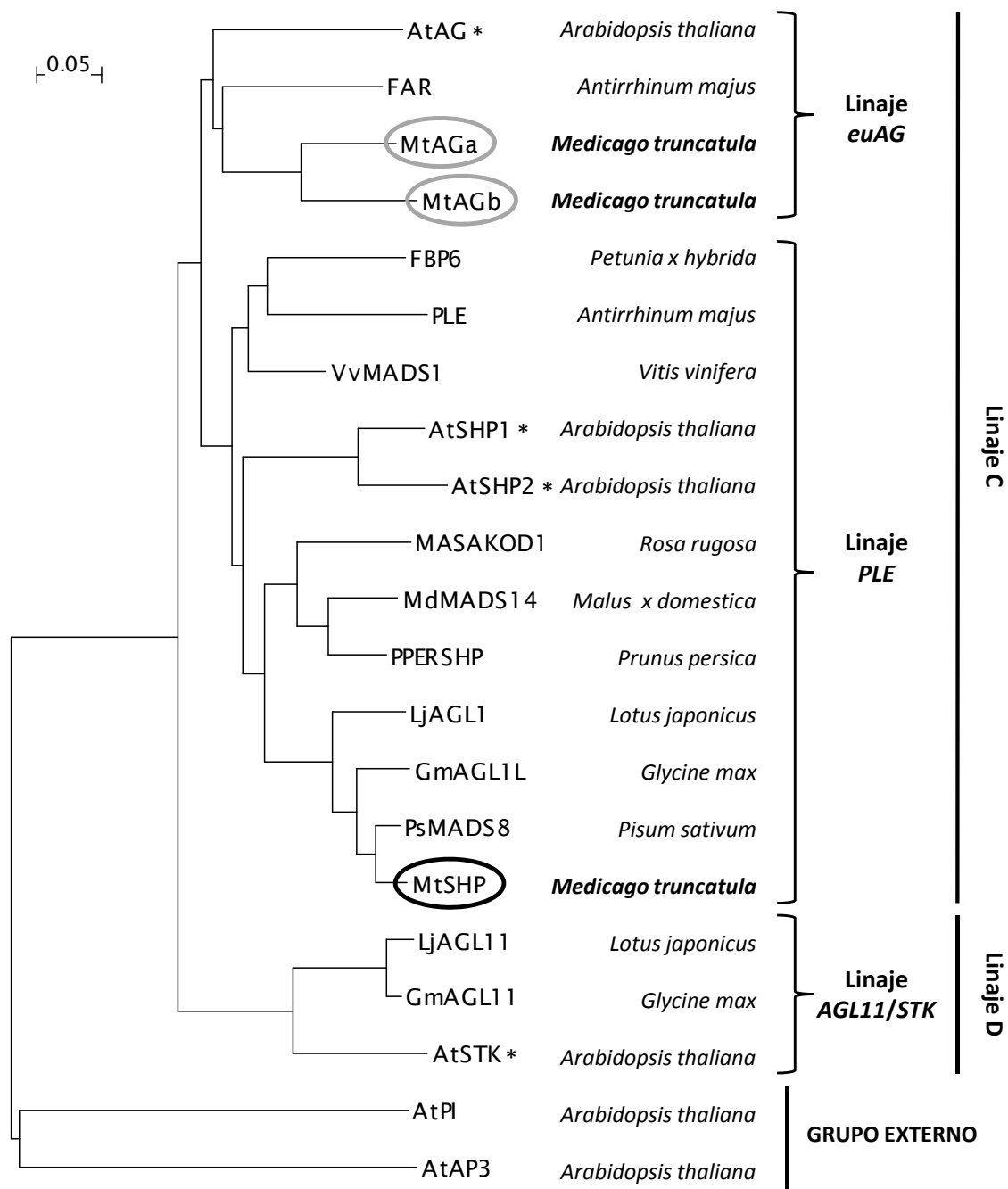
## 1.5 *MtAGa*, *MtAGb* Y *MtSHP*: GENES CON HOMOLOGÍA A GENES MADS-box DEL GRUPO AG

### 1.5.1 Aislamiento de *MtAGa*, *MtAGb* y *MtSHP*

Se aislaron tres clones diferentes cuyas secuencias muestran alta similitud con genes MADS-box pertenecientes al grupo *AGAMOUS* (AG). Dos de los clones aislados, 12.11.1 y 15.5.1 presentan secuencias con homología a los genes MADS-box de clase C *AGAMOUS* (AG; Bowman *et al.*, 1989) de *Arabidopsis thaliana* y *FARINELLI* (*FAR*, Davies *et al.*, 1999) de *Antirrhinum majus*, por lo que han sido nombrados *MtAGa* y *MtAGb*. El tercer clon aislado, 14.4.1, ha sido denominado *MtSHP* por su homología con *SHATTERPROOF1* (Ma *et al.*, 1991; Flanagan *et al.*, 1996) y *SHATTERPROOF2* (Ma *et al.*, 1991; Savidge *et al.*, 1995) de *Arabidopsis thaliana*.

Para determinar la relación evolutiva entre ellos, se generó un árbol filogenético utilizando las secuencias proteicas íntegras predichas de *MtAGa*, *MtAGb* y *MtSHP*, así como 16 secuencias más de proteínas del grupo AG descritas en diferentes especies de plantas modelo y leguminosas (Figura 38). Estudios previos muestran una duplicación ocurrida en el grupo AG ancestral, que produjo los linajes "C" y "D" (*sensu* Kramer *et al.*, 2004). Además, estos estudios indican que hubo una duplicación posterior dentro del linaje "C", que resultó en los linajes *euAG* y *PLE* (Becker y Theissen, 2003; Kramer *et al.*, 2004; Zahn *et al.*, 2006).

Los genes del linaje "C" son responsables de la especificación de los órganos reproductores florales (estambres y carpelos) y la determinación del meristemo floral (función C *sensu lato*; Coen y Meyerowitz, 1991; Schwarz-Sommer *et al.*, 1992).



**Figura 38. Árbol filogenético de las secuencias proteicas predichas para genes del grupo AG.** Se utilizó la secuencia proteica íntegra de las siguientes proteínas: *Arabidopsis thaliana*: AtAG (Bowman *et al.*, 1989; Acc NP\_567569.3), AtSHP1, AtSHP2 (Ma *et al.*, 1991; Acc NP\_191437.1, NP\_565986.1), AtSTK (Rounsley *et al.*, 1995; Acc NP\_192734.1), *Petunia x hybrida*: FBP6 (Angenent *et al.*, 1993; Acc CAA48635.1), FBP7, FBP11 (Angenent *et al.*, 1995; Acc CAA57311.1, CAA57445.1); *Antirrhinum majus*: FAR (Davies *et al.*, 1999; Acc CAB42988.1), PLE (Bradley *et al.*, 1993; Acc AAB25101.1); *Pisum sativum*: PsMADS8 (Hecht *et al.*, 2005; Acc AAX69070.1); *Lotus japonicus*: LjAGL1 (Dong *et al.*, 2005; Acc AAX13305.1); *Glycine max*: GmAGL1L (Hu *et al.*, unpublished; Acc ACA24479.1); *Malus x domestica*: MdMADS14 (Van der Linden *et al.*, 2002; Acc CAC80857.1); *Vitis vinifera*: VvMADS1 (Boss *et al.*, 2001; Acc AAK58564.1); *Prunus persica*: PPERSHP (Tani *et al.*, 2007; Acc ABG75908.1); *Rosa rugosa*: MASAKOD1 (Kitahara *et al.*, 2000; Acc BAA90743.1); *Medicago truncatula*: MtAGa, MtAGb, MtSHP (este trabajo). La proteína MtSHP se encierra en un óvalo negro, MtAGa y MtAGb en óvalos grises y las proteínas del grupo AG de *Arabidopsis thaliana* se señalan con un asterisco. El árbol se enraizó con AtPI y AtAP3 de *Arabidopsis thaliana* (Acc NP\_197524.1, NP\_191002.1).



Estos genes se encuentran representados en la mayoría de las plantas modelo por un único gen del linaje *euAG*, como sucede en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*. *MtAGa* y *MtAGb* se localizan dentro del linaje *euAG* y parecen haber resultado de una duplicación reciente en *Medicago truncatula*. La presencia de estos dos genes parálogos, homólogos a *AG/FAR*, dentro del linaje *euAG* se ha observado también en leguminosas como *Pisum sativum* (Berbel, A. y colaboradores, comunicación personal) y *Lotus japonicus* (Dong *et al.*, 2005), de ahí el interés de realizar un estudio extensivo a estos dos genes, los cuales se describen y discuten detalladamente en el capítulo II de esta Tesis Doctoral.

El tercer clon aislado, *MtSHP*, se agrupa con genes pertenecientes al linaje *PLE* (*PLENA*). Este linaje está representado por *SHATTERPROOF1* (*SHP1*; Ma *et al.*, 1991; Flanagan *et al.*, 1996) y *SHATTERPROOF2* (*SHP2*; Ma *et al.*, 1991; Savidge *et al.*, 1995) de *Arabidopsis thaliana* y *PLENA* (*PLE*; Bradley *et al.*, 1993) de *Antirrhinum majus*. Además, incluye genes homólogos a *SHP1/2* y *PLE* de otras especies modelo como *Petunia x hybrida* (*FBP6*; Angenent *et al.*, 1993), *Vitis vinifera* (*VvMADS1*; Boss *et al.*, 2001), *Rosa rugosa* (*MASAKOD1*; Kitahara *et al.*, 2000), *Malus x domestica* (*MdMADS14*; Van der Linden *et al.*, 2002) o *Prunus persica* (*PPERSHP*; Tani *et al.*, 2007). Puede observarse que *MtSHP* es filogenéticamente cercano a ortólogos de *SHP1/2* en leguminosas, como *PsMADS8* (Hecht *et al.*, 2005) de *Pisum sativum*, *GmAGL1L* (Hu *et al.*, unpublished) de *Glycine max* y *LjAGL1* (Dong *et al.*, 2005) de *Lotus japonicus*.

### 1.5.2 Análisis de secuencia de *MtSHP*

El clon 14.4.1, llamado *MtSHP*, tiene una longitud de 1027 pb y contiene una región 5' no traducida de 38 pb, una pauta de lectura abierta de 732 pb, que codifica una proteína de 244 aminoácidos, un codón de parada de traducción TGA y una región 3' no traducida de 254 pb. La proteína deducida *MtSHP* tiene un peso molecular de 28,12 kDa y un PI teórico de 9,67. La secuencia de nucleótidos de *MtSHP* y su traducción en aminoácidos se muestra en la Figura 39.

La comparación de esta secuencia con las incluidas en la base de datos "TIGR Plant Transcript Assemblies" (<http://plantta.icvi.org/>) resultó en un dato que corresponde a un marcador de secuencia expresada con número de referencia TA24477\_3880, denominado "*Medicago truncatula* MADS-box protein M8", del que difiere en una sola

base. Este marcador de secuencia expresada o EST está representado en la base de datos UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) bajo el código Mtr.14585, descrito como “Transcribed locus, moderately similar to NP\_191437.1 *SHP1* (*SHATTERPROOF1*); DNA binding / transcription factor (*Arabidopsis thaliana*)”. Según la nomenclatura de la base de datos UniGene, el término “moderately similar” se refiere a porcentajes de homología entre 70 y 90%.

```

1                               M E L P N E G G      8
3 TCTTTACACCAAACAACACTACATAAGCTTTGCAAAAATATGGAGCTACCAAATGAAGGTGGA 62

9   E G S S Q K K M G R G K I E I K R I E N      28
63 GAAGGATCTTCTCAAAGAAAATGGGAAGAGGAAAAATTGAAATCAAGAGGATTGAAAAC 122

29  T T N R Q V T F C K R R N G L L K K A Y      48
123 ACTACCAATAGGCAAGTCACTTTTTGCAAACGACGCAATGGATTGTTGAAGAAAGCTTAT 182

49  E L S V L C D A E V A L V V F S T R G R      68
183 GAATTATCCGTTCTTTGTGATGCCGAAGTTGCTCTTGTGTCTTCTCCACTCGCGGTCTCGT 242

69  L Y E Y A N N S V R A T I E R Y K K A C      88
243 TTGTATGAGTATGCCAACAACAGTGTTAGAGCAACTATTGAAAGGTACAAAAAAGCATGT 302

89  A A S T N A E S V S E A N T Q F Y Q Q E      108
303 GCTGCTTCCACTAACGCAGAATCTGTATCTGAAGCTAATACCCAGTTTTACCAGCAAGAA 362

109 S S K L R R Q I R D I Q N L N R H I L G      128
363 TCATCCAAATTGAGAAGACAGATTCGAGATATTCAGAATCTAAATAGACACATCCTTGGT 422

129 E A L G S L S L K E L K N L E G R L E K      148
423 GAAGCTCTAGGATCTCTAAGTCTCAAAGAACTGAAGAATCTTGAGGGTAGATTGGAGAAA 482

149 G L S R V R S R K H E T L F A D V E F M      168
483 GGTTTAAGCAGAGTTAGATCTAGAAAGCATGAGACTTTGTTTGCTGATGTGGAGTTCATG 542

169 Q K R E I E L Q N H N N Y L R A K I A E      188
543 CAAAAGCGGAAATTGAGCTGCAAAACCATAACAATTATCTACGGGCTAAGATAGCGGAA 602

189 H E R A Q Q Q Q H N L M P D Q T M C D Q      208
603 CATGAGAGAGCTCAACAACAGCAACATAATTTGATGCCAGATCAAACAATGTGTGATCAG 662

209 S L P S S Q A Y D R N F F P V N L L G S      228
663 TCCTTACCTTCATCACAAGCATATGACCGAAATTTCTTTCCGGTAAATCTTCTTGATCA 722

229 D Q Q Q Y S R Q D Q T A L Q L V *           244
723 GATCAGCAGCAGTATTCGCGTCAAGACCAAACCTGCGCTCCAACCTGTGTGATCATATATA 782
783 TGCTGGAAAAGGCATGGACGTTGTGCAACAGTCCCTGAAACCGTTTATTAATCTACTTGAA 842
843 TAGTTGCATGAAGTGTGTCTATATAGTAAAGAACCATTATATACATGCCTACTTTTACTA 902
903 ATTAACAATGTCTTTAAGTTAAATTAGGGTCTTCAGACTGTGAAGTGGAAAAGAACCAG 962
963 CATTTCGACCATACCTCATGATAACTATTATCGTATCTTTTAATAAAAAAAAAAAAAA 962
1023 AAAAAA                                     1027
    
```

**Figura 39. Secuencia del clon *MtSHP*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.

Para estudiar las homologías entre *MtSHP* y otros miembros seleccionados del linaje *PLE*, se realizó una comparación de las secuencias de las proteínas predichas para estos genes. En la Tabla 16 se muestran los porcentajes de homología entre *MtSHP* y las

proteínas representativas del linaje *PLE*, como AtSHP1, AtSHP2 (Ma *et al.*, 1991) de *Arabidopsis thaliana* y PLE (Bradley *et al.*, 1993) de *Antirrhinum majus*. También se incluyen las proteínas ortólogas de MtSHP en las leguminosas *Pisum sativum* (PsMADS8; Hecht *et al.*, 2005), *Glycine max* (GmAGL1L; Hu *et al.*, unpublished) y *Lotus japonicus* (LjAGL1; Dong *et al.*, 2005).

**Tabla 16. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de MtSHP y las proteínas representativas del linaje PLE**

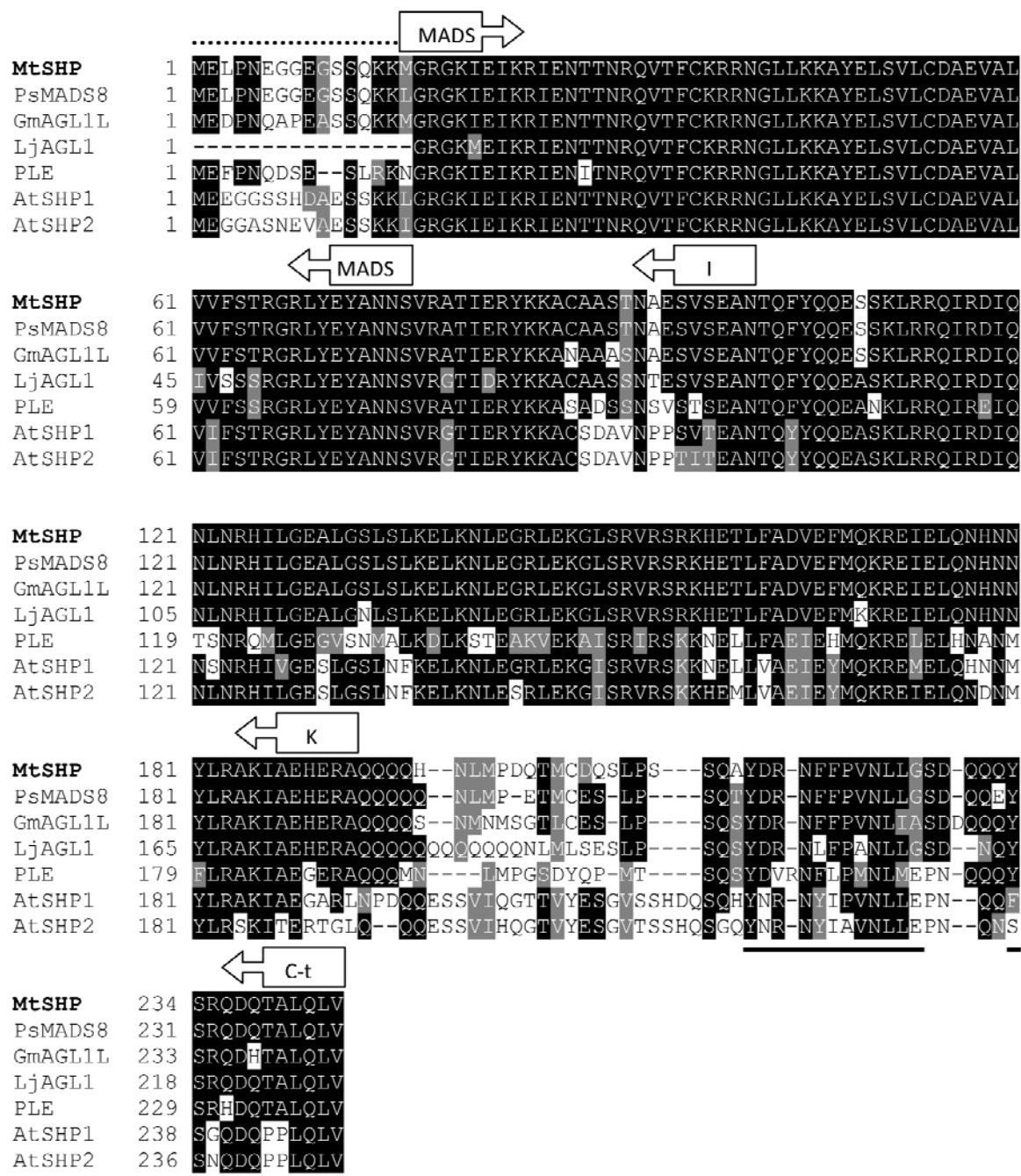
	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>PsMADS8</b>	<b>95</b>	98	100	100	83
<b>GmAGL1L</b>	<b>90</b>	100	88	100	68
<b>LjAGL1</b>	<b>86</b>	93	84	96	61
<b>AtSHP1</b>	<b>71</b>	96	68	75	46
<b>AtSHP2</b>	<b>65</b>	96	60	76	42
<b>PLE</b>	<b>67</b>	95	76	62	59

Ps: *Pisum sativum*; Lj: *Lotus japonicus*; Gm: *Glycine max*; At: *Arabidopsis thaliana*; PLE: PLENA de *Antirrhinum majus*

La homología más alta de MtSHP es con proteínas de leguminosas: la proteína PsMADS8 (Hecht *et al.*, 2005) de *Pisum sativum*, seguida por una proteína aún no caracterizada de *Glycine max* (GmAGL1L, Hu *et al.*, unpublished) y posteriormente la ortóloga de SHP1/2 de *Lotus japonicus* (LjAGL1, Dong *et al.*, 2005). Puede observarse que MtSHP conserva una homología de 65 – 71% con sus ortólogos en *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus*. Los porcentajes de homología de MtSHP con las otras dos proteínas del grupo AG aisladas en *Medicago truncatula* (MtAGa y MtAGb) son de 63% y 60% al considerar la secuencia completa y únicamente de 26% y 37%, respectivamente, considerando la región C-terminal.

En la Figura 40 se representa el alineamiento entre MtSHP y las proteínas incluidas en la Tabla 16. Puede verse que todas ellas conservan en el extremo C-terminal residuos de dos motivos cortos altamente conservados en las proteínas del grupo AG, que han sido descritos por Kramer *et al.* (2004) y se denominan “AG motif I” y “AG motif II”. Otra característica común a los genes MADS-box del linaje “C” y que se observa en la Figura 40 es la presencia de una secuencia en la región N-terminal que precede al dominio MADS (Jager *et al.*, 2003). La ausencia de esta secuencia en *LjAGL1* puede deberse a que el gen la haya perdido durante el proceso evolutivo [como en el caso del ortólogo de

*SHP1/2* de vid, *VvMADS1* (Boss *et al.*, 2001)] o que se haya omitido al incluir la secuencia en la base de datos, considerando el inicio del gen en el dominio MADS.

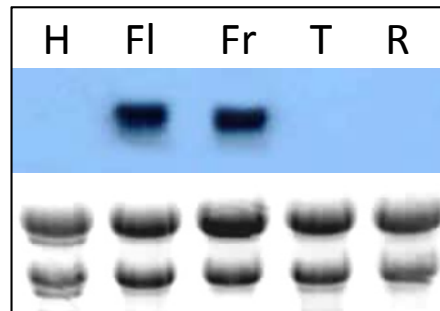


**Figura 40.** Alineamiento de la secuencia proteica de *MtSHP* y de genes MADS-box del linaje *PLE*, grupo *AG*, con los que presenta homología. Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios MADS y K así como las regiones I y C-terminal se señalan con flechas. El motivo “AG motif I” se subraya con una línea continua y el motivo “AG motif II” con una línea discontinua. Una línea de puntos indica la secuencia N-terminal previa al dominio MADS característica de los genes de tipo “C”.

### 1.5.3 Patrón de expresión de *MtSHP*

El patrón de expresión de *MtSHP* en plantas silvestres de *Medicago truncatula* se analizó mediante hibridación *Northern blot* en varios tejidos de la planta (Figura 41).

Para evitar la hibridación cruzada con otros genes MADS-box, se utilizó la región C-terminal del cDNA de *MtSHP* como sonda. La expresión de *MtSHP* no se detecta en hoja, tallo ni raíz. La expresión es específica de flores y frutos.

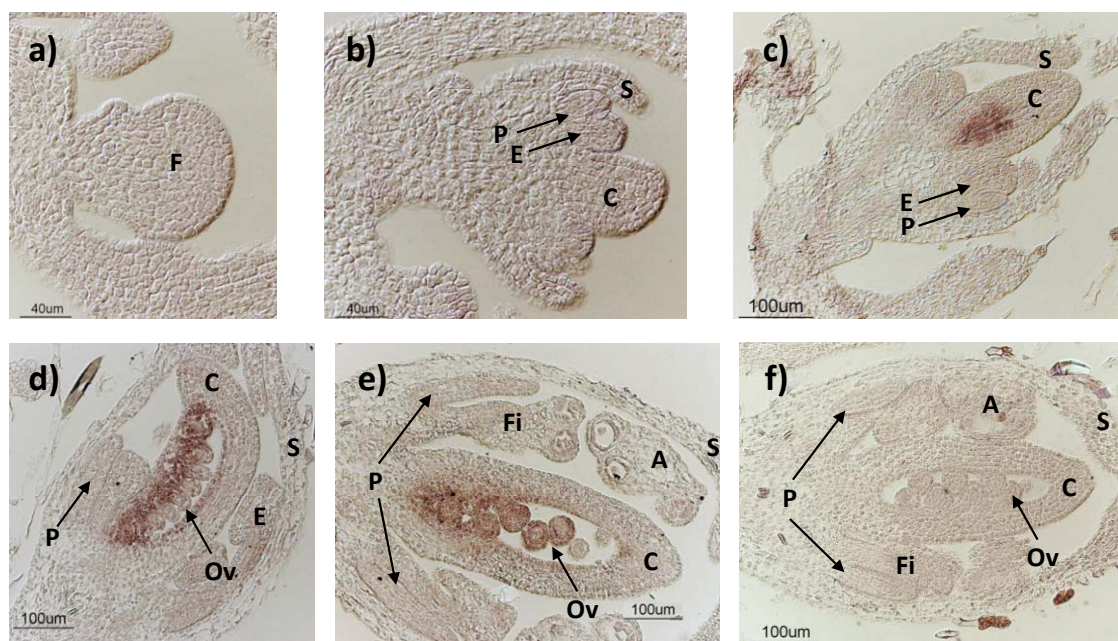


**Figura 41. Análisis del patrón de expresión de *MtSHP* mediante *Northern blot*.** Se utilizó RNA de diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R).

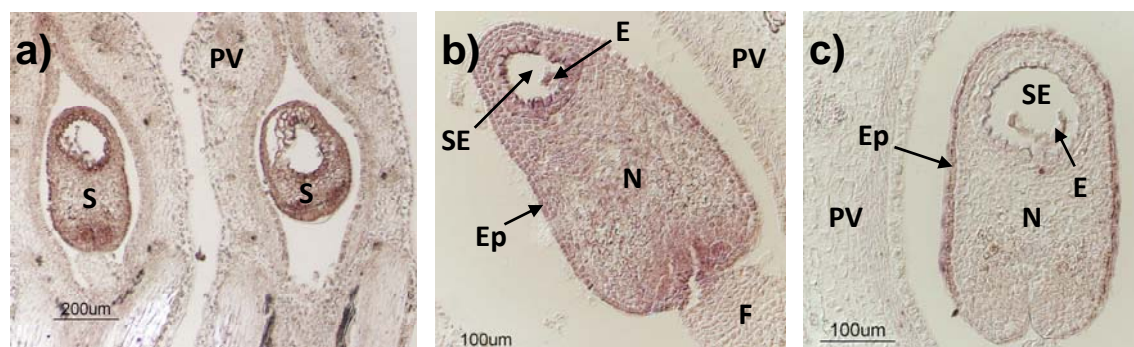
El análisis del patrón de expresión tisular de *MtSHP* durante el desarrollo floral se llevó a cabo mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de plantas silvestres de *Medicago truncatula* (Figura 42). Durante los primeros 5 estadios del desarrollo floral no se observa expresión de *MtSHP* (Figura 42, a y b). La expresión del gen se empieza a observar desde el estadio 6 del desarrollo floral, cuando los primordios comunes ya se han diferenciado en primordios de pétalo y estambre, limitándose a las paredes internas del carpelo (Figura 42, c). La expresión de *MtSHP* se mantiene hasta el final del desarrollo de la flor. Se observa durante el estadio 7 inicialmente en la base de los óvulos y en el carpelo en la región de la placenta cercana a la sutura ventral del carpelo (Figura 42, d). Posteriormente, en el estadio 7 tardío, la expresión es intensa en los óvulos de la flor totalmente desarrollada (Figura 42, e). No se detectó señal de hibridación en ninguna sección de tejido hibridada con la sonda “sentido” (Figura 42, f).

Para ver si el transcrito *MtSHP* se mantiene en las semillas que se desarrollan a partir de los óvulos que expresan el gen, se realizaron hibridaciones *in situ* en frutos de *Medicago truncatula* en estadio de desarrollo “Pod age: 6 DPP (días post-polinización)” (Wang y Grusak, 2005). En la Figura 43 se muestra un corte longitudinal paralelo al eje de enrollado del fruto, en el que puede verse expresión intensa de *MtSHP* en toda la extensión de la semilla (Figura 43, a). Al ampliar la imagen puede observarse que la expresión es más intensa en la región de la nucela cercana al funículo (Figura 43, b). No se detectó señal de hibridación en secciones de semilla hibridadas con la sonda “sentido” usada como control negativo (Figura 43, c).





**Figura 42. Análisis del patrón de expresión de *MtSHP* mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*.** a) Expresión ausente en el meristemo floral en estadio de desarrollo 2. b) Ausencia de expresión en el estadio 5. c) Expresión en las paredes internas del carpelo en el estadio 6. d) Expresión en óvulos y región placentaria adyacente a la sutura carpelar en el estadio 7 temprano del desarrollo floral. e) Expresión limitada a óvulos en el estadio 7 tardío. f) Hibridación *in situ* con la sonda "sentido". F, Meristemo floral; Sépalo; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo; Fi, Filamento; A, Antera; Ov, Óvulo.



**Figura 43. Análisis del patrón de expresión de *MtSHP* en frutos.** Patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en corte longitudinal del fruto y la semilla de *Medicago truncatula* a). Se distinguen las semillas y el tejido de la vaina. b) Semilla. *MtSHP* se expresa en todo el tejido nucelar. c) Hibridación *in situ* con la sonda "sentido". PV, Pared de la vaina; S, Semilla; N, Nucela; SE, Saco embrionario; E, Endospermo; Ep, Epidermis; F, Funículo.

*MtSHP* es un gen específico de carpelo y óvulos, cuyo patrón de expresión es consistente con los patrones observados para los genes *SHATTERPROOF* (Ma *et al.*, 1991; Flanagan *et al.*, 1996) de *Arabidopsis thaliana* y sus ortólogos en otras plantas.

## 1.6 *MtTM6* Y *MtNMH7*: GENES CON HOMOLOGÍA A GENES MADS-box DEL GRUPO *DEF (AP3)*

### 1.6.1 Aislamiento y análisis de secuencia de *MtTM6* y *MtNMH7*

Los genes MADS-box de clase B se agrupan en dos linajes o grupos distintos, llamados *APETALA3/DEFICIENS (AP3/DEF)* y *PISTILLATA/GLOBOSA (PI/GLO)* (Theissen *et al.*, 1996). Se cree que los genes de los linajes *AP3/DEF* y *PI/GLO* son parálogos que se originaron a partir de un evento de duplicación que tuvo lugar antes del origen de las angiospermas (Kramer *et al.*, 1998; Theissen *et al.*, 2000). Además, los genes del linaje *AP3/DEF* en las eudicotiledóneas superiores se han dividido en dos sub-linajes: el linaje “*euAP3*” y el linaje “*TM6*” (Kramer *et al.*, 1998; Kramer e Irish, 2000).

Los genes *MtPI* y *MtNGL9*, ortólogos de *PISTILLATA* en *Medicago truncatula*, pertenecen al linaje *PI/GLO* y fueron aislados y caracterizados previamente en el laboratorio por Benlloch *et al.* (2009).

En el presente escrutinio de la genoteca se aislaron dos clones cuyas secuencias presentan homología con genes MADS-box de clase B del linaje *AP3/DEF*, perteneciendo además a sub-linajes diferentes dentro de este grupo. Dichos clones, el 6.2.1 y el 8.1.1, se denominaron *MtTM6* y *MtNMH7*.

El clon 6.2.1, llamado *MtTM6*, tiene una longitud de 1082 pb, una región 5’ no traducida de 89 pb, una pauta de lectura abierta de 696 pb, que codifica una proteína de 232 aminoácidos, un codón de parada de traducción TGA y una región 3’ no traducida de 294 pb. La proteína deducida *MtTM6* tiene un peso molecular calculado de 27,07 kDa y un PI teórico de 9,68. La secuencia de nucleótidos de *MtTM6* y su traducción en aminoácidos se presentan en la Figura 44.

En la Figura 45 se muestra la secuencia del clon 8.1.1 con la secuencia aminoacídica predicha para la proteína *MtNMH7*. La longitud completa del clon es de 1030 pb y contiene una pauta de lectura abierta de 687 pb que codifica una proteína de 229 pb con un peso molecular predicho de 26,61 y un punto isoeléctrico teórico de 9,68. La región 5’ no traducida tiene una longitud de 83 pb y la 3’ no traducida 257 pb.

En ambas secuencias se puede observar la presencia de cuatro residuos de aminoácidos dentro del dominio MADS, característicos para el linaje *AP3/DEF*: fenilalanina (F) en la posición 29, treonina (T) en la 36, lisina (K) en la 42 y metionina (M)

en la 47. Además hay una leucina (L) en la posición 35, que es un residuo aminoacídico que distingue a las proteínas del linaje AP3/DEF de las del linaje PI/GLO (Theissen *et al.*, 1996). En el caso de MtTM6, la treonina de la posición 36 se suple por una serina (S) al modificarse una base, pero ambos aminoácidos son alifáticos de carácter hidrófilo, así que probablemente la función de la proteína no se modifica. También puede observarse la presencia de una secuencia consenso (H/Q)YExM, altamente conservada en las proteínas del linaje AP3/DEF (Kramer *et al.*, 1998)

```

3  ATTTTGGACCCCGAAAGAGAGAAAAAAGTGAAGTGAAGTTATAGAACAAGTACACTAAA 62
1
63  GTATTGTAGTAGTGAAGATCATTGAAAATGGGTCGTGGGAAGATTGAGATAAAGTTGATT 112
      M G R G K I E I K L I
12  E N P T N R Q V T Y S K R R N G I F K K 31
123  GAGAATCCTACTAACAGGCAAGTGACATACTCAAAGAGAAGGAATGGTATATTCAAGAAA 182
      ▼
32  A H E L S V L C D A K V S L I M F S K N 51
183  GCACATGAACTTAGTGTCTTTTGTGATGCTAAGGTTTCACTCATCATGTTCTCCAAAAAT 242
      ▼
52  N K M H E Y I T P G L S T K K I I D Q Y 71
243  AACAAAGATGCATGAATACATCACCCCTGGTCTCTCTACAAAGAAGATTATTGATCAGTAT 302
72  Q K T L G D I D L W R S H Y E K M L E N 91
303  CAGAAGACTTTAGGGGATATAGATCTGTGGCGTTCTCACTATGAGAAAATGCTTGAAAAC 362
92  L K K L K D I N H K L R R Q I R H R I G 111
363  TTGAAGAAACTGAAAGATATTAACCATAAGCTTAGAAGACAGATCAGGCATAGAATAGGT 422
112  E G G M E L D D L S F Q Q L R S L E E D 131
423  GAGGGTGGTATGGAATTGGATGACCTTAGCTTCCAGCAACTGCGTAGTCTTGAAGAGGAT 482
132  M N S S I A K I R E R K F H V I K T R T 151
483  ATGAATCTTCCATTGCAAAAATACGTGAAAGGAAGTTTCATGTGATCAAAAATCGGACT 542
152  D T C R K K V R S L E Q M N G N L L L E 171
543  GATACCTGTAGGAAAAAGGTTAGAAGCTTGGAGCAGATGAATGGAAATCTCTTGCTTGAA 602
172  L K E K C V I H P Q F L F H D E G D E E 191
603  CTTAAGGAAAAATGTGTGATCCATCCACAATTTCTTTTCCACGACGAAGGAGACGAGGAA 662
192  S A V A L A N G A S T L Y A F C Q H H S 211
663  TCAGCAGTTGCATTGGCCAATGGTGCTTCCACTCTGTATGCATTCTGTCAGCACCATTCT 722
212  H L N L P H H H G E E G Y K N D D L R L 231
723  CATCTGAATCTTCCATCACCATGGAGAAGAAGGTTACAAAAATGACGATTTGCGCCTT 782
232  G * 232
783  GGTGAGCAACTGAATTAATGGAACCAATGTCATGTTAAATTTGCTTGAATTAGACATTG 842
843  TAAATTAATTAAGCAGCTAGCTAGCACTTGTAAAGTTGTTATTTGAGCTTAAATTAGTTT 902
903  GTAATATCACATTAACCTAAAGTTGGTTCCATACTCTCCATCTAGGTAGAGAATTAGCA 962
963  AGCTAGCTTATGATGTTTTATTTGCAAGAAGTGTGGTCTGAAAAACAAAATATGACTGTA 1022
1023  TTTTATTATCTATAAGTTTATATGTTGGTGAGTATGTTATATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1082

```

**Figura 44. Secuencia del clon MtTM6.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Con puntas de flecha negras se indican los aminoácidos característicos para el grupo AP3/DEF. Con punta de flecha gris se indica el aminoácido lisina (L) que distingue a las proteínas AP3/DEF de las PI/GLO. En un recuadro se indica la posición de la secuencia consenso (H/Q)YExM característica del grupo AP3/DEF.



3	AAGCCCCATAAATCAAACATAGTAAACTTGAAGAAAAAAAAACAACCAGGTGAAGAAAT	62
1	<b>M A R G K I Q I K R I E N</b>	13
63	ATATAGCTAGGTAGGTTATCTATGGCTCGAGGAAAGATCCAGATCAAGAGAATTGAGAAC	122
14	<b>T T N R Q V T Y S K R R N G L F K K A N</b>	33
123	ACAACTAACCGACAAGTAACTTACTCAAACGAAGGAATGGTCTTTTCAAGAAGGCTAAT	182
34	<b>E L T V L C D A K V S I I M F S S T G K</b>	53
183	GAGCTCACTGTTCTTTGTGATGCTAAGGTTTCTATTATTATGTTTTCCAGCACTGGCAAG	242
54	<b>L H E Y I S P S A S T K Q F F D Q Y Q M</b>	73
243	CTTCATGAATACATTAGCCCCCTCCGCCTCAACAAAGCAGTTTTTTCGATCAGTATCAGATG	302
74	<b>T V G I D L W N S H Y E N M Q E N L K K</b>	93
303	ACTGTAGGAATTGATCTGTGGAAGTCTCATTATGAGAATATGCAAGAGAACTTGAAGAAA	362
94	<b>L K D V N R N L R K E I R Q R M G E C L</b>	113
363	CTGAAAGATGTCAATAGGAATCTTCGCAAGGAGATTAGGCAGAGGATGGGGGAATGTCTG	422
114	<b>N D L S M E E L R L L E D E M D K A A K</b>	133
423	AATGATCTGAGCATGGAAGAGCTGAGGCTACTTGAAGATGAAATGGACAAGGCTGCCAAG	482
134	<b>A I R E R K Y K V I T N Q I D T Q R K K</b>	153
483	GCTATTCGTGAGCGTAAGTATAAGGTGATAACAAATCAGATTGACACCCAAAGGAAGAAG	542
154	<b>F N N E R E V H N R L L R D L D A R A E</b>	173
543	TTTAATAATGAGAGAGAGGTGCACAACAGACTCCTGCCTGACTTGGATGCAAGAGCAGAA	602
174	<b>D P R F E M M D N G G E Y E S V I G F S</b>	193
603	GATCCACGTTTTGAAATGATGGACAATGGAGGGGAGTATGAGTCTGTGATTGGATTCTCA	662
194	<b>N L G P R M F A L S L Q P T H P N P H N</b>	213
663	AATTTAGGTCCACGCATGTTTGCTTTGAGCTTACAGCCTACTCATCCTAATCCTCATAAT	722
214	<b>G G A S A A S D L T T Y P L L F *</b>	229
723	GGAGGAGCATCAGCTGCCTCGGATCTCACCACCTTACCCTTTACTTTTTTAGTTACTTTTC	782
783	TCTCAGAACAACAAATACTCCCACAATCACTTTCCAACAATAATATGATACTATGACTCA	842
843	CGTACTGTTTAAGATATATATGGCTATGCACTCAATCTCATTCTGTTTTTCAGTTAATTGT	902
903	ATGTATCTTTATATAAACATGATCATCTTAAATATCTTCGATCAAATGCATGTAATGTA	962
963	ATGTATGATTTAAATCATAACTGATCATTAAATGTTAACCGTACTCCAAAAAAAAAAAAA	1022
1023	AAAAAAA	1030

**Figura 45. Secuencia del clon *MtNMH7*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. Con puntas de flecha negras se indican los aminoácidos característicos para el grupo AP3/DEF. Con punta de flecha gris se indica el aminoácido lisina (L) que distingue a las proteínas AP3/DEF de las PI/GLO. En un recuadro se indica la posición de la secuencia consenso (H/Q)YExM característica del grupo AP3/DEF.

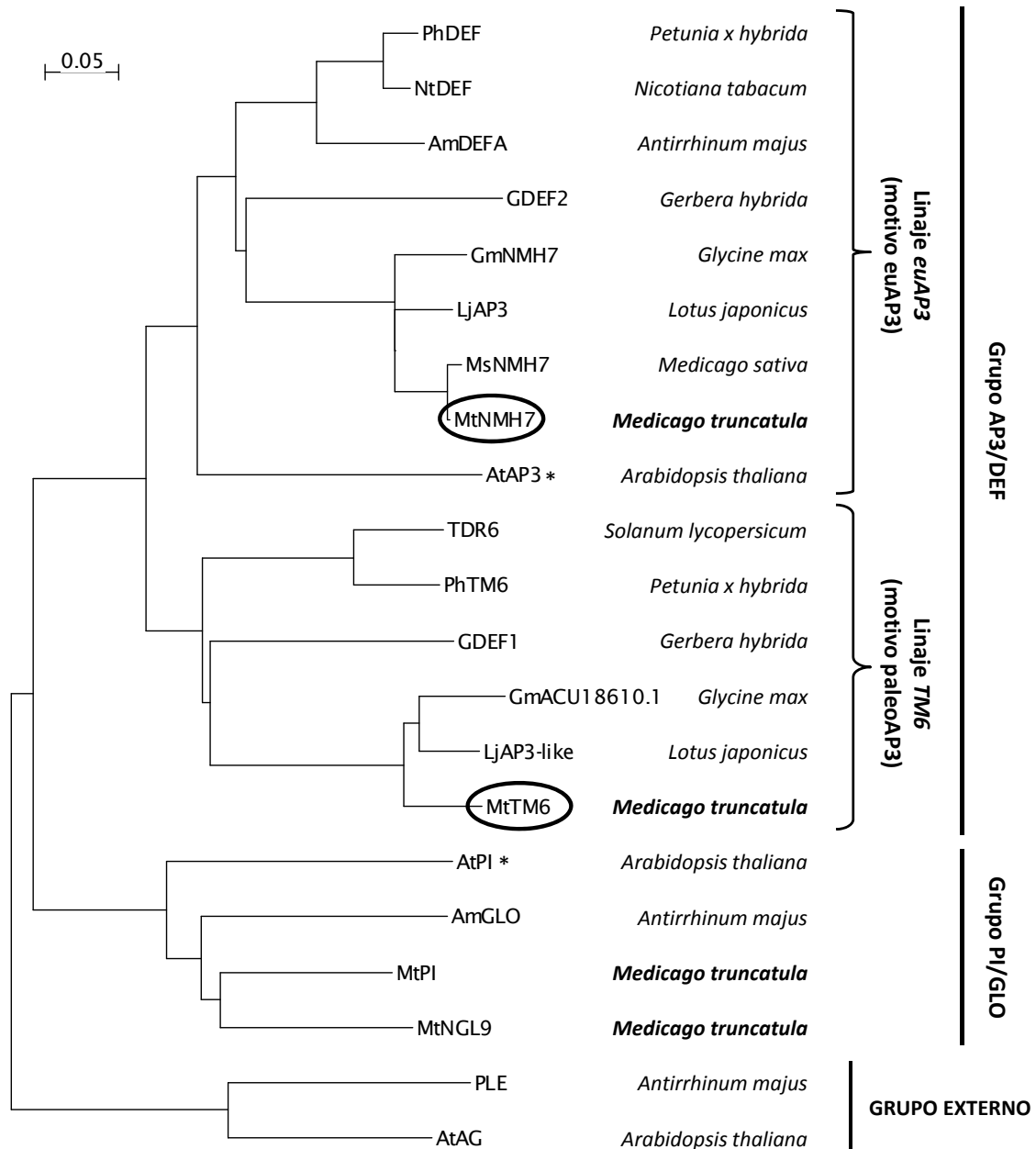
Se realizó una comparación de las secuencias de *MtTM6* y *MtNMH7* con las secuencias incluidas en las bases de datos mediante BLAST. El gen *MtTM6* se deduce del clon genómico de *Medicago truncatula* mth2-17d19 (“complete sequence” GenBank AC136451.9). El gen está formado por 7 exones (188, 70, 62, 109, 42, 45, 183) y 6 intrones. La secuencia genómica de *MtTM6* está contenida entre las bases 59.035 y 60.803 del clon mencionado.

No se ha encontrado ninguna secuencia homóloga a *MtNMH7* en las bases de datos de *Medicago truncatula* disponibles hasta el momento.

Para colocar las secuencias obtenidas en un contexto filogenético, se construyó un árbol con las secuencias aminoacídicas predichas para *MtTM6* y *MtNMH7* y proteínas MADS-box de diversas especies codificadas por genes de clase B. Este árbol se muestra en la Figura 46.

Puede observarse que efectivamente las proteínas MADS-box de clase B se distribuyen en dos linajes o grupos, el AP3/DEF y el PI/GLO (Theissen *et al.*, 1996). Dentro de la rama que conforman las proteínas del grupo PI/GLO se encuentran MtPI y MtNGL9 de *Medicago truncatula*, así como las proteínas representativas de este grupo en las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* (AtPI; Goto y Meyerowitz, 1994) y *Antirrhinum majus* (AmGLO; Tröbner *et al.*, 1992).

Dentro del grupo AP3/DEF puede verse la división en dos ramas o sub-linajes: el linaje *euAP3* y el linaje *TM6*. La proteína MtTM6 es filogenéticamente cercana a proteínas ortólogas del linaje *TM6* en leguminosas, como LjAP3-like (Dong *et al.*, 2005) de *Lotus japonicus* y GmACU18610.1 (Cheung *et al.*, unpublished) de *Glycine max*. En esta rama también se incluyen proteínas de otras plantas modelo como TDR6 (antes *TM6*; Pnueli *et al.*, 1991) de *Solanum lycopersicum*, PhTM6 (Vandenbussche *et al.*, 2004) de *Petunia x hybrida* o GDEF1 (Yu *et al.*, 1999) de *Gerbera hybrida*. Cabe mencionar que no se han descrito genes del linaje *TM6* en las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus*. Por otro lado, MtNMH7 se localiza en la rama que incluye proteínas del linaje *euAP3*. En las plantas modelo, este linaje está representado por AtAP3 (Bowman *et al.*, 1989) en *Arabidopsis thaliana* y AmDEFA (Sommer *et al.*, 1990) en *Antirrhinum majus*. Además, incluye proteínas homólogas a AP3/DEF del linaje *euAP3* de *Petunia x hybrida* (PhDEF; Vandenbussche *et al.*, 2003b), *Nicotiana tabacum* (NtDEF; Davies *et al.*, 1996) o *Gerbera hybrida* (GDEF2; Yu *et al.*, 1999). MtNMH7 se agrupa con proteínas ortólogas del linaje *euAP3* en leguminosas, como LjAP3 (Dong *et al.*, 2005) de *Lotus japonicus* y GmNMH7 (Wu *et al.*, 2006) de *Glycine max*. Su relación filogenética más estrecha es con MsNMH7 (Heard y Dunn, 1995) de la especie cercana *Medicago sativa*.



**Figura 46. Árbol filogenético de las secuencias proteicas predichas para genes de clase B.** Se utilizó la secuencia proteica íntegra de las siguientes proteínas: *Arabidopsis thaliana*: AtAP3 (Bowman *et al.*, 1989; Acc NP\_191002.1), AtPI (Goto y Meyerowitz, 1994; Acc NP\_197524.1); *Antirrhinum majus*: AmDEFA (Sommer *et al.*, 1990; Acc CAA36268.1), AmGLO (Tröbner *et al.*, 1992; Acc CAA48725.1); *Petunia x hybrida*: PhDEF (Vandenbussche *et al.*, 2003b; Acc AAQ72510.2), PhTM6 (Vandenbussche *et al.*, 2004; Acc AAS46017.1); *Gerbera hybrida*: GDEF1, GDEF2 (Yu *et al.*, 1999; Acc CAA08802.1, CAA08803.1); *Glycine max*: GmNMH7 (Wu *et al.*, 2006; Acc AAQ81636.1), GmACU18610.1 (Cheung *et al.*, unpublished; Acc ACU18610.1); *Lotus japonicus*: LjAP3, LjAP3-like (Dong *et al.*, 2005; Acc AAX13301.1, AAX13302.1); *Solanum lycopersicum*: TDR6 (Pnueli *et al.*, 1991; Acc CAA43171.1); *Nicotiana tabacum*: NtDEF (Davies *et al.*, 1996; Acc CAA65288.1); *Medicago sativa*: MsNMH7 (Heard y Dunn, 1995; Acc AAC15419.1); *Medicago truncatula*: MtPI, MtNGL9 (Benlloch *et al.*, 2009 Acc ACJ36228.1, ACJ36229.1), MtTM6, MtNMH7 (este trabajo). Las proteínas MtTM6 y MtNMH7 se encierran en óvalos y las proteínas del grupo AP3 de *Arabidopsis thaliana* se señalan con un asterisco. El árbol se enraizó con PLE de *Antirrhinum majus* (Acc AAB25101.1) y AtAG de *Arabidopsis thaliana* (Acc NP\_567569.3).

La proteínas MtTM6 y MtNMH7 presentan una homología del 48% al comparar las secuencias aminoacídicas completas. Tienen un 77% de homología en la región correspondiente a la caja MADS, 68% en la región I, 47% en la región de la caja K y únicamente 12% en la región C-terminal.

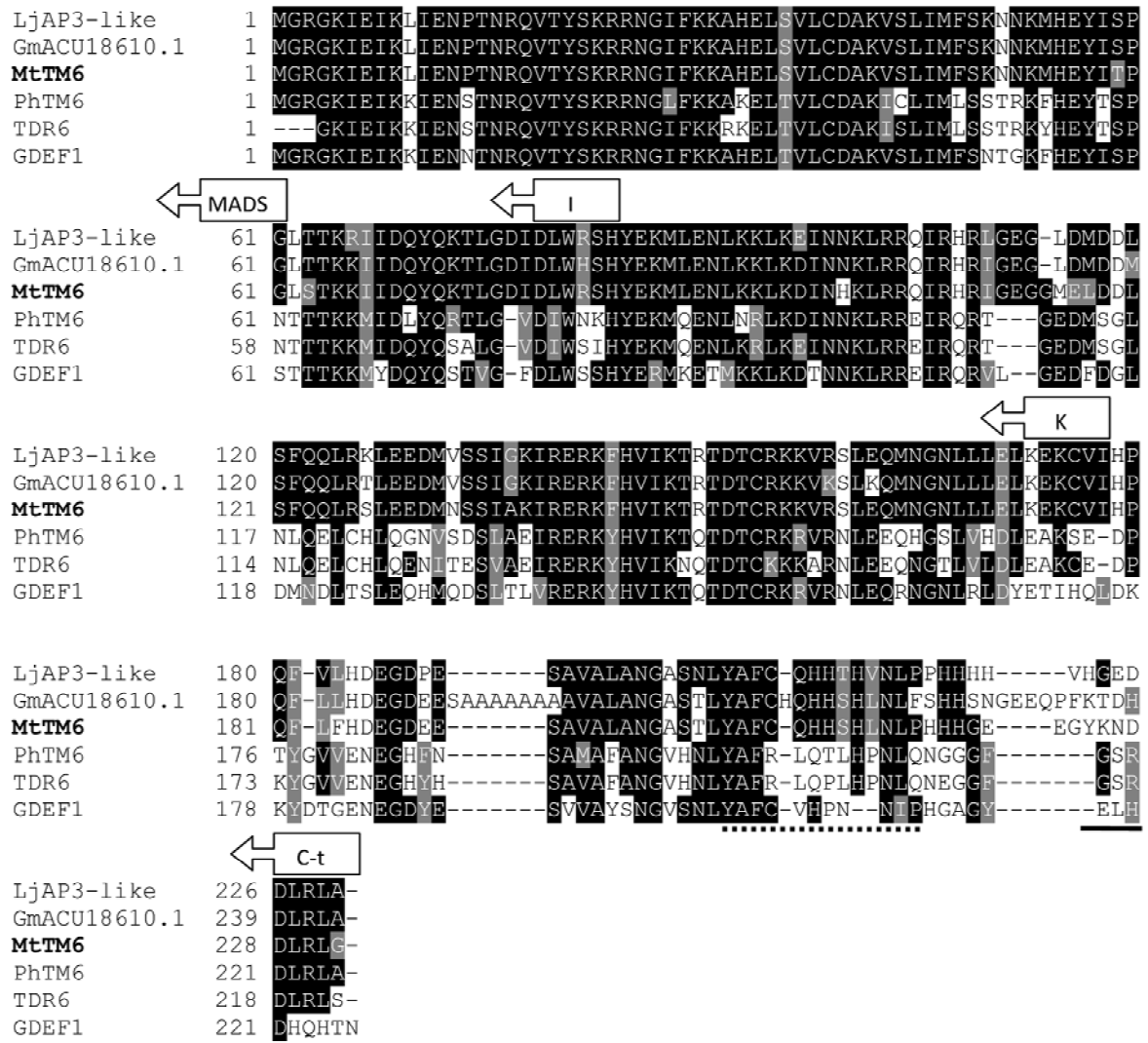
En la Tabla 17 se muestran los porcentajes de homología para todas las proteínas del linaje TM6 incluidas en el árbol filogenético. MtTM6 muestra alta homología con las proteínas del este linaje, entre ellas la representativa del grupo, TDR6 (Pnueli *et al.*, 1991) de *Solanum lycopersicum*. Por homología de secuencia, las proteínas más próximas a MtTM6 son de leguminosas: GmACU18610.1 (Cheung *et al.*, unpublished) de *Glycine max* y LjAP3-like (Dong *et al.*, 2005) de *Lotus japonicus*.

**Tabla 17. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de MtTM6 y proteínas representativas del linaje TM6**

	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>GmACU18610.1</b>	<b>87</b>	98	91	89	70
<b>LjAP3-like</b>	<b>86</b>	98	91	90	64
<b>TDR6</b>	<b>59</b>	75	59	58	41
<b>GDEF1</b>	<b>58</b>	85	63	55	31
<b>PhTM6</b>	<b>57</b>	75	59	56	37

Gm: *Glycine max*; Lj: *Lotus japonicus*; TDR6: Antes TM6, de *Solanum lycopersicum*; G: *Gerbera hybrida*; Ph: *Petunia x hybrida*

En la Figura 47 se representa un alineamiento múltiple entre MtTM6 y las proteínas arriba mencionadas. En el alineamiento se puede ver en la región C-terminal la presencia de la secuencia consenso característica del linaje TM6, YGxHDLRLA, llamada motivo paleoAP3 (Kramer *et al.*, 1998). También puede verse la localización del motivo “PI-derived”. Este motivo se localiza en las proteínas AP3/DEF en la misma posición que el bien conservado motivo “PI” (MPFxFRVQPxQPNLQE) en las proteínas del linaje PI/GLO. Sin embargo, la secuencia del motivo “PI-derived”, cuyo consenso es FxFRLQPSQPNLH, difiere mucho entre las diferentes proteínas del linaje AP3/DEF (Kramer *et al.*, 1998). En el alineamiento puede observarse que el motivo “PI-derived” ha variado en las proteínas del linaje TM6 de leguminosas, siguiendo el mismo patrón de divergencia en todas ellas.



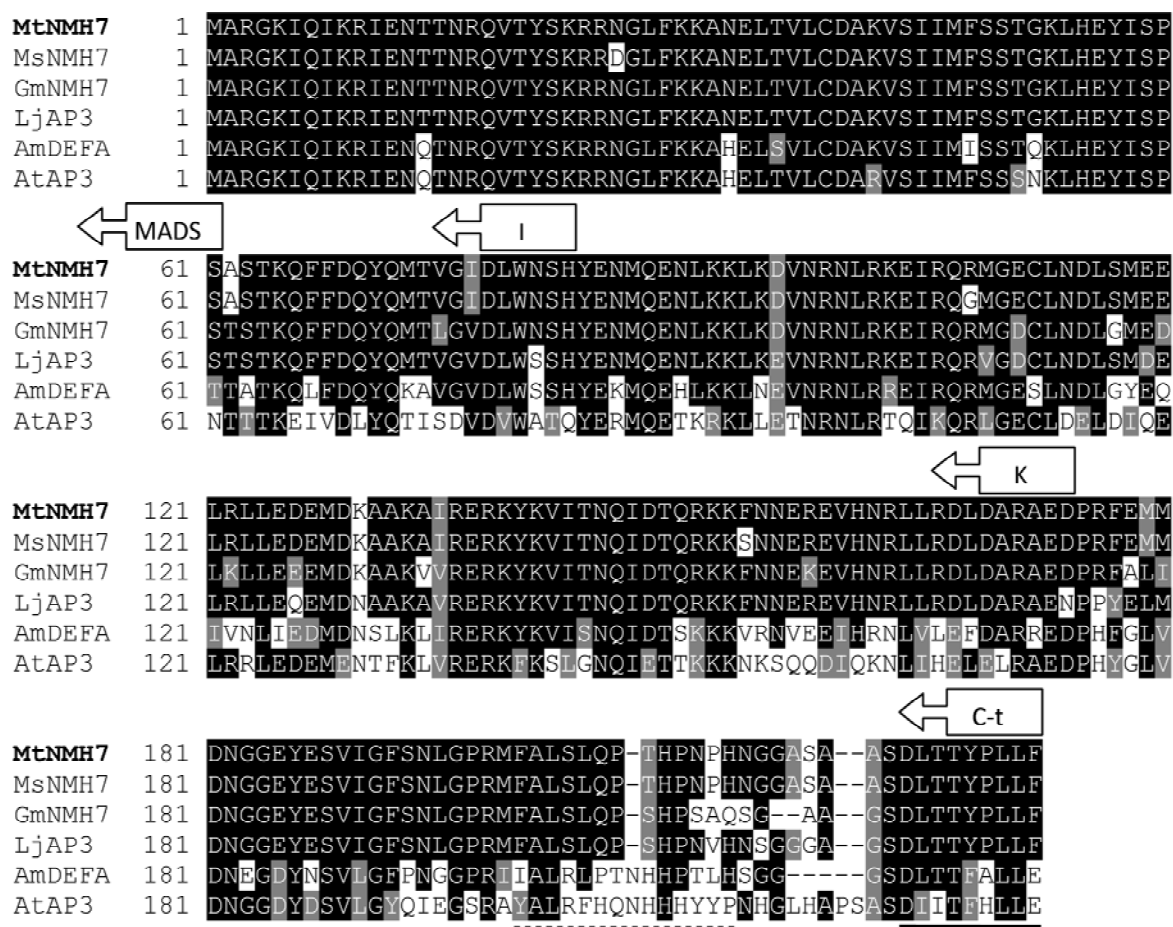
**Figura 47. Alineamiento de la secuencia proteica de *MtTM6* y de genes MADS-box del linaje *TM6*, grupo *AP3*, con los que presenta homología.** Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios MADS y K así como las regiones I y C-terminal se señalan con flechas. El motivo “paleoAP3” se subraya con una línea continua y los residuos del motivo “PI-derived” con una línea discontinua.

Hay alta homología de secuencia entre *MtNMH7* y proteínas de leguminosas pertenecientes al linaje *euAP3*, como *MsNMH7* (Heard y Dunn, 1995) de *Medicago sativa*, *LjAP3* (Dong *et al.*, 2005) de *Lotus japonicus* o *GmNMH7* (Wu *et al.*, 2006) de *Glycine max*. Este linaje está representado en otras plantas modelo por *AtAP3* (Bowman *et al.*, 1989) en *Arabidopsis thaliana* y *DEF* (Sommer *et al.*, 1990) en *Antirrhinum majus*. En la Tabla 18 se muestran los porcentajes de homología entre *MtNMH7* y las proteínas mencionadas. Puede verse una homología del 98% con la proteína *MsNMH7* (Heard y Dunn, 1995) de la especie cercana *Medicago sativa*.

**Tabla 18. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de MtNMH7 y las proteínas con las que presenta mayor homología**

	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>MsNMH7</b>	<b>98</b>	98	100	97	100
<b>LjAP3</b>	<b>91</b>	100	86	91	83
<b>GmNMH7</b>	<b>90</b>	100	86	91	81
<b>AmDEF</b>	<b>67</b>	90	68	62	49
<b>AtAP3</b>	<b>56</b>	90	31	50	40

Ms: *Medicago sativa*; Lj: *Lotus japonicus*; Gm: *Glycine max*; Am: *Antirrhinum majus*; At: *Arabidopsis thaliana*



**Figura 48. Alineamiento de la secuencia proteica de MtNMH7 y de genes MADS-box del linaje euAP3, grupo AP3, con los que presenta homología.** Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios MADS y K así como las regiones I y C-terminal se señalan con flechas. El motivo “euAP3” se subraya con una línea continua y los residuos del motivo “PI-derived” con una línea discontinua.

En la Figura 48 se representa un alineamiento múltiple entre MtNMH7 y las proteínas antes mencionadas. En el alineamiento se puede ver, en la región C-terminal, la

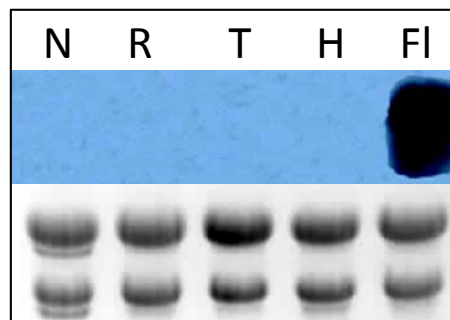
presencia de una secuencia característica del linaje *euAP3*, llamada motivo *euAP3*, cuya secuencia consenso es D(L/I)TTFALLE (Kramer *et al.*, 1998). También puede verse la localización de la secuencia “PI-derived” (Kramer *et al.*, 1998) que ha divergido del mismo modo en todas las proteínas *euAP3* que se muestran de leguminosas.

### 1.6.2 Patrón de expresión de *MtTM6* y *MtNMH7*

Se analizó el patrón de expresión de ambos genes mediante *Northern blot* en diferentes tejidos de la planta (Figuras 49 y 51). La inclusión de nódulos en este estudio se debe a estudios previos que indican la presencia de genes del grupo *AP3* en tejido nodular de otras leguminosas como *Glycine max* (Wu *et al.*, 2006) o *Medicago sativa* (Heard y Dunn, 1995). Se usó la región C-terminal del cDNA de cada gen como sonda, a fin de evitar hibridación cruzada. El análisis de la expresión tisular de los genes se realizó mediante hibridación *in situ* en ápices florales de *Medicago truncatula* (Figuras 50 y 52), para intentar definir una posible diferencia en la función de los genes determinada por una expresión espacial y/o temporal distinta.

#### 1.6.2.1 Patrón de expresión de *MtTM6*

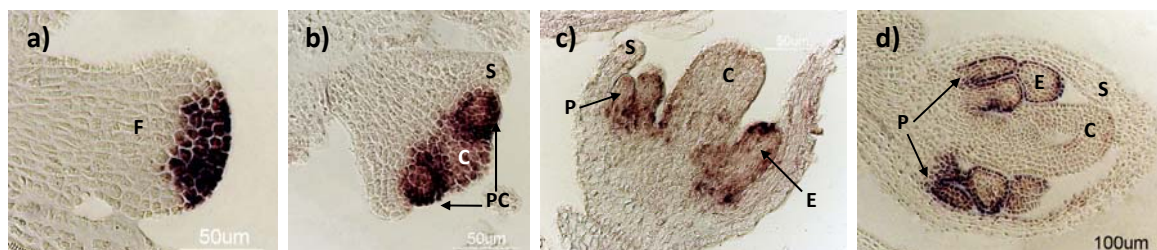
Mediante hibridación *Northern blot*, la expresión de *MtTM6* se detecta intensa en flores. No se detecta en otros tejidos (Figura 49).



**Figura 49. Análisis del patrón de expresión de *MtTM6* mediante *Northern blot*.** El análisis se realizó en diferentes tejidos de la planta: nódulos (N), raíz (R), tallo (T), hoja (H) y flor (FI).

La hibridación *in situ* muestra que la expresión de *MtTM6* se detecta desde el estadio 2 de desarrollo floral en la región del meristemo floral que dará lugar a los verticilos internos (Figura 50, a). En el estadio 4, al comenzar a diferenciarse los primordios comunes, la expresión se detecta en forma de cuña alrededor de los mismos, así como en el carpelo (Figura 50, b). En el estadio 5 la expresión disminuye en carpelo y empieza

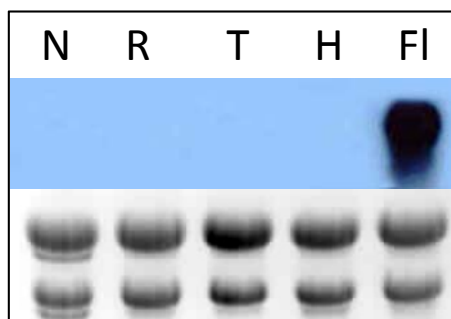
a restringirse a la capa externa de los primordios de pétalos y estambres, aunque aún se detecta sobre ellos (Figura 50, c). Posteriormente, en el estadio 6 la expresión desaparece del carpelo y se limita a la capa celular exterior de los pétalos y los estambres (Figura 50, d).



**Figura 50. Análisis del patrón de expresión de *MtTM6* mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*.** a) Expresión en el centro del meristemo floral en estadio de desarrollo 2. b) Expresión en el carpelo y en forma de cuña alrededor de los primordios comunes en el estadio 4. c) Expresión leve en carpelo y centrada a los primordios de pétalo y estambre tendiendo a la superficie externa de los mismos durante el estadio 5. d) La expresión desaparece de carpelo y se centra en la capa celular externa de los pétalos y estambres en el estadio 6 del desarrollo floral. F, Meristemo floral; PC, Primordio común; S, Sépalo; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo.

#### 1.6.2.2 Patrón de expresión de *MtNMH7*

En la Figura 51 puede verse como mediante hibridación *Northern blot* la expresión de *MtNMH7* se detecta, al igual que en *MtTM6*, intensa en flores y ausente en otros tejidos.

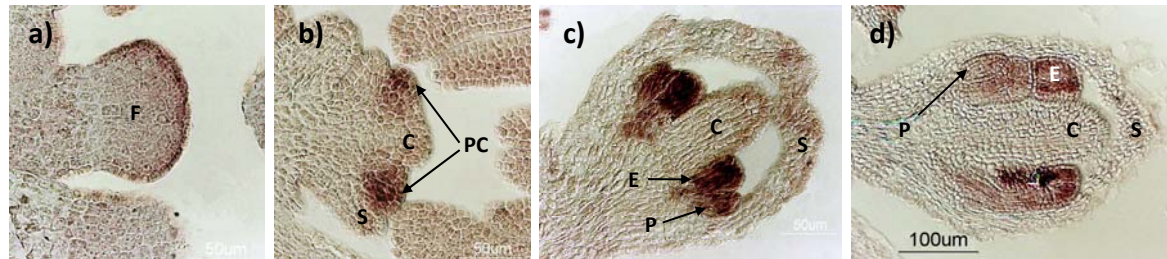


**Figura 51. Análisis del patrón de expresión de *MtNMH7* mediante *Northern blot*.** El análisis se realizó en diferentes tejidos de la planta: nódulos (N), raíz (R), tallo (T), hoja (H) y flor (FI).

La hibridación *in situ* muestra que el transcrito de *MtNMH7* se detecta en la capa externa de todo el meristemo floral en el estadio 2 (Figura 52, a). En el estadio 4 la expresión se centra en los primordios comunes (Figura 52, b). En el estadio 5, cuando se han diferenciado los primordios de estambres y pétalos, hay expresión fuerte de *MtNMH7* sobre dichos primordios, aunque es débil en la capa celular externa que los rodea (Figura 52, c). En el estadio 6, la expresión se centra en los pétalos y estambres,



estando claramente ausente de la capa celular más externa que rodea a estos órganos. (Figura 52, d).



**Figura 52. Análisis del patrón de expresión de *MtNMH7* mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*.** a) Expresión leve en la capa externa del meristemo floral en estadio de desarrollo 2. b) Expresión en los primordios comunes en el estadio 4. c) Expresión fuerte en los primordios de pétalo y estambre, ausente en la superficie externa de los mismos durante el estadio 5. d) La expresión se centra en el interior de los pétalos y estambres en el estadio 6 del desarrollo floral y no se detecta en la capa celular exterior de dichos órganos. F, Meristemo floral; PC, Primordio común; S, Sépalo; C, Carpelo; E, Estambre; P, Pétalo.

Tanto *MtTM6* como *MtNMH7* se expresan en los verticilos segundo y tercero de la flor, coincidiendo con la expresión descrita para los genes de clase B. Los patrones de expresión de ambos genes difieren en que, a pesar de expresarse en los mismos órganos, se expresan en tejidos diferentes de dichos órganos, de manera excluyente.

Las diferencias en los patrones de expresión así como en la estructura proteica de *MtTM6* y *MtNMH7*, sugieren que estos genes podrían tener funciones distintas en el desarrollo de pétalos y estambres. La correlación entre la divergencia a nivel de expresión entre genes duplicados del grupo *AP3* (pertenecientes a los linajes *TM6* y *euAP3*) y el hecho de que tengan funciones diferentes ha sido descrito previamente en algunas plantas como *Petunia x hybrida* (Rijkema *et al.*, 2006) o *Solanum lycopersicum* (de Martino *et al.*, 2006).



---

# **CAPÍTULO I**

---

## **D**ISCUSIÓN

---



Los genes MADS-box comprenden una gran familia de factores de transcripción cuyos miembros controlan diferentes procesos durante la vida de la planta, como el tiempo de floración, la determinación de la identidad del meristemo floral y la identidad y desarrollo de órganos florales, raíces, hojas, frutos y semillas (revisado por Rijpkema *et al.*, 2007). Estos genes están incluidos en alguna de las clases que conforman el modelo ABCDE (Theissen, 2001; Li *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009).

Las plantas modelo *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* u *Oryza sativa* han proporcionado mucha información acerca de los genes y las vías genéticas que controlan el proceso de floración, pero en lo que respecta a las correspondientes vías en leguminosas, el conocimiento generado es escaso. *Pisum sativum* (guisante) se ha usado durante décadas como sistema modelo de la genética fisiológica de la floración; sin embargo, la escasa información existente acerca de los genes implicados en la floración de esta planta, debida a las diferencias en la ontogenia floral y a la restricción en los análisis funcionales (al ser una especie difícil de transformar), ha impedido la comparación directa con otros sistemas modelo. Para resolver este problema, se han intentado identificar secuencias relacionadas con genes de floración en la leguminosa *Medicago truncatula*. Mediante la búsqueda en bases de datos genómicas y de EST's ("Expressed sequence tags" o marcadores de secuencia expresada), Hecht *et al.* (2005) identificaron 22 secuencias de genes MADS-box de clase MIKC de *Medicago truncatula*, concluyendo que la mayoría de los genes de floración de *Arabidopsis thaliana* están representados en las bases de datos de leguminosas (Hecht *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha descrito el aislamiento y caracterización de estos genes en tejido floral.

En la presente Tesis Doctoral se realizó una búsqueda de genes MADS-box de *Medicago truncatula* en una genoteca de cDNA de ápices florales. Se aislaron y caracterizaron 11 secuencias distintas correspondientes a genes MADS-box, distribuidas filogenéticamente en cinco de los 14 grupos de genes MADS-box descritos por Becker y Theissen (2003). Cinco de las secuencias aisladas (*MtAGL6*, *MtAGL6-like*, *MtSOC1a*, *MtAGa* y *MtNMH7*) no se habían descrito en el trabajo previo de Hecht *et al.* (2005), lo que eleva a 27 el número de genes MADS-box identificados en *Medicago truncatula*.

Hecht *et al.* (2005) describen que muchos genes presentes como copia única en *Arabidopsis thaliana* aparentemente también están como copia única en las cuatro leguminosas analizadas (*Medicago truncatula*, *Pisum sativum*, *Glycine max* y *Lotus*

*japonicus*). Sin embargo, otros genes presentan diferencias en su historial de duplicaciones. Por ejemplo, varios pares de genes parálogos de *Arabidopsis thaliana* están representados por un gen único en *Medicago truncatula* y *Pisum sativum*. Esto sucede con genes MADS-box como *SEP1/2*, *SHP1/2* o *AP1/CAL*. También puede observarse lo contrario, que *Medicago truncatula* y *Pisum sativum* contienen varias copias de genes que son copia única en *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, *SOC1a* y *SOC1b* (Hecht *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral confirman estas observaciones. Además, se observan casos de duplicaciones génicas en genes MADS-box de clase B (*MtTM6* y *MtNMH7*) y clase C (*MtAGa* y *MtAGb*), que no habían sido descritas previamente.

En *Arabidopsis thaliana*, se ha propuesto que la evolución de la familia de genes MADS-box se ajusta al denominado modelo "Birth-and-Death", un proceso dinámico que sugiere la creación de genes nuevos mediante duplicación. Estos genes duplicados pueden conservarse en el genoma por mucho tiempo (sometiéndose a procesos de sub- o neofuncionalización) o pueden ser inactivados o eliminados del genoma (Nei *et al.*, 1997; Nam *et al.*, 2003; Irish y Litt, 2005). Es posible que los genes MADS-box duplicados en *Medicago truncatula* sigan este modelo y que hoy por hoy estén en proceso de sub- o neofuncionalización o en desaparición. Probablemente durante la evolución de las estructuras florales varios genes MADS-box se han duplicado y algunos miembros han divergido para funcionar en diferentes estructuras florales, controlando ramas distintas en la regulación de la morfogénesis floral. Alternativamente, pueden funcionar en diferentes momentos, dirigiendo las distintas fases del desarrollo floral. Aunque estos genes presentan grandes similitudes a nivel de secuencia, sus patrones de expresión sugieren que tienen funciones y dianas diferentes.

Todos los genes MADS-box aislados en el presente trabajo se expresan en la flor, en diferentes tejidos florales y/o diferentes estadios de desarrollo floral. Cinco de estos genes (*MtSEP*, *MtAGL6-like*, *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like*) se expresan además en tejidos vegetativos, probablemente cumpliendo un rango de funciones más amplio que únicamente la regulación de los eventos del desarrollo floral.

Los resultados obtenidos en este trabajo conforman la base para determinar las funciones de estos genes. Se ha visto que existe una correlación entre el patrón de expresión floral específico de cada gen y el grupo filogenético al que pertenece y se

espera en el futuro poder llevar a cabo estudios funcionales para definir el papel de estos genes en el desarrollo de las inflorescencias, flores y frutos de *Medicago truncatula*. Los datos presentados ayudarán a comprender las bases genéticas del desarrollo de las estructuras florales particulares de las leguminosas y a examinar la relación entre la evolución molecular y la diversificación morfológica en este importante grupo de plantas.

## **1 *MtSEP* ES EL ORTÓLOGO DE LOS GENES *SEP1/2* EN *Medicago truncatula***

Los genes del grupo *AGL2* (*SEPALLATA*) constituyen una clase adicional de genes homeóticos florales, la llamada clase E (Theissen, 2001). Los genes *SEPALLATA* (*SEP*) se han descrito como necesarios, aunque de manera redundante, para la especificación de la identidad de los cuatro verticilos de órganos florales y del meristemo floral (Ma *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1995; Theissen *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2000; Ditta *et al.*, 2004; Uimari *et al.*, 2004; Malcomber y Kellogg, 2005).

Estudios previos han mostrado que las duplicaciones dentro del grupo *SEP* han ocurrido a lo largo de la evolución de las angiospermas, y el número de genes *SEP*-like es diferente entre las especies. Así pues, en *Arabidopsis thaliana* se han identificado cuatro genes *SEP*-like: *SEP1*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4* (antes llamados *AGL2*, *AGL4*, *AGL9* y *AGL3*, respectivamente; Ma *et al.*, 1991; Mandel y Yanofsky, 1998), pero hay al menos cinco en *Oryza sativa* (Nam *et al.*, 2004), ocho en *Zea mays* (Münster *et al.*, 2002) y ocho en *Petunia x hybrida* (Zahn *et al.*, 2005a). Los genes *SEP1* y *SEP2* de *Arabidopsis thaliana* son muy similares entre sí y reflejan una duplicación reciente.

En leguminosas se han aislado varias secuencias relacionadas con genes *SEP*-like (Hecht *et al.*, 2005). Se han descrito los genes ortólogos de *SEP3*: *LjSEP3* de *Lotus japonicus* (Dong *et al.*, 2005) y *PsMTF1* de *Pisum sativum* (Buchner y Boutin, 1998). Además, se ha visto que varios pares de genes parálogos de *Arabidopsis thaliana* (como sucede con *SEP1/2* o con *SHP1/2*) están representados en diversas leguminosas por un solo gen (Hecht *et al.*, 2005). Se han descrito como ortólogos de *SEP1/2*: *PsSEP1/2* de *Pisum sativum* (antes *PEAM6*, Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001; Berbel, 2005) y *GmSEP1* de *Glycine max* (Huang *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se aisló *MtSEP*, un gen *SEP*-like de *Medicago truncatula*. *MtSEP* equivale al EST denominado *MtSEP1/2* mencionado por Hecht *et al.* (2005). Los alineamientos de secuencia con otras proteínas MADS-box demostraron que la proteína *MtSEP* tiene una estructura de tipo MIKC y presenta los motivos SEP I y SEP II característicos de las proteínas *SEP*-like (Zahn *et al.*, 2005a). Además, el árbol filogenético mostró que, dentro de los genes *SEP*-like, *MtSEP* se localiza en la rama *SEP1/2*. En particular, *MtSEP* está más cerca de *GmSEP1* (Huang *et al.*, 2009), *PsSEP1/2* (Ferrándiz, 1996), *MdMADS1* (Sung y An, 1997) y *PpMADS7* (Xu *et al.*, 2008), todos descritos como genes ortólogos de *SEP1/2*. Estos resultados sugieren que *MtSEP* es el ortólogo de los genes *SEP1/2* en *Medicago truncatula*.

Se ha descrito que el gen *SEP1* de *Arabidopsis thaliana* es específico de flores y no se expresa en meristemos inflorescentes (Flanagan y Ma, 1994). Aunque el desarrollo de la inflorescencia en leguminosas es sustancialmente diferente al de *Arabidopsis thaliana* (Ferrándiz *et al.*, 1999; Benlloch *et al.*, 2003), la expresión de *MtSEP* también es específica de meristemo floral y no se detecta en el meristemo inflorescente. Lo mismo sucede con el gen *PsSEP1/2* de *Pisum sativum* (Navarro, 2001). Este tipo de expresión en los meristemos florales tempranos es coherente con la hipótesis del papel de este gen en la especificación de la identidad floral del meristemo.

En los estadios tempranos del desarrollo floral de *Medicago truncatula*, la expresión de *MtSEP* es uniforme en los primordios de todos los órganos florales en desarrollo. Durante el desarrollo floral, se detecta expresión de *MtSEP* en óvulos. Si consideramos el óvulo como un órgano floral adicional, como se ha sugerido basándose en su origen evolutivo (Robinson-Beers *et al.*, 1992), se puede pensar que *MtSEP* funciona en el desarrollo temprano de todos los órganos florales: sépalos, pétalos, estambres, carpelos y óvulos. Entonces, *MtSEP* puede tener un papel importante en el establecimiento de la identidad de cada órgano floral.

El mismo patrón de expresión temprana se describió para *PsSEP1/2* de *Pisum sativum*, aunque en flores desarrolladas también se detecta expresión en filamentos de estambres y carpelo (Navarro, 2001). La expresión de *MtSEP* en flores desarrolladas se detecta principalmente en pétalos, lo que se ha descrito también para el ortólogo de *SEP1* en *Glycine max*, *GmSEP1* (Huang *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que *MtSEP*



además de determinar la identidad del pétalo de *Medicago truncatula*, puede estar involucrado en el posterior desarrollo y elaboración de su morfología.

*MtSEP* también mostró expresión débil en raíces, indicando que puede participar en procesos biológicos en este tejido. La expresión de genes *SEP1/2* en tejidos vegetativos se ha descrito previamente para genes como *GmSEP1* de *Glycine max* (expresión en tallo y ápices vegetativos; Huang *et al.*, 2009) o *GhGRCD2* de *Gerbera hybrida* (Malcomber y Kellogg, 2005).

El análisis de secuencia, el patrón de expresión y sus relaciones filogenéticas, indican que *MtSEP* es un gen de clase E, ortólogo a los genes *SEP1/2* de *Arabidopsis thaliana*. *MtSEP* podría llevar a cabo una doble función en *Medicago truncatula*, estableciendo tanto la identidad floral del meristemo como la identidad de todos los órganos florales.

## **2 MtAGL6 ES EL ORTÓLOGO DEL GEN AGL6 EN *Medicago truncatula***

Los genes del grupo *AGL6* (*AGAMOUS-like6*), que codifican proteínas MADS-box de tipo MIKC, se han identificado en muchas especies de plantas en las últimas dos décadas. Estos genes se consideran, en base a análisis filogenéticos, un grupo hermano de los genes del grupo *SEP* (Ma *et al.*, 1991; Zahn *et al.*, 2005a). Sin embargo, se sabe poco de las funciones de los genes del grupo *AGL6*, debido a la ausencia de fenotipo en mutantes de pérdida de función (Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995; Viaene *et al.*, 2010). El análisis del único mutante nulo con fenotipo para un gen de tipo *AGL6*, el del gen *ZAG3* de la monocotiledónea *Zea mays*, apunta a un papel de estos genes en el desarrollo de meristemas y órganos florales (Mena *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 2009).

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene dos genes tipo *AGL6*: *AGL6* y *AGL13* (Mouradov *et al.*, 1998; Rounsley *et al.*, 1995). Son muy similares entre sí y pueden ser producto de una duplicación génica relativamente reciente (Li *et al.*, 2010). *AGL6* fue uno de los primeros genes MADS-box identificados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Ma *et al.*, 1991), pero su función aún no se ha determinado. Sin embargo, estudios de expresión en otras especies sugieren papeles en la transición floral y el desarrollo de órganos florales (Hsu *et al.*, 2003; Carlsbecker *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2007; Reinheimer y Kellogg, 2009; Rijpkema *et al.*, 2009).

En leguminosas, en el año 2005 se identificaron los genes *PsMADS5* y *PsMADS3*, de *Pisum sativum* (Hecht *et al.*, 2005). Estos genes se describieron previamente en nuestro laboratorio (Ferrándiz, C., Tesis Doctoral, 1996) y se incluyeron en el grupo *AGL6*.

En el presente trabajo se aislaron también dos genes pertenecientes al grupo *AGL6* en la leguminosa modelo *Medicago truncatula*, denominados *MtAGL6* y *MtAGL6-like*. La homología de secuencia entre ellos sugiere que son el resultado de la duplicación de un gen ancestral común; no obstante, hay divergencias de expresión entre ellos. Los cambios en los dominios de expresión son frecuentes entre genes duplicados (ejemplos en Conant and Wolfe, 2008) y reflejan patrones complejos de mutación y selección tras el evento de duplicación (Reinheimer y Kellogg, 2009).

Los niveles de homología de secuencia entre *MtAGL6* y otros genes del grupo *AGL6* demuestran que *MtAGL6* es el ortólogo de *PsMADS5* de *Pisum sativum*, un gen MADS-box de expresión específicamente floral (Ferrándiz, C., Tesis Doctoral, 1996). Además, *MtAGL6* es el ortólogo del gen *AGL6* de *Arabidopsis thaliana* (Ma *et al.*, 1991) en *Medicago truncatula*. *MtAGL6* tiene la mayor similitud de secuencia con *VvMADS3* de *Vitis vinifera* (Boss *et al.*, 2002) y *MdMADS11* de *Malus x domestica* (Yao *et al.*, 1999), todos descritos como genes del grupo *AGL6*.

En la región C-terminal de *MtAGL6* se han encontrado los motivos *AGL6-I* y *AGL6-II*, característicos de las proteínas del grupo *AGL6* (Ohmori *et al.*, 2009). El estudio del ortólogo de *AGL6* de *Oryza sativa* (*MFO1*, antes *OsMADS6*) ha demostrado que el motivo *AGL6-II* media una activación transcripcional especialmente fuerte y que la región que va desde el motivo *AGL6-I* hasta el *AGL6-II* es un dominio potencial de activación transcripcional (Ohmori *et al.*, 2009). La presencia de ambos motivos en *MtAGL6* sugiere que esta proteína es un factor de transcripción perteneciente al grupo *AGL6*.

*MtAGL6*, al igual que su ortólogo *PsMADS5* (Ferrándiz, 1996), tiene expresión específica en flor, un patrón de expresión común para los genes tipo *AGL6* (Ma *et al.*, 1991; Mouradov *et al.*, 1998; Boss *et al.*, 2002; Mena *et al.*, 1995; Petersen *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 1999; Carlsbecker *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2007). Este patrón de expresión específico, sugiere que juega un papel primario en el desarrollo de los órganos florales. *MtAGL6* está ausente de los tejidos vegetativos como hojas, tallos o raíces.

Dentro de la flor, *MtAGL6* se expresa de manera temprana en el meristemo floral. Este tipo de expresión de los genes de tipo *AGL6* se ha asociado con una función en la identidad del meristemo floral (Carlsbecker *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2009; Ohmori *et al.*, 2009; Melzer *et al.*, 2010), así como con funciones de intermediarios en las interacciones de genes meristemáticos con genes de identidad de órgano floral (Fan *et al.*, 1997, 2007; Moon *et al.*, 1999; Favaro *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003; de Folter *et al.*, 2005; Ohmori *et al.*, 2009).

*MtAGL6* además de expresarse en los primordios comunes y en los pétalos y estambres originados a partir de dichos primordios, se expresa en óvulos y semillas en desarrollo. Diversos estudios han detectado expresión de genes del grupo *AGL6* en carpelos y óvulos de angiospermas (Ma *et al.*, 1991; Mena *et al.*, 1995; Rounsley *et al.*, 1995; Moon *et al.*, 1999; Tsuchimoto *et al.*, 2000; Boss *et al.*, 2002; Pelucchi *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2003; Losa *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2004; Chanderbali *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007). La expresión de los genes de tipo *AGL6* en órganos reproductores parece ser un estatus común y un rasgo ancestral (Li *et al.*, 2010). Posiblemente, este gen tiene una función esencial y conservada en la especificación del desarrollo de los órganos reproductores de *Medicago truncatula*.

En las semillas, *MtAGL6* se expresa en nucela y epidermis. Investigaciones recientes han sugerido que la expresión en el integumento interno del óvulo es un patrón de expresión ancestral que se comparte con los genes tipo *AGL6* de gimnospermas (Mouradov *et al.*, 1998, Shindo *et al.*, 1999, Winter *et al.*, 1999, Reinheimer y Kellogg, 2009). Así pues, la expresión de *MtAGL6* en óvulos se asemeja a la expresión de los genes tipo *AGL6* de gimnospermas.

El análisis de secuencia y las relaciones filogenéticas indican que *MtAGL6* es el ortólogo de *AGL6* de *Arabidopsis thaliana*. El patrón de expresión preferentemente floral que comparte *MtAGL6* con genes tipo *AGL6* de gimnospermas (Becker *et al.*, 2003; Mouradov *et al.*, 1998; Tandre *et al.*, 1998), monocotiledóneas (Hsu *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2007) y eudicotiledóneas superiores (Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995; Tsuchimoto *et al.*, 2000) sugiere que *MtAGL6* podría tener una función en flores que probablemente sea de origen ancestral.

### 3 ***MtAGL6-like* FORMA PARTE DE UN NUEVO GRUPO GÉNICO EXCLUSIVO DE LEGUMINOSAS**

El gen *MtAGL6-like* es el ortólogo de *PsMADS3* de *Pisum sativum* (Ferrándiz, C., Tesis Doctoral, 1996). Además, presenta alta similitud de secuencia con dos genes aún no caracterizados de *Glycine max* (*GmACU23947.1* y *GmACU18038.1*, Cheung *et al.*, unpublished). *MtAGL6-like* se agrupa filogenéticamente junto con estos genes en una rama separada de *MtAGL6*. Cabe mencionar que *MtAGL6-like* y *PsMADS3* carecen de los motivos AGL6-I y AGL6-II (Ohmori *et al.*, 2009) en la región C-terminal. La evolución de esta región se ha ligado a los cambios en las interacciones génicas y, en consecuencia, a diferentes funciones génicas (Vandenbussche *et al.*, 2003a). Por ello, no puede considerarse a *MtAGL6-like* como ortólogo de *AGL6* o *AGL13* de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados de los análisis filogenéticos y de secuencia indican que los genes ortólogos *MtAGL6-like*, *PsMADS3*, *GmACU23947.1* y *GmACU18038.1* forman un nuevo grupo de genes que parece ser exclusivo de las leguminosas. Posiblemente, estos genes realizan alguna función específica para esta familia de plantas.

La expresión de *MtAGL6-like* en flores y frutos se asemeja a la expresión de *MtAGL6*. Difieren en que, dentro de la semilla, *MtAGL6-like* solo se expresa en el endotelio de la misma. La expresión en las células del endotelio que rodean el saco embrionario en el óvulo maduro se ha descrito para los genes *AGL6* y *AGL13* de *Arabidopsis thaliana* (Schauer *et al.*, 2009). Así pues, el patrón de expresión de *MtAGL6-like* en semillas se parece más al descrito para los genes del grupo *AGL6* de la angiosperma eudicotiledónea *Arabidopsis thaliana* que al patrón de expresión ancestral que *MtAGL6* comparte con los genes tipo *AGL6* de gimnospermas.

El gen *MtAGL6-like* se expresa en tejidos florales y además en todos los tejidos vegetativos analizados, al igual que su ortólogo en *Pisum sativum*, *PsMADS3*, exceptuando la expresión en raíz, que no se detecta para *PsMADS3* (Ferrándiz, C., Tesis Doctoral, 1996). Hay estudios que describen expresión de algunos genes del grupo *AGL6* en tejidos vegetativos en gimnospermas y en ciertas angiospermas eudicotiledóneas (Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995; Ferrándiz, 1996; Tandre *et al.*, 1995; Mouradov *et al.*, 1998; Koo *et al.*, 2010; Reinheimer y Kellogg, 2009). Esta expresión en tejido vegetativo de genes del grupo *AGL6* es novedosa en las eudicotiledóneas superiores y

aún no se ha estudiado con detalle. Posiblemente, la expresión en tejidos vegetativos ha sido adquirida por *MtAGL6-like* tras la duplicación del gen ancestral que dio lugar a *MtAGL6* y *MtAGL6-like*. Además, este patrón de expresión sugiere que *MtAGL6-like* probablemente está implicado en muchos aspectos del desarrollo de la planta, además de su papel en el desarrollo de la flor.

Durante la evolución de ambos genes, *MtAGL6-like* ha adquirido la expresión a nivel vegetativo, mientras que *MtAGL6* conserva la expresión exclusiva en flores que es típica de los genes de tipo *AGL6* de angiospermas. Ambos genes comparten una expresión en flores que es de origen ancestral y posiblemente están involucrados en la formación tanto de los órganos reproductores como de los óvulos. Sin embargo, el patrón de expresión espacial en estos tejidos varía entre ambos genes, lo que sugiere que sus funciones en los mismos probablemente sean distintas. Es razonable pensar que la diferencia en los patrones de expresión de los distintos genes tipo *AGL6* está relacionada con el desarrollo de distintas estructuras reproductivas en diferentes especies de plantas.

#### **4 *MtSOC1a* Y *MtSOC1b* SON ORTÓLOGOS DEL GEN INTEGRADOR FLORAL *SOC1***

Dentro de la extensa familia de genes con dominio MADS-box, algunos están involucrados en el control del tiempo de floración y en la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo. Los genes de la familia *TDR3/SOC1*, representada por los genes *TDR3* de *Solanum lycopersicum* (antes *TM3*; Pnueli *et al.*, 1991) y *SOC1* de *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2000), están implicados en dichos procesos. *SOC1* está involucrado en la promoción de la floración (Samach *et al.*, 2000) y la conversión de meristemas vegetativos en meristemas inflorescentes (Komeda, 2004). Este gen integra las señales de las vías que controlan el tiempo de floración, por lo que se define como “integrador floral” (Mouradov *et al.*, 2002; Simpson y Dean, 2002).

Como se ha visto, la familia génica MADS-box parece haber sufrido duplicaciones y divergencias funcionales dentro de varios linajes de angiospermas (Theissen *et al.*, 2000; Irish *et al.*, 2003). Existen evidencias que sugieren que el gen ancestral *TDR3/SOC1* también ha sufrido dicha divergencia durante su evolución (Lee y Lee, 2010). En

*Arabidopsis thaliana* se han identificado al menos cinco factores de transcripción del grupo *TDR3/SOC1*: *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*, antes *AGL20*; Borner *et al.*, 2000), *AGL14* (Rounsley *et al.*, 1995), *AGL19* (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b), *AGL71* (Pařenicová *et al.*, 2003) y *AGL72* (Pařenicová *et al.*, 2003).

En leguminosas se ha aislado una secuencia ortóloga a *SOC1* en *Glycine max* (*GmSOC1*; Hecht *et al.*, 2005; Xu *et al.*, unpublished). Además, se han aislado dos secuencias relacionadas a *SOC1* en *Pisum sativum* (*PsSOC1a* y *PsSOC1b*), ambas con elevada homología a *SOC1*, más que a cualquier otro miembro del clado *SOC1* de *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2005). En el presente trabajo se aislaron tres genes pertenecientes al grupo *TDR3/SOC1* en la leguminosa modelo *Medicago truncatula*, denominados *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like*. *MtSOC1a* y *MtSOC1b* presentan alta homología de secuencia con *SOC1* de *Arabidopsis thaliana* y son ortólogos de los genes *PsSOC1a* y *PsSOC1b*, respectivamente.

Las secuencias de las proteínas del grupo *TDR3/SOC1* se caracterizan por presentar cuatro variantes aminoacídicas raras dentro de la caja MADS (Theissen *et al.*, 1996; Decroocq *et al.*, 1999). Además, las proteínas de este grupo tanto de gimnospermas como de angiospermas conservan once residuos aminoacídicos en la región C-terminal, llamados "motivo *SOC1*" (Vandenbussche *et al.*, 2003a; Nakamura *et al.*, 2005). Los tres genes del grupo *TDR3/SOC1* aislados en *Medicago truncatula* presentan ambas características. La conservación de las variantes características de la caja MADS confirma la pertenencia de estos genes al grupo *TDR3/SOC1*. La conservación del motivo *SOC1* posiblemente refleja una similitud en las interacciones bioquímicas entre las distintas proteínas *TDR3/SOC1* y otras proteínas en la formación de complejos de alto nivel (Nakamura *et al.*, 2005).

Los genes del grupo *TDR3/SOC1* descritos tanto en angiospermas como en gimnospermas, se expresan en órganos vegetativos, así como en el meristemo vegetativo, y están involucrados en la transición floral (Pnueli *et al.*, 1991; Mandel *et al.*, 1994; Tandre *et al.*, 1995; Menzel *et al.*, 1996; Walden *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999; Becker y Theissen, 2003). En *Arabidopsis thaliana*, el gen *SOC1* se expresa predominantemente en los tejidos meristemáticos, pero también es ampliamente expresado en raíces, hojas, brotes, inflorescencias y tallos (Onouchi *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000). Según los patrones de expresión, es muy probable que el gen *TDR3/SOC1*

ancestral tuviera funciones en el desarrollo vegetativo además de estar implicado en la transición floral (Becker y Theissen, 2003).

La expresión de los genes parálogos *MtSOC1a* y *MtSOC1b* de *Medicago truncatula* también se detecta principalmente en tejidos vegetativos, en los haces vasculares en desarrollo y en los primordios de hojas. La expresión de los genes del grupo *TDR3/SOC1* en los haces vasculares se ha relacionado con una posible función en la regulación del transporte de sustancias específicas de la floración (Menzel *et al.*, 1996), mientras que su función en hojas no está clara, pero puede que contribuya a la promoción de la floración en respuesta de señales ambientales como la vernalización (Searle *et al.*, 2006).

*MtSOC1a* y *MtSOC1b* se expresan en el meristemo apical tanto vegetativo como floral. La misma expresión se ha descrito para el homólogo de *SOC1* de *Sinapis alba* (*SaMADSA*; Menzel *et al.*, 2006), al que se ha asignado un papel en la integración de señales de las vías florales de fotoperiodo, dependiente de giberelinas y de vernalización (Moon *et al.*, 2003). Es probable que los ortólogos de *SOC1* en *Medicago truncatula* también jueguen un papel como integradores florales en el meristemo apical durante la transición floral y, tras la inducción de la floración, en el mantenimiento de las funciones meristemáticas durante el desarrollo reproductivo. La caracterización de *MtSOC1a* y *MtSOC1b* como genes de actividad temprana durante la transición floral en *Medicago truncatula* puede ser el primer paso hacia la identificación de componentes involucrados en la transducción de señales tempranas en el meristemo y en la comprensión del cambio de desarrollo vegetativo a reproductivo en los meristemas apicales de las leguminosas.

## **5 *MtSOC1-like* ES UN GEN DEL GRUPO *TDR3/SOC1* QUE SE EXPRESA EN TEJIDO FLORAL ADULTO**

El gen *MtSOC1-like* presenta las características de secuencia que lo incluyen dentro del grupo *TDR3/SOC1*: los residuos aminoacídicos característicos en la región de la caja MADS (Theissen *et al.*, 1996; Decroocq *et al.*, 1999) y el “motivo SOC1” (Vandenbussche *et al.*, 2003a; Nakamura *et al.*, 2005). Además, al igual que la mayoría de los genes del grupo *TDR3/SOC1* estudiados (Pnueli *et al.*, 1991; Mandel *et al.*, 1994; Tandre *et al.*,

1995; Menzel *et al.*, 1996; Walden *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1999; Becker y Theissen, 2003), *MtSOC1-like* se expresa preferentemente en tejidos vegetativos.

Sin embargo, el gen *MtSOC1-like* pertenece a una rama filogenética distinta a la de los genes *MtSOC1a* y *MtSOC1b*. *MtSOC1-like* se agrupa filogenéticamente con los genes parálogos *AGL14* (Rounsley *et al.*, 1995) y *AGL19* (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b) de *Arabidopsis thaliana*, cuya expresión inicialmente se describió como específica de raíz (Rounsley *et al.*, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b), y el gen *ETL* de *Eucalyptus globulus* (Decroocq *et al.*, 1999). Las funciones de estos genes aún no se han definido, sin embargo, según sus características, es posible que sean parcialmente redundantes con las de *SOC1* (Nakamura *et al.*, 2005).

El gen *TDR3/SOC1* mejor caracterizado de esta rama filogenética es *ETL* de *Eucalyptus globulus*, el cual además de expresarse fuertemente en raíces, se detecta en los meristemas apicales inflorescentes y florales. El patrón de expresión de *MtSOC1-like* es igual al de *ETL* (Decroocq *et al.*, 1999). En tejidos vegetativos, *MtSOC1-like* tiene su mayor expresión en raíz. En tejido floral, tras expresarse en los meristemas florales tempranos, se detectan los niveles más altos de expresión de *MtSOC1-like* en los estadios tardíos de desarrollo floral en los primordios de pétalos y posteriormente en estambres y óvulos. Este patrón de expresión indica que, tanto *MtSOC1-like* como *ETL*, además de controlar el tiempo de floración, pueden requerirse para mantener la identidad y función de los órganos florales.

Tanto sus patrones de expresión como sus secuencias conservadas sugieren que los tres genes del grupo *TDR3/SOC1* de *Medicago truncatula* pueden jugar papeles como integradores florales e interactuar con otros genes para integrar las señales necesarias en las vías de tiempo de floración, así como mantener la identidad de los meristemas en estadios tempranos de desarrollo. Probablemente, *MtSOC1-like* tiene una función adicional en la determinación de la identidad de los órganos florales.

## **6 *MtSHP*: GEN ORTÓLOGO DE LOS GENES *SHP1/SHP2* CON EXPRESIÓN EN ÓVULOS**

Los genes MADS-box de función C son responsables de la especificación de la identidad de los órganos reproductivos florales y la determinación del meristemo floral



(Coen y Meyerowitz, 1991). El gen *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis thaliana* es el gen arquetípico de función C (Yanofsky *et al.*, 1990). *AG* es miembro del linaje monofilético de genes MADS-box que incluye a *SHP1*, *SHP2* y *STK* (antes *AGL1*, *AGL5* y *AGL11*), indicando que estos cuatro genes podrían compartir funciones parcialmente redundantes (Pinyopich *et al.*, 2003). Los genes parálogos *SHP1* y *SHP2* juegan un papel único en la diferenciación de los márgenes del replum y se requieren para la dehiscencia del fruto en *Arabidopsis thaliana* (Liljegren *et al.*, 2000). Además, tienen un papel redundante en la determinación de la identidad de carpelo y óvulos (Western y Haughn, 1999; Pinyopich *et al.*, 2003) y se requieren para la formación del estilo y el estigma (Colombo *et al.*, 2010).

Varias especies angiospermas modelo estudiadas hasta el momento se caracterizan por la presencia de dos o más genes pertenecientes al grupo *AG*: cuatro genes en *Arabidopsis thaliana* (*AG*, *SHP1*, *SHP2* y *STK*), dos genes en *Antirrhinum majus* (*PLE* y *FAR*), cuatro genes en *Oryza sativa* (*OsMADS3* [Kang *et al.*, 1998], *OsMADS13* [López-Dee *et al.*, 1999], *OsMADS21* [Lee *et al.*, 2003] y *OsMADS58* [Yamaguchi *et al.*, 2003]), cuatro genes en *Lotus japonicus* (*LjAGa*, *LjAGb*, *LjAGL1* y *LjAGL11* [Dong *et al.*, 2005]), etc. En el presente trabajo, se aislaron tres genes pertenecientes a este grupo en la leguminosa modelo *Medicago truncatula*: *MtAGa*, *MtAGb* y *MtSHP*. Previamente se describió el aislamiento de un cuarto gen, *MtSTK*, el ortólogo de *STK* de *Medicago truncatula* (Hecht *et al.*, 2005).

Los genes duplicados *MtAGa* y *MtAGb* se agrupan filogenéticamente con los genes *AG* de *Arabidopsis thaliana* y *FAR* de *Antirrhinum majus* dentro del linaje *euAG*. Estos genes parecen haber resultado de una duplicación reciente y se describen con detalle en el **CAPÍTULO II**. Por otro lado, *Medicago truncatula* tiene solo un gen perteneciente al linaje *PLE*, *MtSHP*. La mayoría de las especies eudicotiledóneas superiores, exceptuando a los miembros de la familia Brassicaceae como *Arabidopsis thaliana*, poseen solo un gen del linaje *PLE* (Becker y Theissen, 2003; Kramer *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2005; Zahn *et al.*, 2006). En *Arabidopsis thaliana*, los genes *SHP1* y *SHP2* se produjeron por un evento de duplicación génica reciente dentro de este linaje (Moore *et al.*, 2005) y *MtSHP* es el ortólogo de éstos genes duplicados de *Arabidopsis thaliana*.

Los porcentajes elevados de homología de secuencia entre *MtSHP* y sus ortólogos del linaje *PLE* en *Pisum sativum* (*PsmADS8*; Hecht *et al.*, 2005), *Lotus japonicus* (*LjAGL1*;

Dong *et al.*, 2005) y *Glycine max* (*GmACU18208.1*; Cheung *et al.*, unpublished), sugieren que este gen está muy conservado en especies leguminosas.

El alineamiento de MtSHP con las proteínas homólogas más cercanas de otras especies revela que posee todas las características comúnmente encontradas en las proteínas MADS-box de clase C. En el extremo N-terminal, precediendo al dominio MADS, MtSHP presenta un fragmento de 15 aminoácidos. La presencia de una secuencia N-terminal que precede al dominio MADS es una característica común a los miembros de la clase C (Jager *et al.*, 2003) que no se encuentra en otros genes MADS-box de tipo MIKC (Purugganan *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha demostrado que, al menos en *Arabidopsis thaliana*, este fragmento no es esencial para los aspectos más importantes de la función génica (Mizukami *et al.*, 1996). Por otro lado, en el extremo C-terminal de MtSHP hay dos regiones cortas altamente conservadas, llamadas “AG motif I” y “AG motif II”. La conservación de estos motivos en genes del grupo AG los define como sinapomorfias del mismo. Estos motivos no parecen tener relación con ningún motivo funcional conocido (Kramer *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que la función ancestral de los genes de clase C era especificar los órganos reproductivos tanto masculinos como femeninos (Haughn y Somerville, 1988; Winter *et al.*, 1999). Actualmente, los genes de clase C tienen patrones de expresión en los órganos del tercer y cuarto verticilo, lo que probablemente representa la expresión del gen AG ancestral. La mayoría de los genes del grupo AG incluidos en el linaje *PLE*, suele expresarse en estos órganos (Bradley *et al.*, 1993; Angenent *et al.*, 1993, 1995; Kitahara *et al.*, 2000; Tani *et al.*, 2007; Vrebalov *et al.*, 2009; Tadiello *et al.*, 2009). No obstante, varios miembros del linaje *PLE* han adquirido patrones de expresión específicos del cuarto verticilo, como *SHP1* (Ma *et al.*, 1991) y *SHP2* (Savidge *et al.*, 1995) de *Arabidopsis thaliana*, *MdMADS14* (Van der Linden *et al.*, 2002) de *Malus domestica* y *CAG2* (Perl-Treves *et al.*, 1998) de *Cucumis sativus*. Estos genes se expresan en el carpelo en desarrollo, los óvulos y frecuentemente en semillas y frutos.

La expresión de *MtSHP* se detecta en la región interna del carpelo, en óvulos y semillas, lo cual ubica a *MtSHP* en la clase de genes del linaje *PLE* que se expresan primordialmente en el cuarto verticilo. Además, la ausencia de expresión de *MtSHP* en los estadios tempranos del desarrollo floral es consistente con la expresión génica de *SHP1/SHP2*, la cual no se detecta antes de la iniciación del carpelo (Savidge *et al.*, 1995).

Hasta el momento, *PsMADS8* de *Pisum sativum* era el único gen ortólogo de *SHP1/2* en leguminosas cuya expresión se había descrito (Hecht *et al.*, 2005; Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001). La expresión de *PsMADS8* se detectó en los órganos correspondientes al tercer y cuarto verticilo (Navarro, C. Tesis Doctoral, 2001). El patrón de expresión de *MtSHP* no se corresponde con el de *PsMADS8*, ya que *MtSHP* no se expresa en el tercer verticilo. Sin embargo, los patrones de expresión de los genes del linaje *PLE* están muy diversificados (Zahn *et al.*, 2006), así que es probable que los genes ortólogos *MtSHP* y *PsMADS8* no sean equivalentes a nivel de expresión pero sí a nivel funcional, considerando además las diferencias en la estructura del fruto de ambas especies.

El análisis detallado del patrón de expresión de *MtSHP* en flores silvestres de *Medicago truncatula* permite prever sus posibles funciones en el desarrollo floral. El patrón de expresión de *MtSHP* se limita a una región específica dentro del carpelo, al igual que ocurre con *SHP1/SHP2* (Flanagan *et al.*, 1996). Esta región corresponde probablemente a la placenta, cuyo papel es proveer nutrientes a los óvulos en desarrollo, así que *MtSHP* puede estar involucrado en dicha función. *MtSHP* también se expresa durante el desarrollo de los óvulos, sugiriendo una función en la regulación de dicho desarrollo. El hecho de que *MtSHP* se exprese específicamente en estos órganos lo convierte en una herramienta útil para la identificación de tejido de carpelo u óvulos en desarrollo y podría usarse como un marcador temprano de identificación de células destinadas a formar estos tejidos.

## **7 *MtTM6* Y *MtNMH7*: GENES DE CLASE B ORIGINADOS POR DUPLICACIÓN GÉNICA, PERTENECIENTES AL LINAJE *AP3/DEF***

En *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, la función B está representada por un par de genes MADS-box: *DEFICIENS (DEF)* y *GLOBOSA (GLO)* en *Antirrhinum majus* y *APETALA3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)* en *Arabidopsis thaliana*. Estos genes se expresan durante el desarrollo de la flor en los órganos del segundo y tercer verticilo y la mutación de cualquiera de ellos causa conversiones homeóticas de pétalos a sépalos y de estambres a carpelos (Bowman *et al.*, 1989; Sommer *et al.*, 1990; Tröbner *et al.*, 1992; Goto y Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1994).

El análisis filogenético de los homólogos de *AP3/PI* ha revelado un complejo patrón de duplicación génica y divergencia de los genes de clase B a lo largo de su historia evolutiva. Los linajes *PI/GLO* y *AP3/DEF* se generaron tras la duplicación de un gen ancestral *AP3/PI* durante la divergencia de gimnospermas y angiospermas (Aoki *et al.*, 2004; Fukui *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Kramer *et al.*, 1998, 2003; Kramer e Irish 1999, 2000; Mouradov *et al.*, 1999; Purugganan *et al.*, 1995; Stellari *et al.*, 2004). Dentro del grupo *AP3/DEF*, antes de la diversificación de las eudicotiledóneas superiores, ocurrió otra duplicación que dio lugar a los linajes parálogos: *euAP3* y *TM6* (Kramer *et al.*, 1998; Kramer e Irish, 1999).

En *Medicago truncatula* previamente se aislaron dos genes pertenecientes al linaje *PI/GLO*, denominados *MtPI* y *MtNGL9*. Estos genes fueron caracterizados estructural y funcionalmente, concluyendo que la función de los ortólogos de *PI* en *Medicago truncatula* podría haber divergido. *MtPI* podría haber mantenido un papel predominante durante el desarrollo floral, mientras que *MtNGL9* podría estar involucrado en el desarrollo de los nódulos de raíz, al igual que su ortólogo en *Medicago sativa*, *MsNGL9* (Benlloch *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se aislaron dos genes, *MtTM6* y *MtNMH7*, pertenecientes al linaje *AP3/DEF*. Se confirma que ambos genes pertenecen al grupo *AP3/DEF* por la presencia en la caja MADS de cinco residuos aminoacídicos característicos (Theissen *et al.*, 1996) además de la secuencia (H/Q)YExM, altamente conservada en los genes pertenecientes a este grupo (Kramer *et al.*, 1998). *MtTM6* y *MtNMH7* se incluyen en los linajes parálogos *TM6* y *euAP3*, respectivamente, indicando que la duplicación génica que dio lugar a estos genes precede a la divergencia de las eudicotiledóneas superiores. Mientras los genes del linaje *TM6* conservaron el motivo paleoAP3 y la región C-terminal del antecesor *paleoAP3*, los genes del linaje *euAP3* derivaron en un nuevo motivo, llamado euAP3 (revisado en Kramer *et al.*, 2006). *MtTM6* muestra características sinapomórficas comunes con miembros del linaje *TM6*, como la presencia del motivo paleoAP3. Además, la proteína MtTM6 presenta alta homología con proteínas representativas del linaje *TM6* y se agrupa filogenéticamente con las mismas. Por otro lado, *MtNMH7* presenta el motivo euAP3 y la proteína MtNMH7 se localiza en el grupo monofilético que incluye proteínas de tipo euAP3.

Los miembros del linaje *TM6* son los genes de clase B menos estudiados, ya que no tienen ortólogos en las especies modelo *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* (Lamb e Irish, 2003). Hasta hoy, no se han descrito patrones de expresión para homólogos de *TM6* en leguminosas. Los estudios funcionales más detallados de los genes *TM6* se han realizado principalmente en solanáceas como *Petunia x hybrida* (Rijkema *et al.*, 2006) o *Solanum lycopersicum* (de Martino *et al.*, 2006). En éstas especies, que presentan genes tanto del linaje *TM6* como del *euAP3*, se ha visto que los genes *TM6* están involucrados en el desarrollo de estambres pero no de pétalos, mientras que los *euAP3* juegan un papel tanto en el desarrollo de pétalos como de estambres (de Martino *et al.*, 2006; Rijkema *et al.*, 2006). Los genes *TM6* (o *TDR6*) de *Solanum lycopersicum* (de Martino *et al.*, 2006) y *GDEF1*, el gen *TM6* de *Gerbera hybrida* (Broholm *et al.*, 2010), muestran una expresión débil restringida a los márgenes laterales de los pétalos, aunque no siguen este patrón en los estambres. Se ha sugerido que los genes *paleoAP3* (como los *TM6*) no son capaces de especificar completamente la identidad de los pétalos, pero pueden tener papeles secundarios en la diferenciación de los tipos celulares de éstos órganos (Kramer e Irish, 1999, 2000). *MtTM6*, el ortólogo de *TM6* en *Medicago truncatula*, se expresa de manera restringida en la capa celular externa tanto de pétalos como de estambres, indicando que este gen posiblemente está involucrado en la diferenciación de los tipos celulares de la epidermis de los órganos tanto de segundo como de tercer verticilo.

*MtTM6* se expresa también en la zona del meristemo floral que da lugar al carpelo, durante los primeros estadios de desarrollo floral, aunque esta expresión es transitoria y desaparece tras el estadio 5 de la ontogenia floral. La expresión en cuarto verticilo se ha descrito para los genes *TM6*-like de *Gerbera hybrida* (Broholm *et al.*, 2010), *Petunia x hybrida* (Rijkema *et al.*, 2006), *Solanum lycopersicum* (de Martino *et al.*, 2006) o *Vitis vinifera* (Poupin *et al.*, 2007), pero aún se desconoce si esta expresión es funcionalmente relevante.

Los genes de clase B representativos del linaje *euAP3* son *AP3* de *Arabidopsis thaliana* y *DEF* de *Antirrhinum majus*. La expresión de estos genes está restringida a los órganos del segundo y tercer verticilo. Este patrón de expresión se ha observado también para otros genes ortólogos *euAP3* en eudicotiledóneas superiores como *Malus domestica* (Yao *et al.*, 2001) o *Petunia x hybrida* (Vandenbussche *et al.*, 2004). En leguminosas se ha

descrito la expresión de *LjAP3* (*euAP3*) en *Lotus japonicus*, siendo también específica de pétalos y estambres (Hecht *et al.*, 2005.). El ortólogo *euAP3* de *Medicago truncatula*, *MtNMH7*, se expresa específicamente en pétalos y estambres, en toda la extensión de estos órganos exceptuando la capa celular externa de los mismos. La expresión en estos órganos sugiere la implicación de *MtNMH7* en la especificación de los órganos de segundo y tercer verticilo y es típica para los genes de clase B.

Se ha propuesto que los genes de clase B podrían haber adquirido nuevas funciones además del control de la identidad de los órganos florales, ya que se expresan en otros tejidos (Zahn *et al.*, 2005b; Páez-Valencia *et al.*, 2008). En el caso de las leguminosas algunos de estos genes pueden estar involucrados en el desarrollo de nódulos de raíz fijadores de nitrógeno: el gen *MsNMH7* inicialmente se describió como específico de nódulos de *Medicago sativa* (Heard y Dunn, 1995), aunque posteriormente se comprobó su expresión en tejido floral (Zucchero *et al.*, 2001) y *GmNMH7* de *Glycine max* presenta una expresión tanto en flores en desarrollo como en nódulos (Wu *et al.*, 2006). En *Medicago truncatula*, *MtNGL9*, gen homólogo a *PI/GLO*, también presenta expresión en nódulos, aunque no se ha demostrado su función en estos órganos (Benlloch *et al.*, 2009). La expresión en diferentes tejidos reflejaría un proceso de neofuncionalización durante la evolución de genes duplicados, que resulta de modificaciones en las regiones reguladoras de una o ambas copias (Sidow, A., 1996). Los miembros del linaje *AP3/DEF* estudiados en el presente trabajo, *MtTM6* (*TM6*) y *MtNMH7* (*euAP3*) presentan patrones de expresión específicos de flor y no se detecta expresión en ningún órgano vegetativo de la planta. Es posible que tras la duplicación que dio lugar a estos genes, sus regiones reguladoras se hayan modificado, conllevando la pérdida de expresión en nódulos.

Tanto *MtTM6* como *MtNMH7* se expresan únicamente en tejido floral, en los órganos del segundo y tercer verticilo. Se observa que ambos se complementan espacialmente dentro de los pétalos y los estambres: mientras el transcrito de *MtNMH7* se acumula en los tejidos internos de estos órganos, *MtTM6* lo hace en la periferia de los mismos. Estos resultados sugieren que los parálogos *MtNMH7* y *MtTM6*, podrían haber sufrido un proceso de subfuncionalización reguladora, ya que se observa expresión diferencial de los genes *MtTM6* y *MtNMH7* en cuanto a su localización tisular. Ambos genes han

experimentado una especialización de sus diferentes subfunciones, pudiendo ser necesaria la actividad combinada de ambos para satisfacer la función del locus ancestral.

Actualmente se está realizando un estudio funcional exhaustivo de *MtTM6* y *MtNMH7*, que complementará los resultados de expresión génica y generará información importante acerca de la función de los genes MADS-box de clase B en el desarrollo de pétalos y estambres en *Medicago truncatula*.





---

## CAPÍTULO II

---

**C**ARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR Y  
FUNCIONAL DE  
LOS GENES *MtAGa*  
Y *MtAGb* DE  
*Medicago*  
*truncatula*

---



---

# **CAPÍTULO II**

---

## **R**ESULTADOS

---



## 1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LOS GENES *MtAGa* Y *MtAGb* DE *Medicago truncatula*

Como se comentó en el capítulo anterior, en el escrutinio de una genoteca de cDNA de ápices florales se aislaron tres clones de cDNA cuyas secuencias corresponden a genes del grupo *AGAMOUS* (*AG*) del linaje C (ver apartado 1.5.1, Resultados Capítulo I). Uno de ellos, el clon 14.4.1 (*MtSHP*), pertenece al linaje *PLE* y es el ortólogo en *Medicago truncatula* de los genes *SHATTERPROOF1* (Ma *et al.*, 1991; Flanagan *et al.*, 1996) y *SHATTERPROOF2* (Ma *et al.*, 1991; Savidge *et al.*, 1995) de *Arabidopsis thaliana* (ver apartados 1.5.2 y 1.5.3, Resultados Capítulo I).

Los otros dos clones aislados, el 12.11.1 (*MtAGa*) y el 15.5.1 (*MtAGb*), pertenecen al linaje *euAG* y presentan homología de secuencia con *AGAMOUS* (*AtAG*; Bowman *et al.*, 1989) de *Arabidopsis thaliana* y *FARINELLI* (*FAR*, Davies *et al.*, 1999) de *Antirrhinum majus*. Como se mencionó anteriormente, los genes del linaje *euAG* se encuentran representados en la mayoría de las plantas modelo por un único gen. Sin embargo, tanto en *Medicago truncatula* como en otras leguminosas (*Pisum sativum*, Berbel *et al.*, comunicación personal; *Lotus japonicus*, Dong *et al.*, 2005) se ha observado la presencia de dos genes parálogos que parecen ser el resultado de una duplicación reciente de dicho gen *euAG*.

El estudio extensivo de estos genes del linaje *euAG* duplicados en *Medicago truncatula* permitirá ver si presentan diversificación funcional y de qué tipo. Además, ayudará a comprender el proceso de desarrollo reproductivo en ésta y otras leguminosas.

### 1.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES *MtAGa* Y *MtAGb* DE *Medicago truncatula*

#### 1.1.1 Análisis de las secuencias proteicas de *MtAGa* y *MtAGb*

El clon 12.11.1 (*MtAGa*), de 1208 pb, tiene una región 5' no traducida de 131 pb, una pauta de lectura abierta de 780 pb que codifica una proteína de 260 aminoácidos, un codón de parada de traducción TGA y una región 3' no traducida de 294 pb. La proteína

deducida MtAGa tiene un peso molecular calculado de 29,67 kDa y un PI teórico de 9,71. La secuencia de nucleótidos de *MtAGa* y su traducción en aminoácidos se representa en la Figura 53.

3	CTTCTTCTTGTGAAATAAGTAGAAAAAGAGAAAAGAAAAAACATCAAGAGCTAGCTG	62
63	AAACATCTCTCTTCTGTGTAACCTTAATTATATTCTCTTTTGTTCCTCACACAAAGC	122
1	<b>M D F P N E S M S D S P Q R K I G</b>	17
123	TTGGAAGCTATGGATTTTCCAAATGAATCCATGTCAGATTCTCCACAGAGAAAAGATTGGA	182
18	<b>R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C</b>	37
183	AGGGGAAAGATTGAGATCAAAAGGATTGAAAACACGACGAATCGTCAAGTAACTTTCTGC	242
38	<b>K R R N G L L K K A Y E L S V L C D A E</b>	57
243	AAAAGAAGAAATGGTTTGTGAAAGAAAGCATATGAATTATCTGTCTTTGTGATGCAGAA	302
58	<b>V A L I V F S S R G R L Y E Y A N N S V</b>	77
303	GTTGCTCTTATAGTCTCTCTAGCCGTGGACGGCTCTATGAGTATGCTAATAACAGTGTC	362
78	<b>K E T I A R Y K K A C S D S S G T G S A</b>	97
363	AAAGAGACTATTGCAAGGTACAAAAAGCATGTTTCAGATTTCATCTGGCACTGGATCTGCT	422
98	<b>T E A N A Q F Y Q Q E A D K L R V Q I S</b>	117
423	ACTGAGGCTAATGCTCAGTTTACCAGCAAGAGGCAGACAAATTGCGTGTGCAAAATTAGT	482
118	<b>N L Q N N N R Q M M G E S L G S M N A K</b>	137
483	AACCTGCAGAAATAACAACAGGCAAAATGATGGGTGAATCTTTGGGCTCTATGAATGCCAAG	542
138	<b>E L K N L E S K L E K G I S R I R S K K</b>	157
543	GAAGTGAATACTGGAGTCTAAATTAGAAAAAGGAATTAGTCGGATTTCGTTCCAAAAAG	602
158	<b>N E L L F A E I E Y M Q K R E I D L H N</b>	177
603	AATGAGCTGTTATTTGCTGAAATGAATACATGCAGAAGAGGGAGATAGACTTGCACAAT	662
178	<b>N N Q L L R A K I A E S E R N H S H H S</b>	197
663	AACAACCAACTTCTGAGAGCAAAGATAGCTGAAAGTGAGAGGAACCATAGCCACCATAGC	722
198	<b>N I N M S M L P G G T N Y E P M Q S Q N</b>	217
723	AATATTAATATGAGTATGTTGCCTGGAGGCACAACTATGAACCTATGCAGTCTCAGAAT	782
218	<b>Q Q Q Q Y E S R G Y F Q V S G L Q S S S</b>	237
783	CAGCAGCAGCAATATGAGTCTCGTGGATACTTTCAAGTTTCTGGATTACAATCCAGTAGT	842
238	<b>S Q M T A L Q P S S Q Y A R Q D H M S L</b>	257
843	AGTCAAATGACTGCATTACAACCAAGTAGTCAGTATGCAAGACAAGACCACATGTCCCTT	902
258	<b>Q L V *</b>	260
903	CAATTAGTTTGATATATTTGTGCTTGAGAGAAGTATGAAAGACCTGTAATTTGCTTCCTA	962
963	GTATATGGTTATGATAATGATGATTATGATGATAGCAGATGAGTGCTAAGAGTAATATAT	1022
1023	ATATATATATATAAGAAAAATTGAGCAGGGTTTGTAAAGTATGCCCTAATGAGTACTAT	1082
1083	TTAGTGGCTTTGTAGACATTTTAAGACATTTTCTGTAACCTATTATTATGAAATGCTTTC	1142
1143	TGATATGTGTCCCTAAGATTATGGAAAAGACACATTGAAATGTTTGTCAAAAAAAAAAAAA	1202
1203	AAAAAA	1208

**Figura 53. Secuencia del clon *MtAGa*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.

El clon 15.5.1 (*MtAGb*), de 1099 pb, presenta una región 5' no traducida de 46 pb, una pauta de lectura abierta de 732 pb, un codón de parada de traducción TAA y una región 3' no traducida de 318 pb. La proteína deducida MtAGb, de 244 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de 28,1 kDa y un PI teórico de 9,75. En el escrutinio de la genoteca también se aisló el clon 14.7.2, cuya secuencia es idéntica a la del clon

*MtAGb*, solo que carece de un fragmento interno de 42 pb (14 aminoácidos en pauta de lectura de la proteína *MtAGb*) que está presente en el clon *MtAGb*. La existencia de un segundo transcrito más corto sugiere que durante el procesamiento el RNA mensajero puede sufrir *splicing* alternativo, dando lugar a dos transcritos diferentes. En la Figura 54 se muestran la secuencia de nucleótidos y la traducida de aminoácidos de *MtAGb*, así como el fragmento ausente en el clon 14.7.2.

1		M S F P N	5
2	TTAATTTTCTCTCCATTTTGTTCATCACCAAAAAGGTTGAAACTATGAGT		61
6	<b>E S M P D S P Q R A K I G R G K I E I K</b>		25
62	GAATCCATGCCAGATTCTCCACAGAGAGCAAAGATTGGAAGAGGGAAGATTGAGATCAAG		121
26	<b>R I E N T T N R Q V T F C K R R N G L L</b>		45
122	AGGATTGAGAACACAACGAATCGTCAAGTTACGTTCTGCAAGCGTAGAAATGGCTTGCTT		181
46	<b>K K A Y E L S V L C D A E V A L I V F S</b>		65
182	AAGAAGGCATATGAATTATCTGTGCTTTGTGATGCTGAAGTTGCTCTTATAGTCTTCTCG		241
66	<b>T R G R L Y E Y A N N S V K A S I E R Y</b>		85
242	ACTCGCGGCCCTCTATGAATATGCAAATAACAGTGTCAAAGCATCAATTGAGAGGTAC		301
86	<b>K K A C S D S S G A K S A S E S N V Q Y</b>		105
302	AAGAAAGCATGTTTCTGATTTCTTCTGGTGC'AAATCAGCTTCTGAGTCTAATGTTTCTAGTAT		361
106	<b>Y Q Q E A A K L R V Q I S N L Q N H N R</b>		125
362	TACCAGCAAGAAGCTGCCAAACTGCGTGTGCAAATCAGTAACTGTCAGAAATCATAACAGG		421
126	<b>Q M M G E S L S N M N G K D L R N L E S</b>		145
422	CAAATGATGGGTGAATCTTTGAGCAATATGAATGGTAAGGATCTCAGAAACCTTGAGAGT		481
146	<b>K L E K G I S R I R S K K N E M L F A E</b>		165
482	AAATTAGAAAAGGAATTAGCAGAATTCGTTCCAAGAAGAATGAAATGCTGTTTGCAGAA		541
166	<b>L E Y M Q K R E V E L H N S N Q V L R A</b>		185
542	CTTGAGTACATGCAGAAGAGGGAGGTAGAGTTGCATAATAGTAACCAAGTTCTTAGAGCA		601
186	<b>K I S E S E Q R S N H N V N V L P G G T</b>		205
602	AAGATATCAGAAAGTGAGCAGAGGAGCAACCATAATGTTAATGTGTTGCCTGGGGCACA		661
206	<b>S F E C M Q P Q Q Q F D S R G Y F Q V N</b>		225
662	AGCTTTGAATGCATGCACCTCAGCAGAGTTTCGACTCTCGTGGCTACTTCCAAGTGAAC		721
226	<b>E L Q P N D Q Y A R Q D Q M S L Q F V *</b>		244
722	GAATTACAACCCAATGATCAGTATGCCAGGCAAGATCAGATGTCTCTCAATTTGTGTAA		781
782	GTTGATCGATGTGTTTCGCGGTTGAGAAGAGCAAAGACTTAGATTTTCTGTATTATTGTAA		841
842	ATGGGAATCTTATGATAACAGATGGCTAAATGAAATATAAGCAGAAGTATGTGTAGGGGA		901
902	TTTATTTAACAACCTTCCCTTCAAACCTATGTAGTGGCTTTGTATCTATCTATATATTTGTG		961
962	AAAGCTTCTATGACCTATTTAGCTTGTCTACCAAGACATTGAGTATGGAGATTACACATT		1021
1022	GGCATGTATCAACCTTATTCTACTTCCATATTTCCAAATTTACAATATCAATTTTACTA		1081
1082	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		1099

**Figura 54. Secuencia del clon *MtAGb*.** Se subrayan los codones de inicio y finalización de la transcripción; en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. En gris se indica el fragmento de 42 pb ausente en el clon 14.7.2.

Las secuencias proteicas de *MtAGa* y *MtAGb* se han colocado en el árbol filogenético de la Figura 55. Este árbol se ha generado utilizando secuencias proteicas codificadas por genes pertenecientes al grupo *AG* descritos en diferentes especies, incluyendo leguminosas como *Pisum sativum*, *Lotus japonicus* y *Glycine max*. También se ha incluido

el clon *MtSHP* (descrito previamente; ver apartados 1.5.2 y 1.5.3, Resultados Capítulo I) y otros representantes del linaje *PLE*.

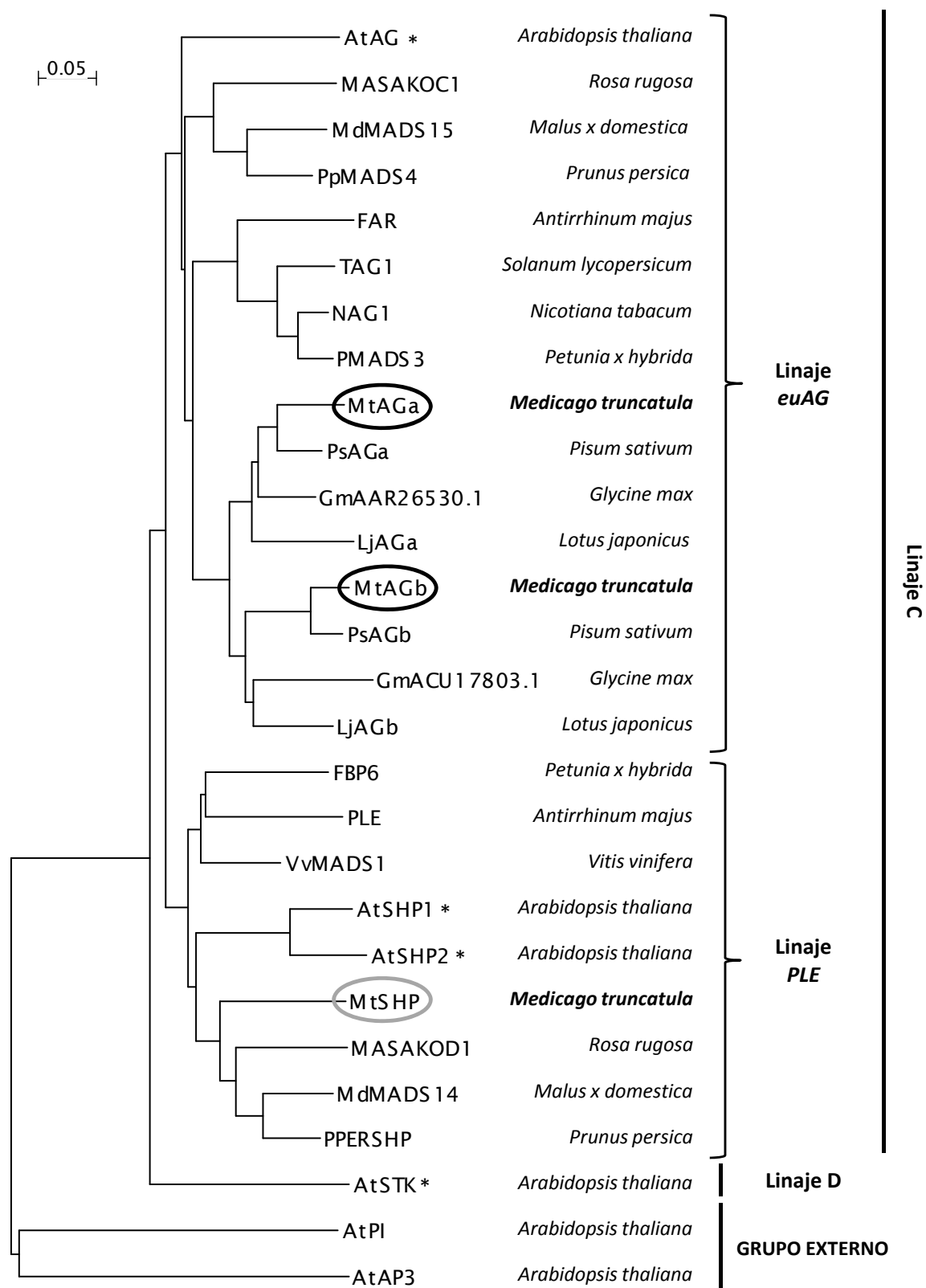


Figura 55. Árbol filogenético de las secuencias proteicas predichas para genes del grupo AG.



*MtAGa* y *MtAGb* se agrupan con genes pertenecientes al linaje *euAG* (Figura 55). Este linaje está representado por *AtAG* de *Arabidopsis thaliana* y *FAR* de *Antirrhinum majus*. Además, incluye genes homólogos a *AtAG/FAR* de otras especies modelo como *Rosa rugosa* (*MASAKOC1*), *Malus x domestica* (*MdMADS15*), *Prunus persica* (*PpMADS4*), *Solanum lycopersicum* (*TAG1*), *Nicotiana tabacum* (*NAG1*) o *Petunia x hybrida* (*PMADS3*). Dentro del linaje *euAG*, *MtAGa* y *MtAGb* están incluidos en un subgrupo que únicamente contiene genes de leguminosas. En este subgrupo, *MtAGa* forma una rama con sus ortólogos: *PsAGa* de *Pisum sativum*, *LjAGa* de *Lotus japonicus* y *GmAAR26530.1* de *Glycine max*; *MtAGb* se agrupa con sus respectivos ortólogos: *PsAGb* de *Pisum sativum*, *LjAGb* de *Lotus japonicus* y *GmACU17803.1* de *Glycine max*. Este subgrupo está más alejado filogenéticamente de los genes *FAR*, *AtAG* y sus respectivos ortólogos en otras plantas modelo.

Las proteínas *MtAGa* y *MtAGb* presentan entre sí un 81% de homología al comparar las secuencias completas de polipéptidos. Presentan un 98% de homología en la región correspondiente a la caja MADS, 76% en la región I, 80% en la región de la caja K y 68% en la región C-terminal. En la Tabla 19 se muestran los porcentajes de homología de *MtAGa* y *MtAGb* con proteínas codificadas por genes del grupo AG de las leguminosas *Pisum sativum*, *Lotus japonicus* y *Glycine max*, así como *FAR* de *Antirrhinum majus* y *AtAG* de *Arabidopsis thaliana*.

---

**Figura 55. Árbol filogenético de las secuencias proteicas predichas para genes del grupo AG.** Se utilizó la secuencia proteica íntegra de las siguientes proteínas: *Arabidopsis thaliana*: *AtAG* (Bowman *et al.*, 1989; Acc NP\_567569.3), *AtSHP1*, *AtSHP2* (Ma *et al.*, 1991; Acc NP\_191437.1, NP\_565986.1), *AtSTK* (Rounsley *et al.*, 1995; Acc NP\_192734.1), *Petunia x hybrida*: *FBP6* (Angenent *et al.*, 1993; Acc CAA48635.1), *PMADS3* (Tsuchimoto *et al.*, 1993; Acc CAA51417.1); *Antirrhinum majus*: *FAR* (Davies *et al.*, 1999; Acc CAB42988.1), *PLE* (Bradley *et al.*, 1993; Acc AAB25101.1); *Pisum sativum*: *PsAGa* (Berbel *et al.*, unpublished), *PsAGb* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001; Acc AAX69069.1); *Lotus japonicus*: *LjAGa*, *LjAGb* (Dong *et al.*, 2005; Acc AAX13303.1, Acc AAX13304.1); *Glycine max*: *GmAAR26530.1* (Huang *et al.*, unpublished; Acc AAR26530.1), *GmACU17803.1* (Cheung *et al.*, unpublished; Acc ACU17803.1); *Malus x domestica*: *MdMADS14*, *MdMADS15* (Van der Linden *et al.*, 2002; Acc CAC80857.1, Acc CAC80858.1); *Vitis vinifera*: *VvMADS1* (Boss *et al.*, 2001; Acc AAK58564.1); *Prunus persica*: *PPERSHP* (Tani *et al.*, 2007; Acc ABG75908.1), *PpMADS4* (Wu *et al.*, 2004; Acc AAU29513.1); *Rosa rugosa*: *MASAKOD1*, *MASAKOC1* (Kitahara *et al.*, 2000; Acc BAA90743.1, Acc BAA90744.1); *Solanum lycopersicum*: *TAG1* (Pnueli *et al.*, 1994; Acc AAA34197.1); *Nicotiana tabacum*: *NAG1* (Kempin *et al.*, 1993; Acc AAA17033.1); *Medicago truncatula*: *MtAGa*, *MtAGb*, *MtSHP* (este trabajo). Las proteínas *MtAGa* y *MtAGb* se encierran en óvalos negros, *MtSHP* en un óvalo gris y las proteínas del grupo AG de *Arabidopsis thaliana* se señalan con un asterisco. El árbol se enraizó con *AtPI* y *AtAP3* de *Arabidopsis thaliana* (Acc NP\_197524.1, NP\_191002.1).

**Tabla 19. Porcentajes de homología (%) de aminoácidos entre diferentes regiones de a) MtAGa y proteínas del linaje euAG de leguminosas, *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana*, b) MtAGb y proteínas del linaje euAG de leguminosas, *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana***

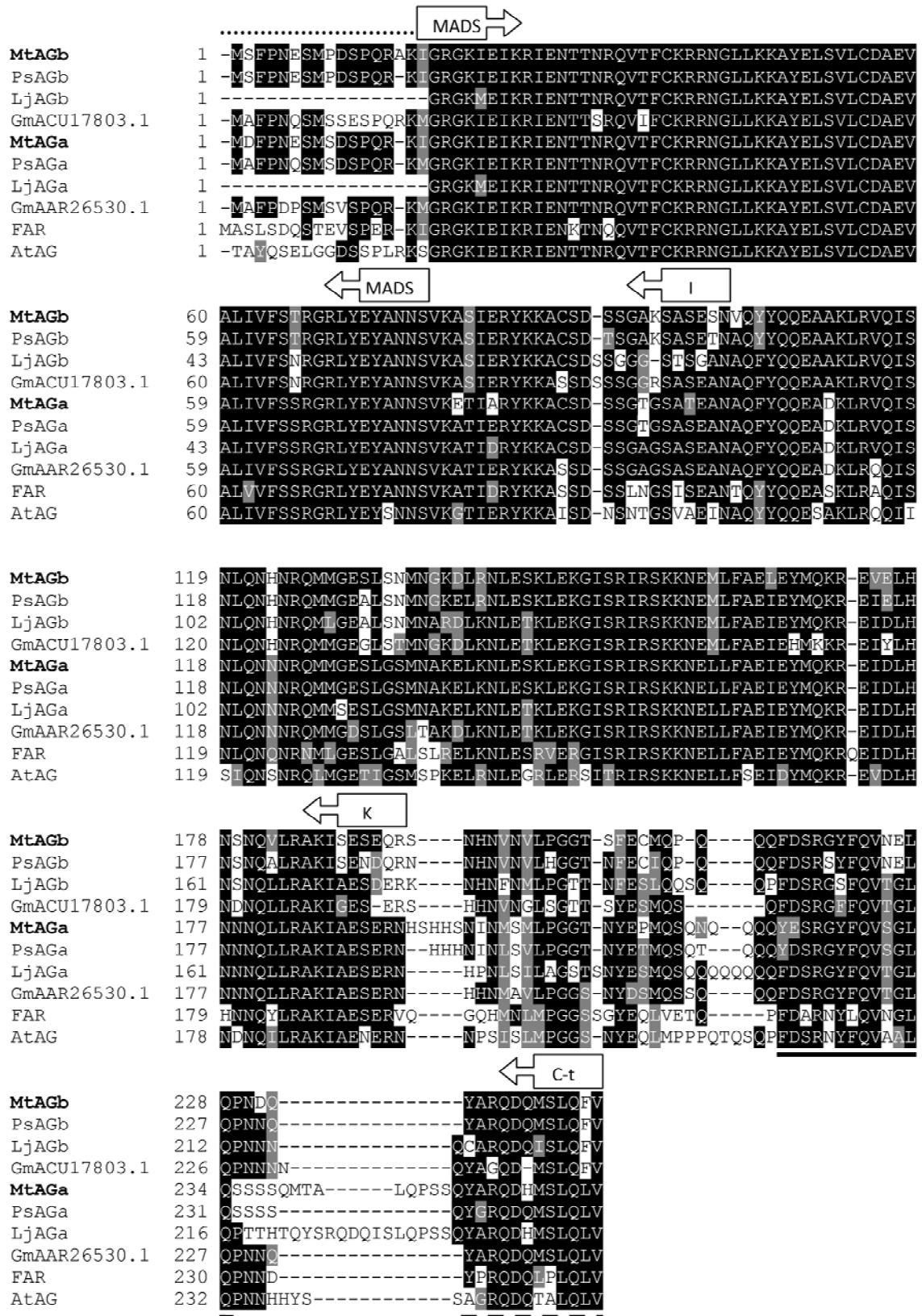
a) MtAGa	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>PsAGa</b>	<b>94</b>	98	88	100	85
<b>GmAAR26530.1</b>	<b>88</b>	98	84	93	72
<b>LjAGa</b>	<b>85</b>	98	88	97	64
<b>FAR</b>	<b>71</b>	95	72	80	40
<b>AtAG</b>	<b>67</b>	96	64	72	44

b) MtAGb	Secuencia completa	Caja MADS	Región I	Caja K	Región C-terminal
<b>PsAGb</b>	<b>93</b>	100	92	91	88
<b>LjAGb</b>	<b>82</b>	96	80	83	70
<b>GmACU17803.1</b>	<b>76</b>	93	84	82	63
<b>FAR</b>	<b>68</b>	93	68	70	50
<b>AtAG</b>	<b>67</b>	95	60	65	50

Ps: *Pisum sativum*; Lj: *Lotus japonicus*; Gm: *Glycine max*; FAR: FARINELLI de *Antirrhinum majus*; At: *Arabidopsis thaliana*

Dos proteínas de especies cercanas son consideradas ortólogas cuando presentan una homología de 75 – 90% (Dayhoff *et al.*, 1978). Según los porcentajes de homología de secuencia observados, se podría decir que MtAGa, PsAGa, LjAGa y GmAAR26530.1 son probablemente proteínas ortólogas, así como MtAGb, PsAGb, LjAGb y GmACU17803.1. Ambas proteínas de *Medicago truncatula* tienen una homología de 67 – 71% con las proteínas referentes del linaje euAG FAR de *Antirrhinum majus* y AtAG de *Arabidopsis thaliana*.

En la Figura 56 se representa un alineamiento múltiple entre MtAGa, MtAGb y las proteínas incluidas en la Tabla 19. Puede verse que todas ellas conservan en el extremo C-terminal residuos de dos motivos cortos altamente conservados en las proteínas del grupo AG, que han sido descritos por Kramer *et al.* (2004) y se denominan “AG motif I” y “AG motif II”. Otra característica común a los genes MADS-box del linaje “C” y que se observa en la Figura 56 es la presencia de una secuencia en la región N-terminal que precede al dominio MADS (Jager *et al.*, 2003). Estas características de secuencia, propias de las proteínas del grupo AG, se observaron también en la proteína de *Medicago truncatula* del linaje PLE, MtSHP (ver apartado 1.5.2, Resultados Capítulo I)



**Figura 56. Alineamiento de las secuencias proteicas de MtAGa, MtAGb y de genes MADS-box del linaje euAG, grupo AG, con las que presenta homología. Las regiones sombreadas corresponden a aminoácidos conservados. Los dominios MADS y K así como las regiones I y C-terminal se señalan con flechas. El motivo “AG motif I” se subraya con una línea continua y el motivo “AG motif II” con una línea discontinua. Una línea de puntos indica la secuencia N-terminal previa al dominio MADS característica de los genes de tipo “C”.**

### 1.1.2 Análisis de las secuencias genómicas de *MtAGa* y *MtAGb*

Se realizó una comparación de las secuencias de los clones *MtAGa* y *MtAGb* con las secuencias incluidas en diferentes bases de datos mediante BLAST. *MtAGa* está parcialmente contenido en la secuencia del EST s13dNF65G09GS068\_462456mth2-132a8 (GenBank CX539597.1). Esta secuencia incluye el fragmento 11 – 610 pb del clon *MtAGa*.

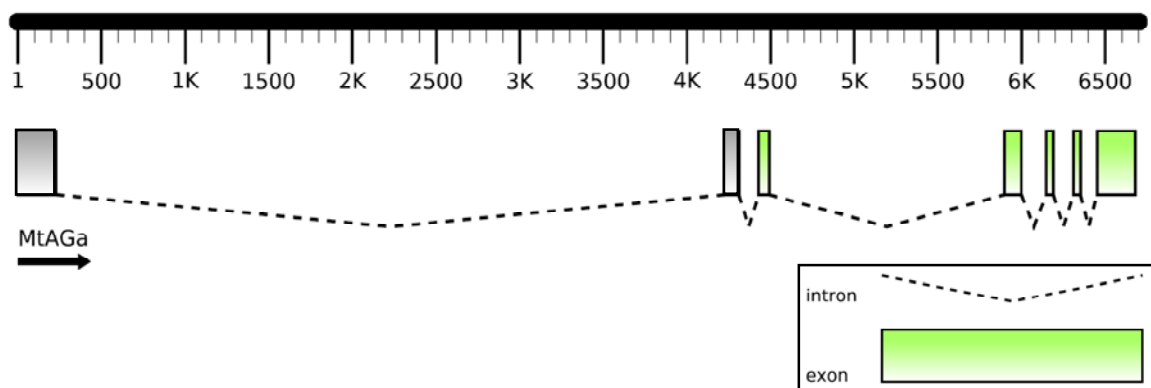
A día de hoy, la secuencia genómica de *MtAGa* no se encuentra en las bases de datos. Por ello, se ha intentado obtener esta secuencia mediante la amplificación de DNA genómico con los oligonucleótidos específicos que se describen en la Tabla 10 (Materiales y Métodos). Algunos autores han observado que los genes del grupo AG tienen una estructura intrón/exón particular (Tandre *et al.*, 1998; Rutledge *et al.*, 1998; Jager *et al.*, 2003). Incluso, las mismas posiciones de los intrones se han descrito en genes MADS-box no pertenecientes a este grupo (Sundström *et al.*, 1999), lo que sugiere que la estructura intrón/exón ha sido un rasgo muy conservado durante la evolución de los genes MIKC. (Jager *et al.*, 2003). Con estas premisas, se ha usado la estructura genómica de genes del grupo AG de leguminosas como punto de inicio para buscar intrones en *MtAGa*.

La secuencia genómica amplificada de *MtAGa* (Anexo 1) incluye los exones II (parcial), III – VII y los intrones correspondientes. Los intrones presentan los extremos esenciales esperados “GT–AG” (Mount, S.M., 1982), a excepción del intrón III, que presenta extremos “GC–AG” que son menos comunes (Kitamura-Abe *et al.*, 2004). Se intentó amplificar el fragmento de DNA genómico correspondiente a la región de los exones I y II, pero no hubo éxito en esta amplificación, posiblemente debido a la presencia de un intrón de gran tamaño, que se ha descrito en varios genes de clase C. En los genes homólogos a *AtAG*, este intrón tiene entre 3 – 5 kb de longitud (Brunner *et al.*, 2000). En leguminosas, los genes ortólogos de *MtAGa*, *LjAGa* (secuencia genómica chr6.CM0118.440.nd; <http://www.kazusa.or.jp/lotus/>) y *GmAAR26530.1* (secuencia genómica Glyma13g29510.1; <http://www.phytozome.net>), presentan entre los exones I y II un intrón de 4666 pb y 3972 pb, respectivamente. Considerando estos datos, a fin de poder representar gráficamente la estructura genómica de *MtAGa*, se ha supuesto la presencia de un intrón de ~4000 pb en el mismo sitio que en los dos genes ortólogos mencionados. Este patrón de intrones/exones de *MtAGa* está ilustrado en la Figura 57.

a)

Exón	Longitud (pb)	Intrón	Longitud (pb)
I	227	I	4000
II	82	II	119
III	62	III	1408
IV	100	IV	149
V	42	V	120
VI	42	VI	99
VII	228		

b)



**Figura 57. Estructura genómica del gen *MtAGa*.** a) Longitud, en pares de bases, de los exones e intrones de *MtAGa*. En gris se indican los tamaños supuestos de los exones e intrón no secuenciados. b) Diagrama de la estructura genómica de *MtAGa*. Los rectángulos representan exones y las líneas punteadas intrones. Los rectángulos grises y la línea punteada entre ellos conforman el fragmento no secuenciado. En ambos casos la numeración comienza en el primer nucleótido del codón de inicio de transcripción del cDNA y termina en el último nucleótido del codón de terminación del mismo.

El clon *MtAGb* se encuentra en dos secuencias de clones genómicos de *Medicago truncatula*: mth2-30e7 (GenBank AC137837.4), en el cual la secuencia genómica de *MtAGb* está ubicada en antisentido entre las bases 37.642 y 33.105, y mth2-76i7 (GenBank AC153460.24), en el cual se localiza en sentido entre las bases 81.433 y 85.970. Ambas secuencias son idénticas. *MtAGb* se divide en 7 exones (239, 82, 62, 100, 42, 42 y 178 pb) y 6 intrones. Todos los intrones presentan los extremos esenciales esperados “GT–AG” (Mount, S.M., 1982). La secuencia genómica que incluye la región codificante de *MtAGb* se encuentra en el Anexo 2.

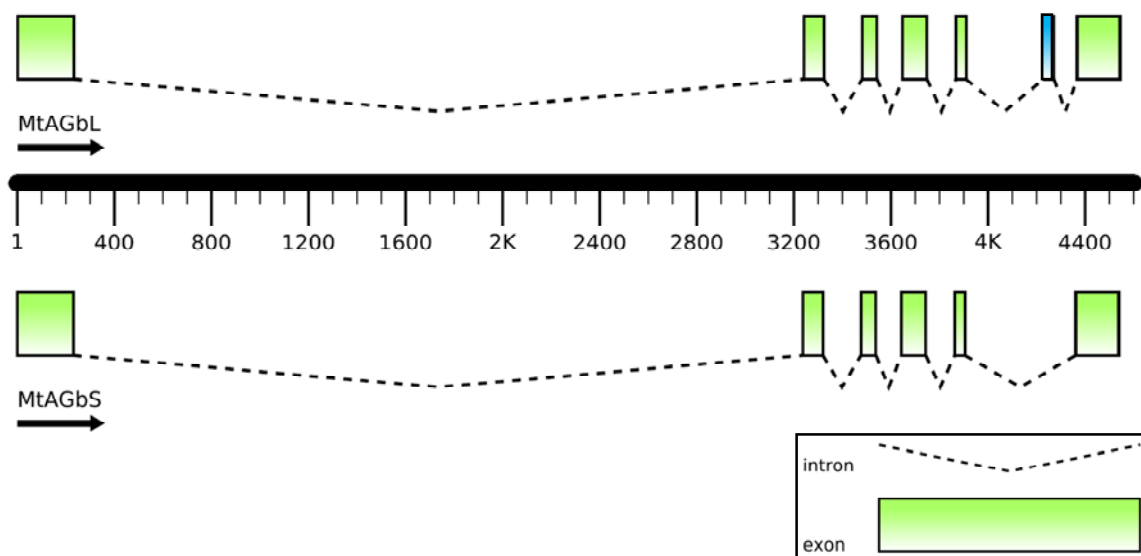
Como se mencionó previamente, en el escrutinio de la genoteca de cDNA de ápices florales además de aislar el clon *MtAGb* (15.5.1), también se aisló el clon 14.7.2, que carece de una región de 42 pb (14 aminoácidos), presente en *MtAGb*. Probablemente, ambos clones corresponden al mismo gen, *MtAGb*, que puede transcribirse de dos

maneras mediante un proceso de *splicing* alternativo. Estas dos formas han sido denominadas *MtAGbL* (“Long”, forma larga) y *MtAGbS* (“Short”, forma corta). En la Figura 58 se presenta un esquema de la estructura genómica de *MtAGb*, en el que se distinguen los dos posibles transcritos identificados.

a)

Exón	Longitud (pb)	Intrón	Longitud (pb)
I	239	I	3007
II	82	II	157
III	62	III	105
IV	100	IV	119
V	42	V	320
VI	42	VI	95
VII	178		

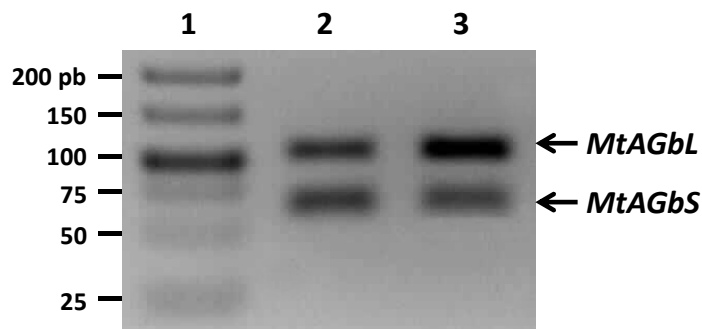
b)



**Figura 58. Estructura genómica del gen *MtAGb*.** a) Longitud, en pares de bases, de los exones e intrones de *MtAGb*. En gris se indica el exón que *MtAGbS* pierde por *splicing* alternativo. b) Diagrama de la estructura genómica de *MtAGbL* y *MtAGbS*. Los rectángulos representan exones y las líneas punteadas intrones. El rectángulo azul indica el exón que *MtAGbS* pierde por *splicing* alternativo. En ambos casos la numeración comienza en el primer nucleótido del exón que contiene el codón de inicio de transcripción del cDNA y termina en el último nucleótido del exón que contiene el codón de terminación del mismo.

Para confirmar que *MtAGbL* y *MtAGbS* son dos formas del gen *MtAGb* que efectivamente se transcriben a partir de DNA genómico de *Medicago truncatula*, se realizó una PCR utilizando como molde cDNA obtenido a partir de RNA total de ápices florales de *Medicago truncatula*. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos “MtAGb

splicing dir” y “MtAGb splicing rev” (ver Tabla 10, Materiales y Métodos), que amplifican desde el extremo 3’ del exón 5 hasta el extremo 5’ del exón 7. En esta amplificación, se obtuvieron fragmentos que indican que existen en efecto dos transcritos del gen *MtAGb* (Figura 59).



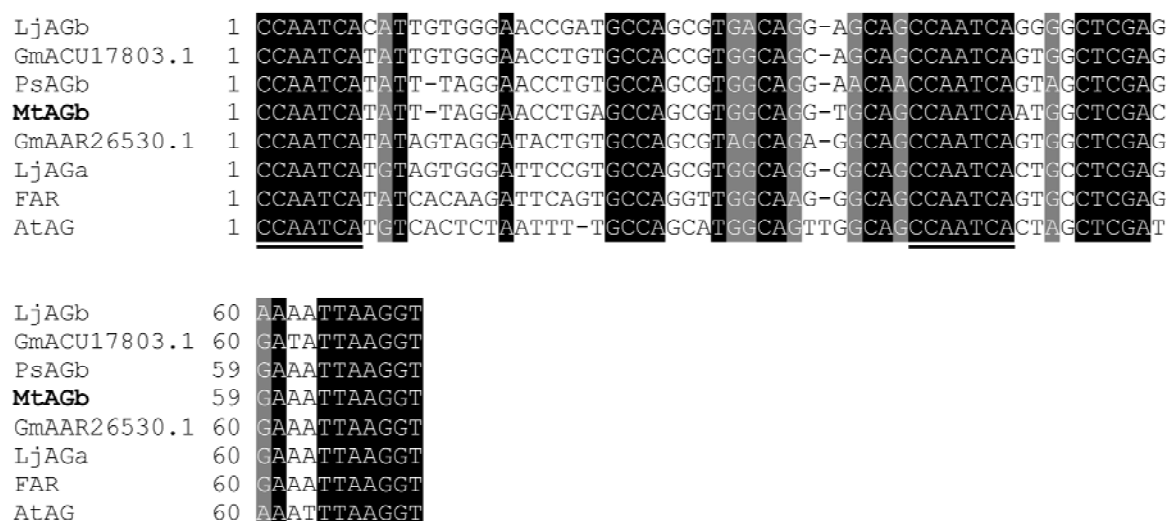
**Figura 59. Resultado de la amplificación de fragmentos de ambos transcritos de *MtAGb* utilizando como molde cDNA.** Carril 1: Marcador de peso molecular O’GeneRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas). Carriles 2 y 3: Dos muestras diferentes de cDNA. Se observa la presencia de los fragmentos de ambos transcritos de *MtAGb*.

*MtAGb* posee un intrón de 3007 pb (intrón I) situado tras el exón que contiene la caja MADS. Varios genes de clase C de diferentes plantas modelo como: *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Populus trichocarpa*, *Petunia x hybrida* o *Solanum lycopersicum*, también presentan un intrón de gran tamaño en la misma posición (Yanofsky *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 1993; Tsuchimoto *et al.*, 1993; Brunner *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2003). Hay evidencias que sugieren que este intrón es esencial para la correcta expresión de los genes del grupo AG, ya que contiene secuencias reguladoras de la transcripción que contribuyen al control de la expresión espacial y temporal (Sieburth y Meyerowitz, 1997; Busch *et al.*, 1999; Deyholos y Sieburth, 2000).

En la secuencia del intrón I de *MtAGb* se han encontrado cajas de unión de elementos reguladores. Se detectan tres secuencias consenso de sitio de unión de LFY (CCANTG[T/G]; Parcy *et al.*, 1998; Busch *et al.*, 1999) en las posiciones 1674, 2701 y 2952 del intrón (ver Anexo 2). Además, se utilizó el programa MORPHEUS (<http://biodev.cea.fr/morpheus/>) que identifica los sitios de unión de LFY en el intrón mediante la matriz de dicho factor de transcripción (Moyroud *et al.*, 2011). El programa identificó varios posibles sitios de unión, de los cuales los cuatro mejor puntuados (posiciones 1350, 1668, 2415 y 2946) se indican en el esquema de la secuencia genómica de *MtAGb* (ver Anexo 2). Cabe mencionar, que el sitio de unión de LFY mejor puntuado por el programa (TATATGCCATTGTCAAACA, posición 2946) coincide con una de las secuencias consenso identificadas inicialmente (posición 2952).

Las proteínas con dominio MADS se unen a secuencias de 10 pb conocidas como cajas CArG (CC[A/T]<sub>6</sub>GG; Dolan y Fields, 1991; Treisman, R., 1992; Shore y Sharrocks, 1995), cuya presencia se ha descrito en los intrones grandes de los ortólogos de AG estudiados (Hong *et al.*, 2003). El intrón I de *MtAGb* contiene dos cajas CArG en las posiciones 563 y 993. Además, se observa en la posición 1087 la presencia de un motivo llamado caja aAGAAT (secuencia consenso AGAATCTNTGNTNACGTCA), que se encuentra en los ortólogos de AG, a excepción de *PLE*, y que aún se desconoce su función (Hong *et al.*, 2003). Todas estas características se muestran en el Anexo 2.

Davies *et al.*, (1999) describen la presencia de una secuencia de 70 pb altamente conservada en los intrones consecutivos a la caja MADS en *FAR* (AJ239057), *PLE* (Bradley, Carpenter y Coen, unpublished), *AtAG* (ATF13C5) y *PTAG* (AF052570). También se ha encontrado en el intrón equivalente en *PsAGb* de *Pisum sativum* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001). Este fragmento incluye una repetición directa de la secuencia CCAATCA (Davies *et al.*, 1999), que es un sitio de unión para las proteínas que se unen a CCAAT- (Mantovani, R., 1998). En *MtAGb*, este fragmento se ha identificado en la posición 1745 – 1813 del intrón I, incluyendo también la repetición directa mencionada.



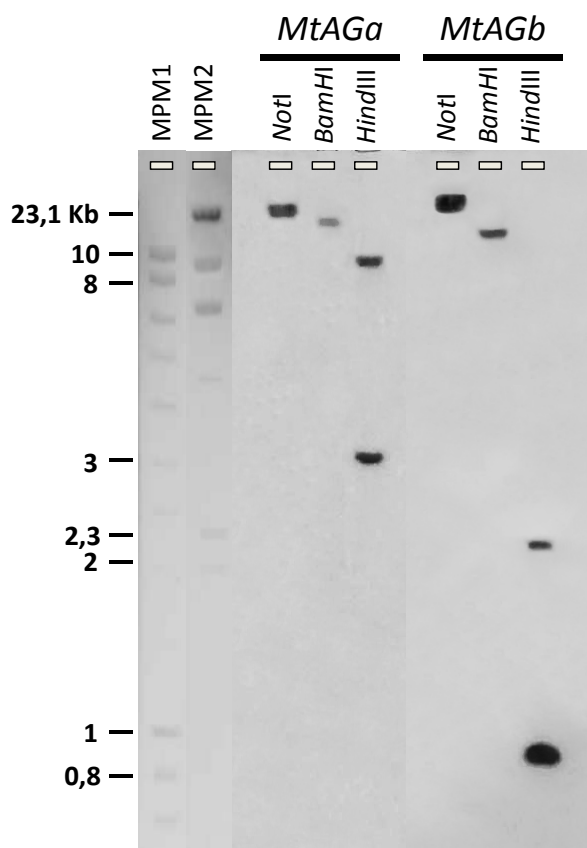
**Figura 60. Alineamiento del fragmento de 70 pb altamente conservado en el intrón I de *MtAGb* con otros genes del linaje euAG.** *MtAGb* de *Medicago truncatula* (Acc AC153460.24 y AC137837.4), *LjAGa* y *LjAGb* de *Lotus japonicus* (chr6.CM0118.440.nd, chr4.CM0046.1710.r2.m), *PsAGb* de *Pisum sativum* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001), *GmACU17803.1* y *GmAAR26530.1* de *Glycine max* (Glyma08g12730.1 y Glyma13g29510.1), *FAR* de *Antirrhinum majus* (Davies *et al.*, 1999; Acc AJ239057.1) y *AtAG* de *Arabidopsis thaliana* (Bevan *et al.*, unpublished; Acc AL021711.2). La secuencia “CCAATCA” repetida se subraya con una línea continua.



En la Figura 60 se muestra un alineamiento de este fragmento de 70 pb de *MtAGb* con los fragmentos equivalentes de *FAR* de *Antirrhinum majus* (Davies *et al.*, 1999), *AtAG* de *Arabidopsis thaliana* (Bevan *et al.*, unpublished), *LjAGa* y *LjAGb* de *Lotus japonicus* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>), *GmAAR26530.1* y *GmACU17803.1* de *Glycine max* (<http://www.phytozome.net>) y *PsAGb* de *Pisum sativum* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001).

### 1.1.3 Análisis Southern blot

Para determinar el número de copias de *MtAGa* y *MtAGb* en el genoma de *Medicago truncatula*, se realizó un análisis *Southern blot* utilizando DNA genómico del genotipo silvestre digerido con los enzimas de restricción *NotI*, *BamHI* y *HindIII*. Como sondas se utilizaron fragmentos de 241 pb y 215 pb de los clones *MtAGa* y *MtAGb*, respectivamente. Estos fragmentos incluyen los últimos nucleótidos de la caja K, el resto de región codificante, el codón de terminación y un fragmento de la región 3' no codificante. Los oligonucleótidos que amplifican estos fragmentos están especificados en la Tabla 10 (Materiales y Métodos). En la Figura 61 se muestra el resultado de este análisis.



**Figura 61. Análisis Southern blot de los genes *MtAGa* y *MtAGb*.** El DNA genómico de *Medicago truncatula* de genotipo silvestre se digirió con los enzimas *NotI*, *BamHI* y *HindIII* y se hibridó con las sondas *MtAGa* y *MtAGb*. MPM1 y MPM2 corresponden a dos marcadores de peso molecular distintos.

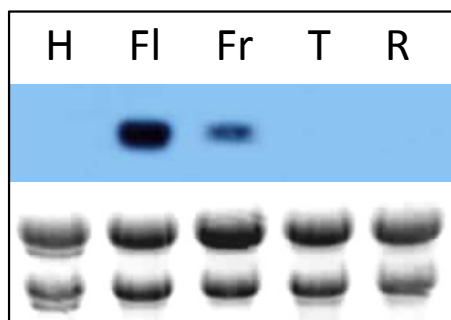
El patrón de una sola banda obtenido para la digestión con *NotI* y *BamHI* corresponde a lo esperado si los genes son de copia única. La presencia de dos bandas en el carril correspondiente a la digestión con *HindIII* se debe, en el caso de *MtAGb*, a la presencia de este sitio de restricción en la secuencia de la sonda. En *MtAGa* no se encuentra el sitio de restricción en la secuencia de la sonda, pero probablemente está incluido en un intrón localizado justo tras el codón de terminación del gen, ya que la secuencia genómica de la región 3' no codificante de este gen aún se desconoce.

#### 1.1.4 Patrón de expresión de *MtAGa* y *MtAGb*

Se analizó el patrón de expresión de ambos genes mediante hibridación *Northern blot* en diferentes tejidos de la planta (Figuras 62 y 65). Como sonda se usó la región C-terminal del cDNA de cada gen, que es la región más divergente entre ambos genes, a fin de evitar hibridación cruzada. El análisis del patrón de expresión tisular se realizó mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes y frutos jóvenes de *Medicago truncatula* (Figuras 63, 64, 66 y 67).

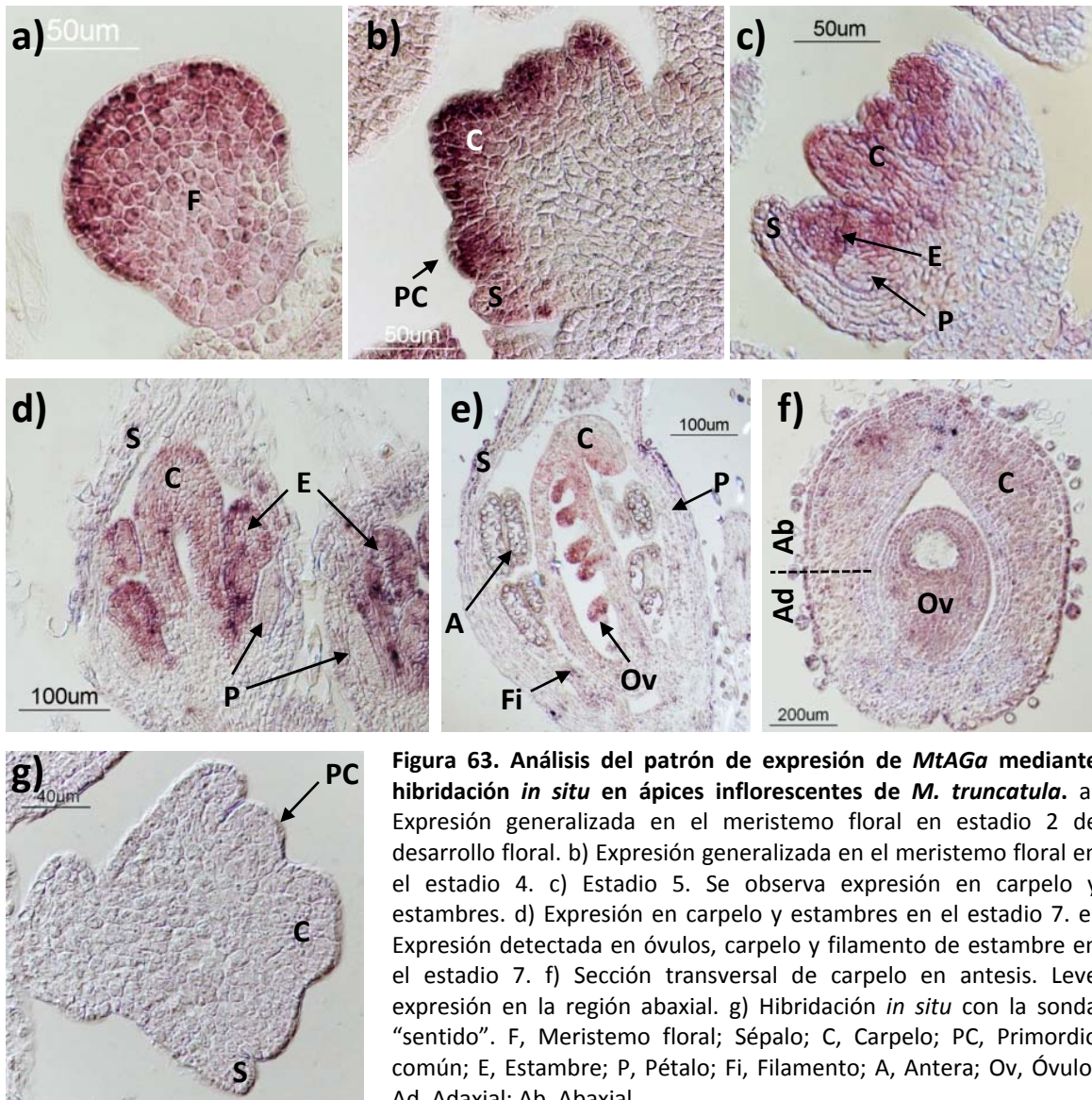
##### 1.1.4.1 Patrón de expresión de *MtAGa*

Mediante hibridación *Northern blot*, la expresión de *MtAGa* se detecta intensa en flores y leve en fruto. No se detecta en los demás tejidos analizados (Figura 62).



**Figura 62.** Análisis del patrón de expresión de *MtAGa* mediante *Northern blot*. Se utilizó RNA de diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R).

Los resultados de la hibridación *in situ* muestran que el transcrito de *MtAGa* se detecta en todo el meristemo floral desde el estadio 2 de desarrollo floral (Figura 63, a). En el estadio 4, cuando se han diferenciado los primordios comunes, *MtAGa* aún se expresa de manera general en el meristemo floral, aunque disminuye su intensidad en las capas internas del meristemo así como en los primordios de sépalo (Figura 63, b).

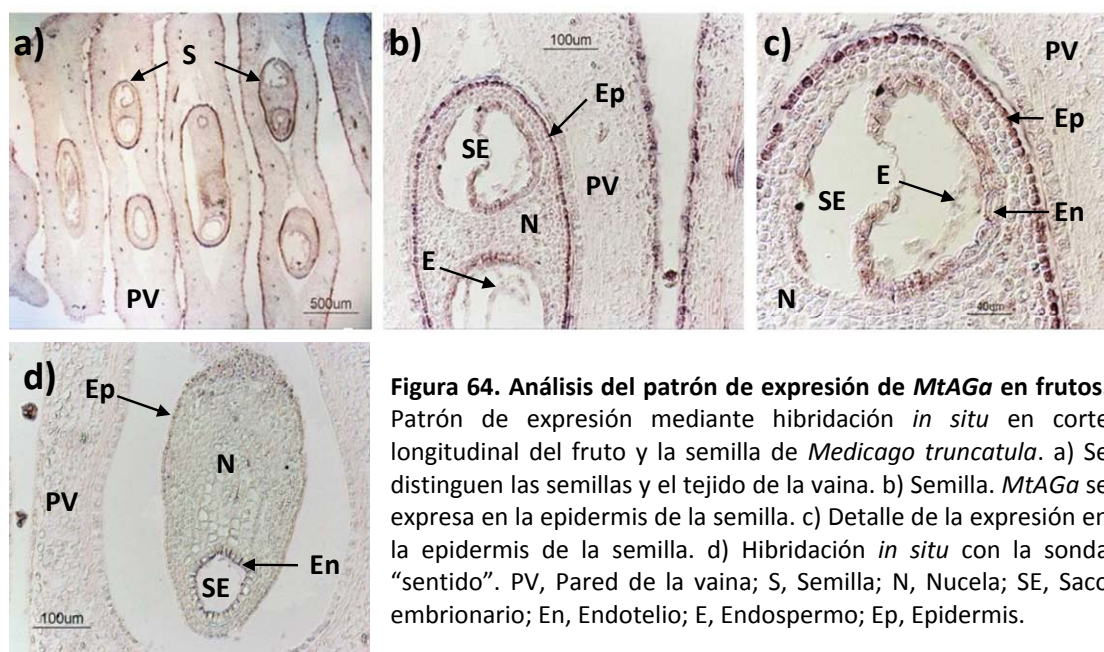


**Figura 63. Análisis del patrón de expresión de *MtAGa* mediante hibridación *in situ* en ápices inflorescentes de *M. truncatula*.** a) Expresión generalizada en el meristemo floral en estadio 2 de desarrollo floral. b) Expresión generalizada en el meristemo floral en el estadio 4. c) Estadio 5. Se observa expresión en carpelo y estambres. d) Expresión en carpelo y estambres en el estadio 7. e) Expresión detectada en óvulos, carpelo y filamento de estambre en el estadio 7. f) Sección transversal de carpelo en antesis. Leve expresión en la región abaxial. g) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. F, Meristemo floral; S, Sépalo; C, Carpelo; PC, Primordio común; E, Estambre; P, Pétalo; Fi, Filamento; A, Antera; Ov, Óvulo; Ad, Adaxial; Ab, Abaxial.

Cuando en el estadio 5 se diferencian los primordios de pétalos y estambres, la expresión se observa en el carpelo y en los primordios de estambre, no detectándose en sépalos ni en primordios de pétalo (Figura 63, c). Durante el estadio 6 la expresión de *MtAGa* se mantiene en los órganos del tercer y cuarto verticilo (Figura 63, d). Finalmente, en el estadio 7, tras la diferenciación de las anteras, la expresión se detecta principalmente en los óvulos, aunque puede observarse expresión leve en la región distal del carpelo y en los filamentos de estambres (Figura 63, e). En algunas secciones de flores en estadios 6 – 7 pudo observarse que la expresión tendía a ser más intensa en la mitad longitudinal correspondiente a la región abaxial del carpelo. Debido a la dificultad para manipular las flores en dichos estadios, se hibridaron *in situ* cortes transversales de carpelos de flores en antesis para corroborar este resultado. En general,

la expresión de *MtAGa* en estos tejidos es leve, aunque puede detectarse mayor concentración de transcrito en la región abaxial del carpelo y en los óvulos (Figura 63, f). No se detectó señal de hibridación en ninguna sección de tejido hibridada con la sonda “sentido”, utilizada como control negativo (Figura 63, g).

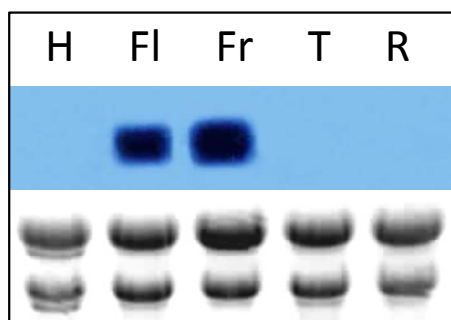
También se realizaron hibridaciones *in situ* en frutos de *Medicago truncatula* en el estadio de desarrollo “Pod age: 6 DPP (días post-polinización)” (Wang y Grusak, 2005). En la Figura 64 (a-c) se muestra un corte longitudinal paralelo al eje de enrollado del fruto, en el que puede verse la expresión del gen concentrada en la epidermis de la semilla. No se detectó ninguna señal de hibridación en tejido hibridado con la sonda “sentido” (Figura 64, d).



**Figura 64. Análisis del patrón de expresión de *MtAGa* en frutos.** Patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en corte longitudinal del fruto y la semilla de *Medicago truncatula*. a) Se distinguen las semillas y el tejido de la vaina. b) Semilla. *MtAGa* se expresa en la epidermis de la semilla. c) Detalle de la expresión en la epidermis de la semilla. d) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. PV, Pared de la vaina; S, Semilla; N, Nucela; SE, Saco embrionario; En, Endotelio; E, Endospermo; Ep, Epidermis.

#### 1.1.4.2 Patrón de expresión de *MtAGb*

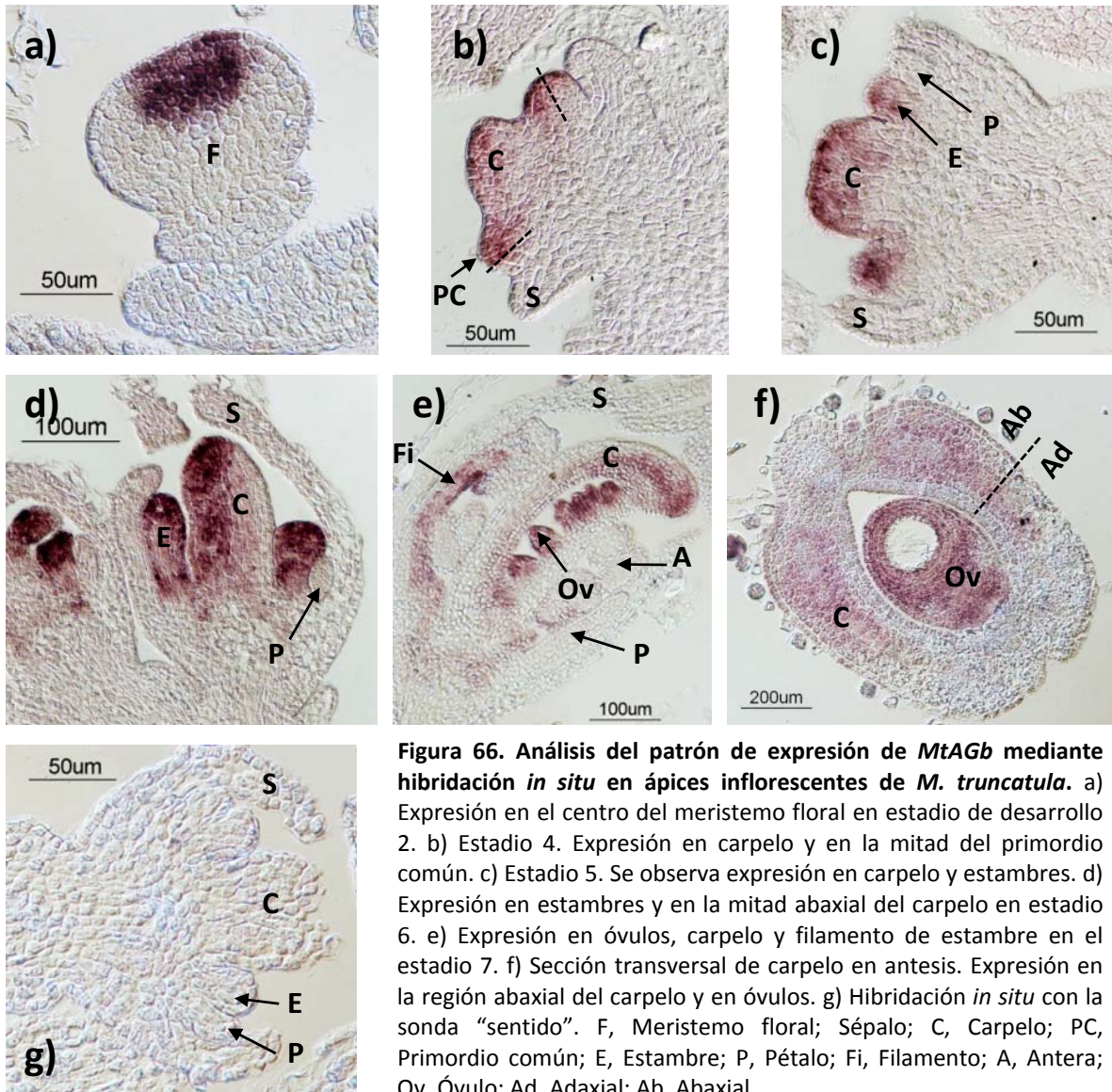
La expresión de *MtAGb*, analizada mediante *Northern blot*, se detecta en flores y frutos. No se detecta en los demás tejidos analizados (Figura 65).



**Figura 65. Análisis del patrón de expresión de *MtAGb* mediante *Northern blot*.** Se utilizó RNA de diferentes tejidos de la planta: hoja (H), flor (Fl), fruto (Fr), tallo (T) y raíz (R).



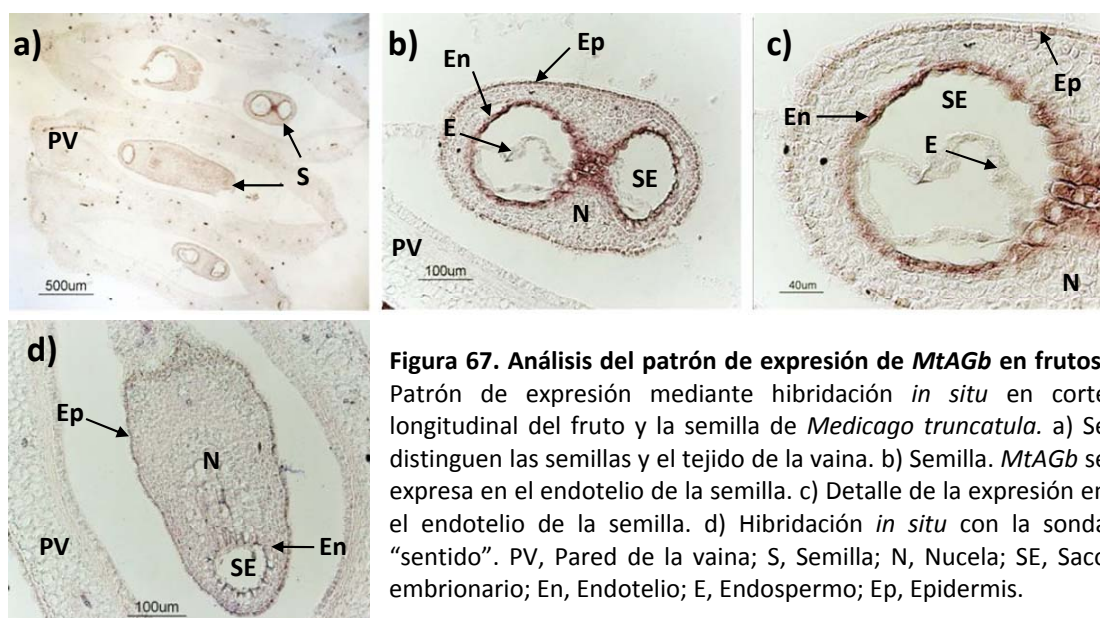
La hibridación *in situ* muestra que el transcrito de *MtAGb* se detecta desde el estadio 2 de desarrollo floral en la región del meristemo floral que dará lugar a los verticilos internos (Figura 66, a).



En el estadio 4 la expresión se sitúa en el carpelo y en la región de los primordios comunes que dará lugar a los estambres (Figura 66, b). En el estadio 5, cuando se han diferenciado los primordios de estambres y pétalos, la expresión de *MtAGb* sigue presente en el carpelo y se observa también en los primordios de estambres (Figura 66, c). En el estadio 6, la expresión se mantiene en el carpelo y los estambres. Puede observarse que la expresión en el carpelo es más intensa en la mitad abaxial del mismo (Figura 66, d). En estadios tardíos del desarrollo floral la expresión de *MtAGb* se detecta en óvulos, en la región distal del carpelo y en los filamentos de estambres (estadio 7,

Figura 66, e). En cortes transversales de carpelos de flores en anthesis, la expresión de *MtAGb* se detecta en los óvulos y en la región abaxial del carpelo (Figura 66, f). No se detectó ninguna señal en secciones de tejido hibridadas con la sonda “sentido”, utilizada como control negativo (Figura 66, g).

También se realizaron hibridaciones *in situ* en frutos de *Medicago truncatula*. Se utilizaron frutos en el estadio descrito anteriormente (Pod age: 6 DPP). Se realizaron cortes longitudinales del fruto, paralelos al eje de enrollado del mismo. En la Figura 67 (a-c) se muestra un corte en el que puede verse una expresión intensa de *MtAGb* en el endotelio de la semilla. No se detectó ninguna señal en tejidos hibridados con la sonda “sentido” (Figura 67, d).



**Figura 67. Análisis del patrón de expresión de *MtAGb* en frutos.** Patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en corte longitudinal del fruto y la semilla de *Medicago truncatula*. a) Se distinguen las semillas y el tejido de la vaina. b) Semilla. *MtAGb* se expresa en el endotelio de la semilla. c) Detalle de la expresión en el endotelio de la semilla. d) Hibridación *in situ* con la sonda “sentido”. PV, Pared de la vaina; S, Semilla; N, Nucela; SE, Saco embrionario; En, Endotelio; E, Endospermo; Ep, Epidermis.

## 1.2 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *MtAGa* Y *MtAGb* DE *Medicago truncatula*

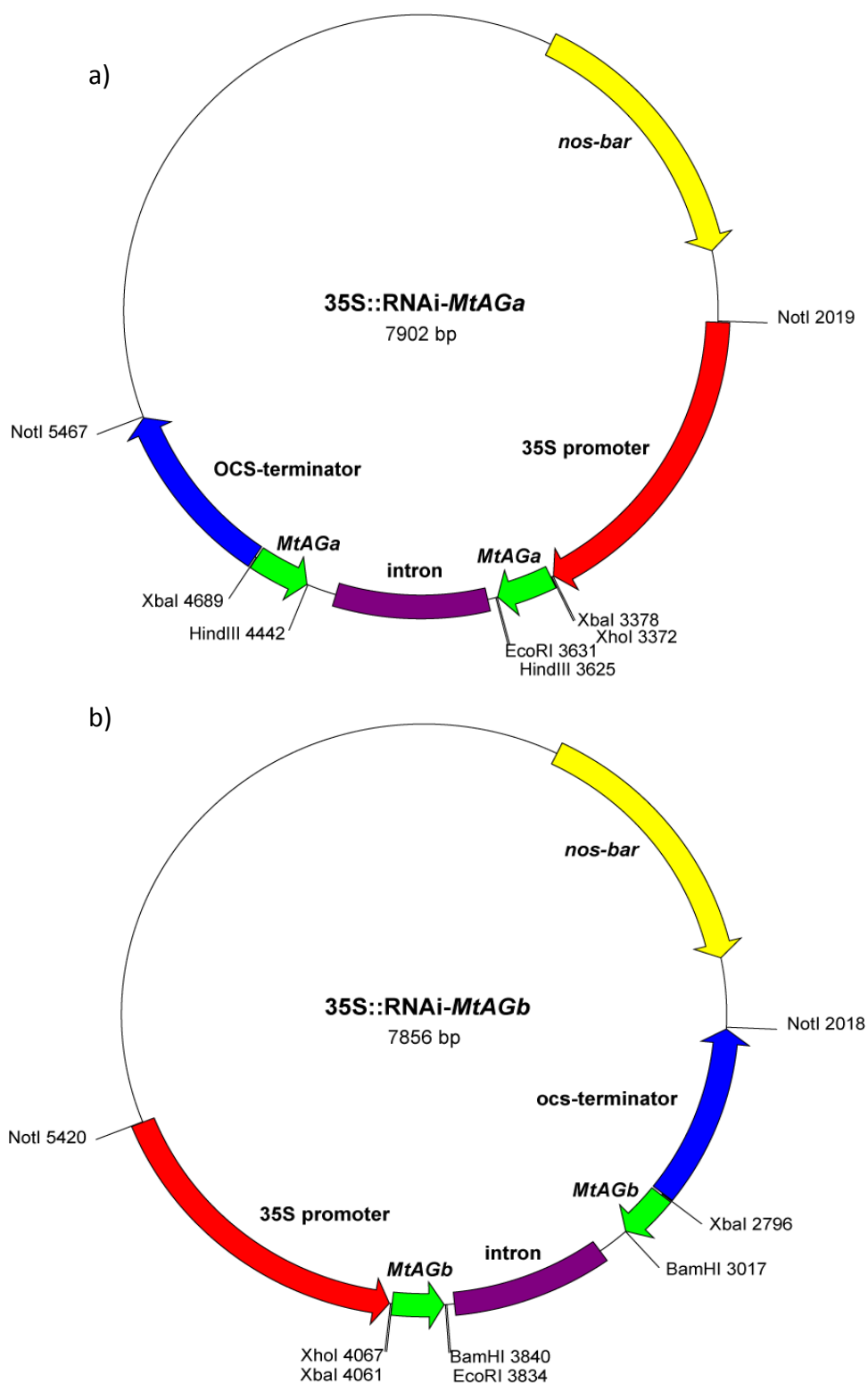
### 1.2.1 Silenciamiento génico mediante RNA interferente

Para analizar las funciones de *MtAGa* y *MtAGb*, se abordó la generación de plantas transgénicas de *Medicago truncatula* con reducción en la expresión de estos genes. Para ello, se utilizó la técnica de silenciamiento génico postranscripcional mediado por RNA interferente. La eficacia de esta herramienta de genética reversa en *Medicago truncatula* fue comprobada previamente en nuestro laboratorio (Benlloch *et al.*, 2009).

Las construcciones de RNA interferente para *MtAGa* (35S::RNAi-*MtAGa*) y *MtAGb* (35S::RNAi-*MtAGb*; ver apartado 3.1.1, Materiales y Métodos) se generaron utilizando fragmentos del extremo 3' del cDNA de ambos genes. El fragmento utilizado en la construcción 35S::RNAi-*MtAGa* fue la secuencia comprendida entre los nucleótidos 572 y 812 del cDNA del gen. Dicha secuencia incluye desde los 5 últimos nucleótidos del dominio K hasta 29 nucleótidos de la región 3' no codificante. El fragmento utilizado en la construcción 35S::RNAi-*MtAGb* fue la secuencia comprendida entre los nucleótidos 558 y 772 del cDNA del gen; incluye desde los 22 últimos nucleótidos del dominio K hasta 37 nucleótidos de la región 3' no codificante (en ambos casos la numeración comienza en el primer nucleótido del codón de inicio de transcripción). Estos fragmentos constituyen la zona más específica de estos dos genes, lo que supone que el silenciamiento afectará concretamente a cada gen.

Para la generación de las construcciones se utilizó el vector pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001). Este vector contiene el promotor constitutivo CaMV 35S y un intrón PDK. A ambos lados de dicho intrón se clonaron los fragmentos génicos, en orientación directa por un lado e inversa por el otro. El transcrito generado bajo el control del promotor CaMV 35S producirá un RNA de doble cadena, que desencadenará la degradación específica del RNA mensajero (mRNA) del gen. El casete, desde el promotor CaMV 35S hasta el terminador OCS, se transfiere al vector binario pGreenII-nosbar, adecuado para transformar plantas (Benlloch, R. Tesis Doctoral, 2005). Este vector contiene el gen *bar* que confiere resistencia en plantas al herbicida *Basta*. Ambas construcciones de RNA interferente se muestran en la Figura 68.

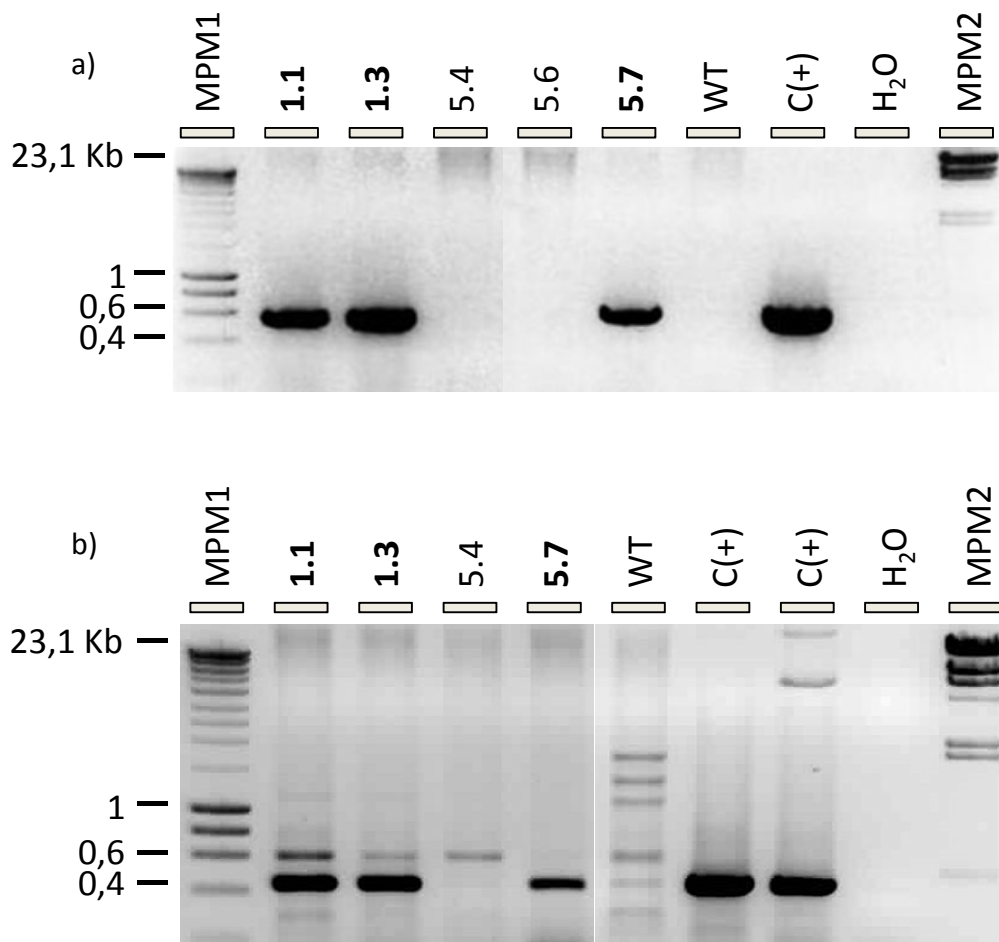
El método de transformación genética utilizado para generar plantas transgénicas de *Medicago truncatula* en las que se silencian los genes *AGAMOUS* mediante RNA interferente está descrito en el apartado 3.2.1 (Materiales y Métodos). Consiste en la infiltración de explantes de hoja de *Medicago truncatula* con una suspensión de *A. tumefaciens* que contiene la construcción genética de interés y la posterior obtención de plantas transgénicas mediante embriogénesis somática. Se realizaron ocho experimentos independientes de transformación genética: cuatro utilizando la construcción 35S::RNAi-*MtAGa* (322 explantes en total) y cuatro con la construcción 35S::RNAi-*MtAGb* (257 explantes en total).



**Figura 68. Esquema de las construcciones de RNA interferente.** a) Construcción de RNA interferente para el gen *MtAGa*. b) Construcción de RNA interferente para el gen *MtAGb*. El casete que incluía ambos fragmentos génicos (en sentido y antisentido) separados por un intrón y bajo el control del promotor CaMV 35S, se escindió del vector pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001) y se clonó en el sitio *NotI* del vector pGreenII-nosbar (Benlloch, R., Tesis Doctoral, 2005), que contiene el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida *Basta*.



Debido a las dificultades que se presentaron durante el proceso de transformación y regeneración (no regeneración, muerte y/o contaminación de explantes), no se logró recuperar ninguna planta transgénica de *Medicago truncatula* afectada en la expresión de *MtAGa*. Se obtuvieron un total de tres plantas transgénicas afectadas en la expresión de *MtAGb*, procedentes de dos explantes independientes. Estas plantas se denominaron 1.1, 1.3 y 5.7, siendo las dos primeras procedentes del mismo explante. La transgénesis de estas plantas fue confirmada mediante PCR. Se utilizaron oligonucleótidos específicos (ver Tabla 10, Materiales y Métodos) que amplifican, por un lado, un fragmento de 561 pb que incluye las últimas 322 pb del promotor CaMV 35S y todo el fragmento génico contiguo al promotor y, por otro lado, un fragmento de 423 pb del gen *bar* (Figura 69).



**Figura 69. Confirmación de la transgénesis de las plantas 35S::RNAi-MtAGb.** a) Confirmación de la presencia del fragmento de *MtAGb* unido al promotor CaMV 35S. b) Confirmación de la presencia del fragmento del gen *bar*. Las plantas transgénicas 1.1, 1.3 y 5.7 se indican en negrita. 5.4 y 5.6 son plantas no transgénicas procedentes del proceso de transformación. MPM1 y MPM2 corresponden a dos marcadores de peso molecular distintos. WT, planta silvestre; C(+), plásmido control positivo; H<sub>2</sub>O, agua destilada.

### 1.2.1.1 Fenotipo de las plantas transgénicas 35S::RNAi-MtAGb

El desarrollo vegetativo de las plantas transgénicas fue normal comparado con las plantas de fenotipo silvestre. La posición y complejidad de hojas y ramas laterales permanecieron inalteradas. El desarrollo de las flores estaba afectado severamente en las flores de la planta transgénica 5.7 (Figura 70), mientras que las dos plantas transgénicas restantes, 1.1 y 1.3, no presentaban alteraciones evidentes en el desarrollo floral.

La flor silvestre de *Medicago truncatula*, está formada por cuatro verticilos concéntricos de órganos: cinco sépalos, cinco pétalos (un estandarte, dos pétalos laterales o alas y dos pétalos cortos fusionados formando la quilla), diez estambres (nueve cuyos filamentos se fusionan en forma de tubo estaminal que rodea al carpelo y uno libre) y un carpelo subsésil. Tras ser fertilizado, este carpelo crece girando helicoidalmente y forma una vaina con espinas.

Las flores de la planta transgénica 35S::RNAi-MtAGb 5.7 presentaban un aspecto característico que las distinguía fácilmente de las flores de fenotipo silvestre: el tamaño general de la flor era superior al de una flor silvestre y la disposición de los órganos estaba alterada (Figura 70, b y c). El primer verticilo de estas flores presentaba sépalos de morfología normal. Los órganos del segundo verticilo estaban conformados por pétalos de morfología normal, aunque frecuentemente la disposición de estos pétalos en el verticilo resultaba irregular (Figura 70, b y c). También pudo observarse en algunas flores la falta de fusión de los dos pétalos que conforman la quilla.

Las flores de la planta transgénica 5.7 presentaban distintos tipos de malformaciones, principalmente en los órganos de tercer y cuarto verticilo. En el tercer verticilo se observó disminución del número de estambres (hasta un mínimo de 3) y faltaba el estambre libre (Figura 70, e). En algunos casos ni siquiera se formó el tubo estaminal (Figura 70, f). Algunas de las anteras no maduraban adecuadamente y no liberaban polen; no obstante, las flores eran fértiles. Se observaron, además, transformaciones homeóticas parciales de anteras en estructuras petaloideas que aparecían fusionadas al tubo estaminal (punta de flecha en Figura 70, f). Estas transformaciones se manifestaban mediante la coloración amarilla y la forma petaloide característica.

El cuarto verticilo de las flores de la planta transgénica 5.7 estaba conformado por carpelos dobles. Ambos carpelos podían desarrollarse adecuadamente y enrollarse

sobre sí mismos (Figura 70, h), generando un fruto doble. Estos carpelos dobles partían de una base común que al dividirse generaba una ruptura que dejaba ver los óvulos (punta de flecha en Figura 70, i). En algunos casos, uno de los carpelos no prosperaba y se quedaba pequeño y abierto, dejando ver los óvulos (Figura 70, j); en este caso se generaba un fruto de fenotipo silvestre, con un apéndice constituido por el carpelo malformado.



**Figura 70. Fenotipo de las flores de la planta 35S::RNAi-MtAGb 5.7.** a) Flor silvestre. b) Flor de la planta transgénica 5.7; se aprecia disposición irregular de los pétalos y carpelo doble. c) Flor de la planta transgénica 5.7 que presenta irregularidades en los estambres; la punta de flecha señala una estructura petaloide originada por transformación homeótica de un estambre. d) Tubo estaminal de flor silvestre. e) Tubo estaminal de flor de la planta 5.7 que presenta número reducido de anteras (7) y carece del estambre libre. f) Tubo estaminal de flor de la planta 5.7. El tubo no está fusionado y se divide en tres: un estambre libre, tres estambres fusionados y un estambre fusionado a una estructura petaloide originada por la transformación homeótica incompleta de una antera (punta de flecha). g) Carpelos de flor silvestre. h) y i) Carpelos dobles de flores de la planta 5.7. La punta de flecha señala óvulos expuestos en la zona abierta del carpelo doble. j) Carpelos dobles de flor de la planta 5.7. La punta de flecha señala óvulos expuestos en el carpelo malformado. Las barras indican 1 mm.

Mediante la siembra de la progenie de la planta 35S::RNAi-*MtAGb* 5.7 se pudo comprobar que el transgén se heredaba en la siguiente generación, produciendo el mismo efecto fenotípico en alrededor del 37% de la descendencia.

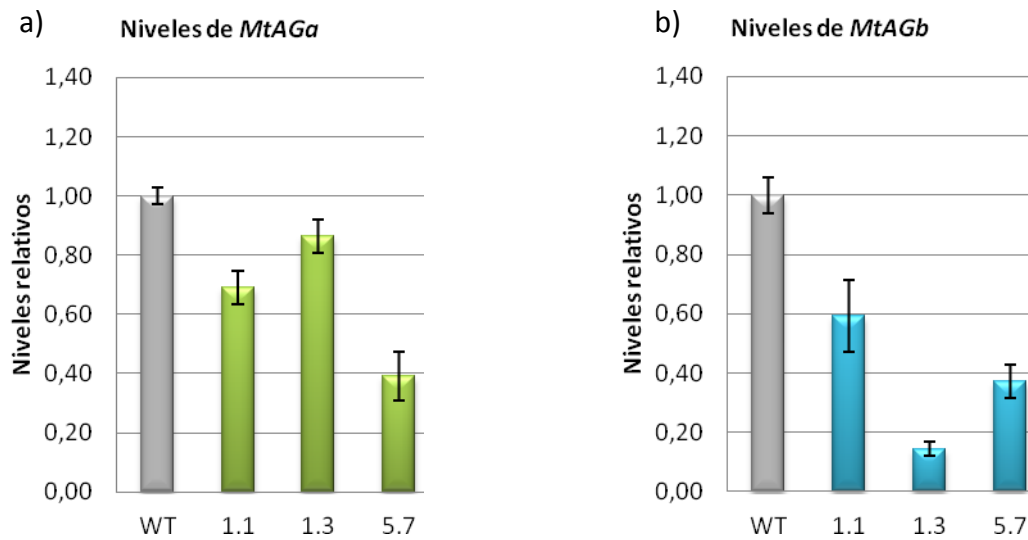
#### 1.2.1.2 Niveles de expresión de *MtAGa* y *MtAGb* en las plantas transgénicas 35S::RNAi-*MtAGb*

Con objeto de determinar si la presencia o ausencia de fenotipo en las plantas transgénicas 35S::RNAi-*MtAGb* se debe a variaciones en los niveles del mRNA endógeno de los genes *MtAGa* y/o *MtAGb*, se analizó la expresión de ambos genes en ápices florales de estas plantas. La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) es un método altamente sensible y específico para detectar y cuantificar los niveles de expresión de un gen en diferentes situaciones (Sellars *et al.*, 2007). Utilizando esta técnica (ver apartado 2.7.2, Materiales y Métodos), se analizaron los niveles de transcrito de *MtAGa* y *MtAGb* en las tres plantas transgénicas, normalizados respecto al nivel del gen endógeno constitutivo *TC77416* (*Secret Agent*; Hartweck *et al.*, 2002).

Para la detección de *MtAGa* se utilizaron los oligonucleótidos qMtAGa1dir y qMtAGa1rev (amplicón de 54 pb) que amplifican un fragmento que incluye desde las últimas 30 pb de la caja K hasta las primeras 24 pb de la región C-terminal. La detección de *MtAGb* se realizó utilizando los oligonucleótidos qMtAGb2dir y qMtAGb2rev, los cuales amplifican un fragmento de 52 pb del extremo 3' no codificante que no está incluido en la construcción 35S::RNAi-*MtAGb*. El gen endógeno constitutivo *TC77416* se amplifica con los oligonucleótidos SecDIRqRT y SecREVqRT (amplicón 51 pb).

En la Figura 71, los niveles de *MtAGa* y *MtAGb* en las plantas transgénicas se expresan en relación al nivel del transcrito correspondiente en la planta control (planta no transgénica obtenida por regeneración *in vitro*). Se comprobó que efectivamente había alteraciones en los niveles de transcrito de *MtAGa* y *MtAGb* en las plantas transgénicas 35S::RNAi-*MtAGb*. El nivel de transcrito de *MtAGa* (Figura 71, a) estaba reducido sobre un 30% en la planta 1.1 y 15% en la planta 1.3. Sin embargo, en la planta 5.7 el nivel de transcrito de *MtAGa* presenta una mayor reducción, cerca del 60% comparado con la planta control. Se observó expresión disminuida de *MtAGb* (Figura 71, b) en las tres plantas transgénicas. Esta reducción fue de aproximadamente 40% en la

planta 1.1 y 85% en la planta 1.3. En la planta 5.7 la expresión de este gen desciende alrededor de un 60%.



**Figura 71. Niveles endógenos de *MtAGa* y *MtAGb* en las plantas 35S::RNAi-*MtAGb* cuantificados mediante qRT-PCR.** Se muestran los niveles de expresión génica en las plantas 35S::RNAi-*MtAGb* relativos a los niveles de expresión génica en la planta control (WT). Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

Los resultados obtenidos en el análisis por qRT-PCR muestran que todas las plantas transgénicas 35S::RNAi-*MtAGb* presentan reducción en la expresión tanto de *MtAGb* como de *MtAGa*. Sin embargo, en la planta 5.7, la única transgénica que presenta fenotipo, la reducción en la expresión de *MtAGa* es superior a las otras dos plantas transgénicas.

### 1.2.2 Mutante *mtagb*: etiquetado por inserción del retrotransposón *Tnt1*

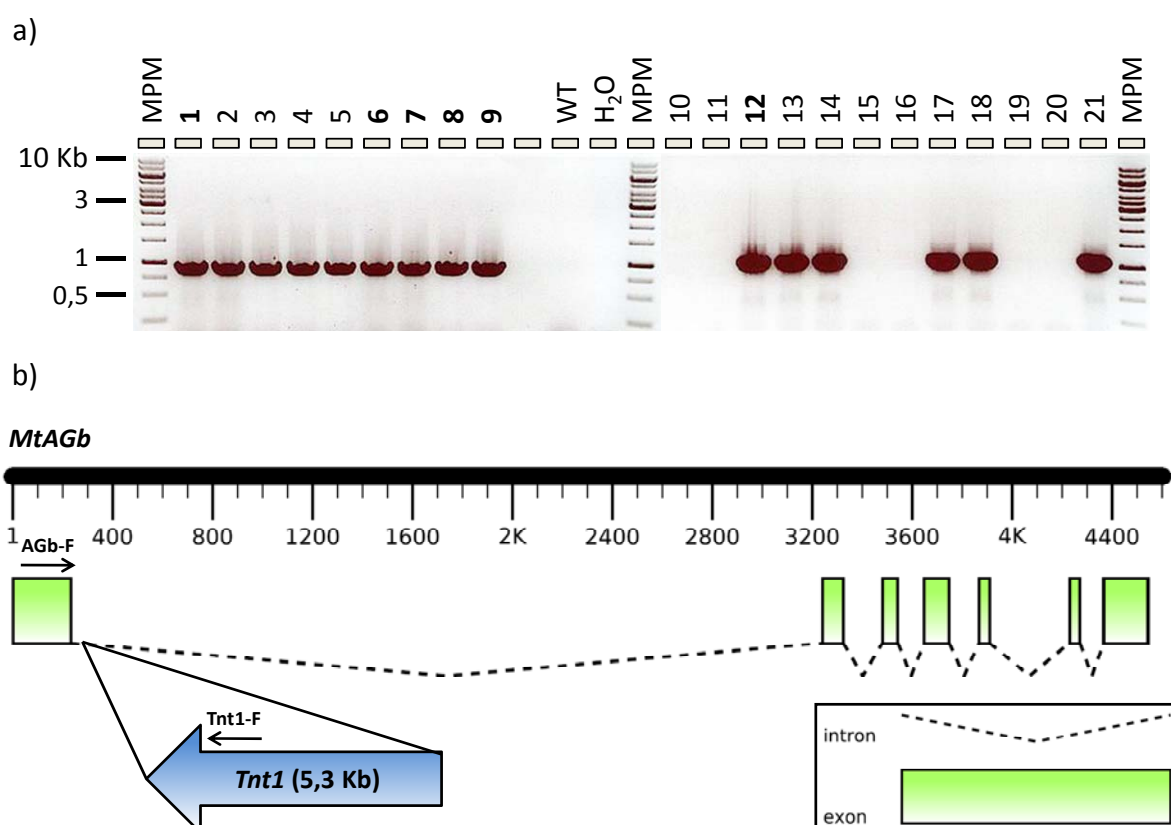
Para obtener más información sobre las funciones de *MtAGa* y *MtAGb*, se rastreó una colección de mutantes de *Medicago truncatula* (genotipo R108) producida por inserción del retrotransposón *Tnt1* de *Nicotiana tabacum* (Tadege *et al.*, 2005, 2008; Cheng *et al.*, 2011) en búsqueda de mutantes que presentaran una inserción en estos genes. Esta población de mutantes ha sido generada en “The Samuel Roberts Noble Foundation” (Ardmore, Oklahoma, USA; <http://bioinfo4.noble.org/mutant/>) y consta de más de 19,000 líneas que contienen aproximadamente 470,000 inserciones del *Tnt1* al azar en el genoma. Mediante PCR se rastrearon 10,000 líneas independientes, divididas en 20 “super-grupos” de 500 líneas cada uno. Se utilizó una combinación de oligonucleótidos específicos complementarios a las secuencias de los bordes del *Tnt1* y del gen de interés,

permitiendo la confirmación de la inserción en el gen (Cheng *et al.*, 2011). De este modo, se identificó una línea que presentaba inserciones del *Tnt1* en el gen *MtAGb*: NF4908. No se identificó ninguna línea que presentara inserciones en el gen *MtAGa*.

Se sembró la población de plantas R1 correspondientes a esta línea con el objetivo de comprobar si la inserción detectada provocaba algún fenotipo morfológico apreciable a nivel macroscópico. La población consistía en 21 plantas. Aproximadamente el 70% de las plantas presentaban un fenotipo mutante que afectaba el desarrollo floral.

### 1.2.2.1 Caracterización molecular de la inserción y genotipado

Para confirmar que la línea NF4908 es portadora de una inserción de *Tnt1* en el gen *MtAGb*, se realizaron extracciones de DNA genómico de las plantas R1, sobre el cual se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos A**G**b-F y Tnt1-F, específicos del gen *MtAGb* y del T-DNA, respectivamente (ver Tabla 10, Materiales y Métodos). El resultado de la amplificación se muestra en la Figura 72, a.



**Figura 72. Inserción del *Tnt1* en el locus *MtAGb*.** a) Resultado de la amplificación de fragmentos utilizando la combinación de oligonucleótidos A**G**b-F/Tnt1-F. MPM corresponde al marcador de peso molecular. WT, planta silvestre; H<sub>2</sub>O, agua destilada. b) Esquema de la estructura genómica del gen *MtAGbL*. Se indica el punto de inserción del elemento *Tnt1* y la posición de los oligonucleótidos utilizados para confirmar la inserción.

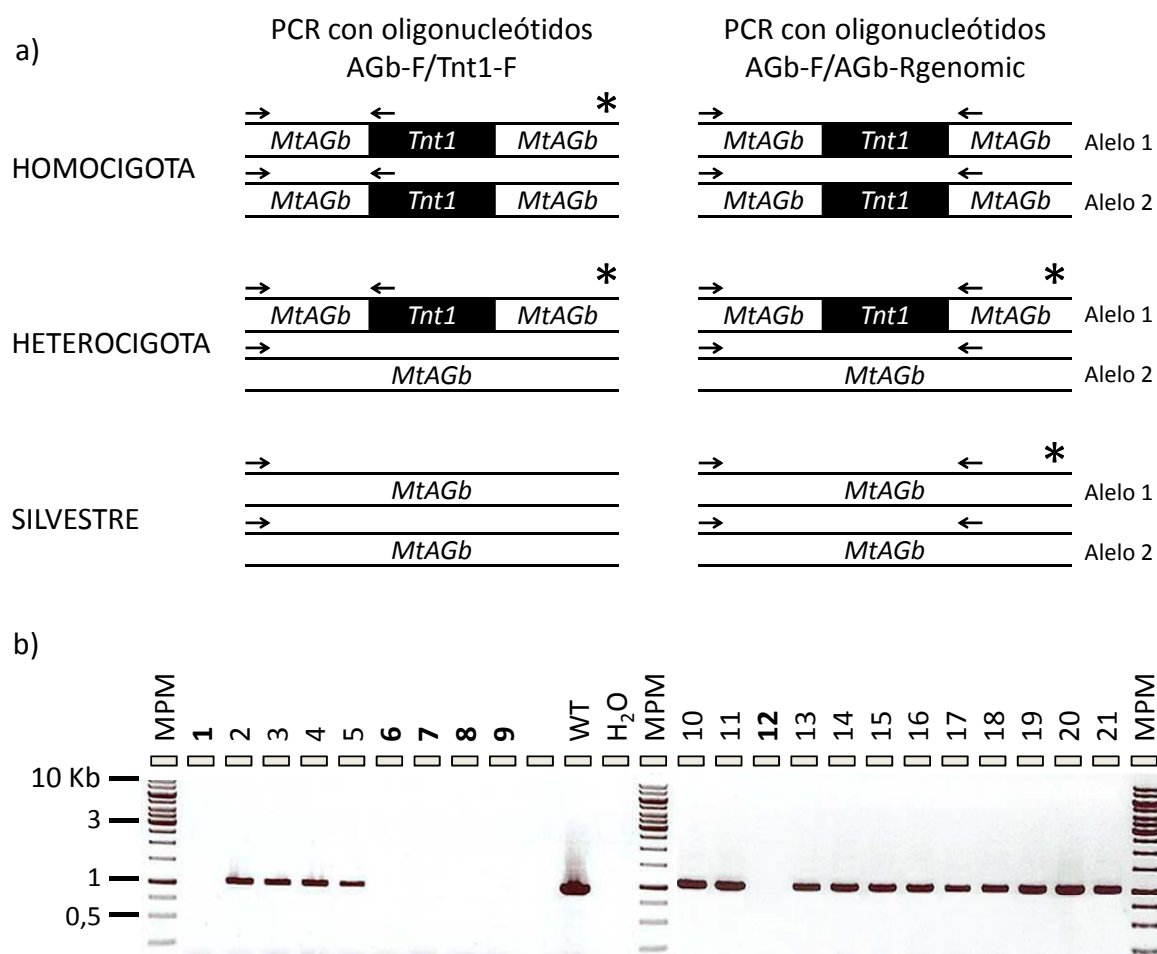
El fragmento obtenido se secuenció y se comparó con la secuencia genómica de *MtAGb*. Pudo verse que la inserción del *Tnt1* se localiza en el primer intrón y está insertado en antisentido, a 277 pb contando desde el codón de inicio de transcripción del gen *MtAGb*. En la Figura 72, b se muestra la organización de los 7 exones y 6 intrones de *MtAGb*, la posición de la inserción del elemento *Tnt1* y la ubicación de los oligonucleótidos utilizados. Se observa que 15 de las 21 plantas de la línea NF4908 presentan la inserción del retrotransposón.

Las plantas R1 se genotiparon para determinar si eran homocigotas o heterocigotas para la inserción del retrotransposón *Tnt1*. El genotipado se realizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos (AGb-F y AGb-Rgenomic; ver Tabla 10, Materiales y Métodos) que amplifican un fragmento del gen *MtAGb* que va desde 5 pb tras el codón de inicio de transcripción de *MtAGb* hasta 1066 pb del primer intrón (contando desde el codón de inicio de transcripción del gen). Por otro lado, se aprovechó el resultado de la amplificación previa con los oligonucleótidos AGb-F/Tnt1-F (Figura 72, a).

En caso de homocigosis, solo se obtuvo un fragmento utilizando la combinación de oligonucleótidos AGb-F/Tnt1-F. No se amplificó ningún fragmento utilizando la combinación AGb-F/AGb-Rgenomic, ya que la inserción del *Tnt1* en ambos loci aumentaba el tamaño de dicho fragmento hasta imposibilitar su amplificación en las condiciones de PCR utilizadas. En caso de heterocigosis, se obtuvo un fragmento utilizando la combinación de oligonucleótidos AGb-F/Tnt1-F y otro utilizando la combinación AGb-F/AGb-Rgenomic, ya que la amplificación del fragmento génico sin inserción (en uno de los loci) era viable. En las plantas de genotipo silvestre no se obtuvo ningún fragmento utilizando la combinación de oligonucleótidos AGb-F/Tnt1-F, pero sí se obtuvo el fragmento amplificado por la combinación AGb-F/AGb-Rgenomic.

Un esquema de los resultados esperados en la amplificación según las combinaciones de oligonucleótidos utilizadas, así como el resultado en sí, se muestran en la Figura 73. Puede observarse que seis de las plantas de la línea NF4908 (plantas 1, 6, 7, 8, 9 y 12) son homocigotas para la inserción, nueve son heterocigotas (plantas 2, 3, 4, 5, 13, 14, 17, 18 y 21) y seis plantas son de genotipo silvestre (plantas 10, 11, 15, 16, 19 y 20). Estos resultados concuerdan con la segregación teórica esperada para las plantas

procedentes de semillas obtenidas mediante autofecundación de una planta heterocigota ( $Aa \times Aa = AA \ Aa \ Aa \ aa$ ; 1:2:1).



**Figura 73. Genotipado de las plantas con inserción del *Tnt1* en el locus *MtAGb*.** a) Esquema de los resultados esperados en las amplificaciones utilizando las diferentes combinaciones de oligonucleótidos. El asterisco indica aquellos casos en los que se espera la amplificación de un fragmento. b) Resultado de la amplificación de fragmentos utilizando la combinación de oligonucleótidos AGb-F/AGb-Rgenomic. Las plantas homocigotas se indican en negrita. MPM corresponde al marcador de peso molecular. WT, planta silvestre; H<sub>2</sub>O, agua destilada.

### 1.2.2.2 Caracterización fenotípica del mutante *mtagb*

El desarrollo vegetativo de las plantas mutantes fue normal comparado con las plantas de fenotipo silvestre. La posición y complejidad de hojas y ramas laterales permanecieron inalteradas. El desarrollo floral estaba afectado en el mutante *mtagb* en las plantas homocigotas, aunque cabe mencionar que no todas las flores generadas por el mutante tenían fenotipo alterado.



Las flores del mutante *mtagb* presentaban un aspecto característico que las distinguía fácilmente de las flores de fenotipo silvestre (Figura 74, b y c). El primer verticilo de estas flores presentaba sépalos de morfología normal. Los órganos del segundo verticilo estaban conformados por pétalos cuya disposición en el verticilo frecuentemente resultaba irregular. Pudo observarse en algunas flores que las posiciones de los pétalos no siempre estaban ocupadas por el tipo de pétalo esperado, obteniéndose en algunos casos más estandartes o alas supliendo a otros pétalos (Figura 74, b y c).



**Figura 74. Fenotipo de las flores del mutante *mtagb*.** a) Flor silvestre. b) Flor mutante *mtagb*; se aprecia dos estandartes supliendo las alas y disminución del número de estambres. c) Flor mutante *mtagb* donde tres estandartes suplen un ala y la quilla. También hay alteración en el tubo estaminal. d) Tubo estaminal de flor silvestre. e) Tubo estaminal de flor *mtagb* que no está fusionado, dividiéndose en secciones. Se presenta aumento de anteras y éstas no maduran, limitando la liberación del polen. f) Tubo estaminal de flor *mtagb*. Se observa aumento en el número de anteras y éstas no maduran. Se observan estructuras petaloideas originadas por la transformación homeótica incompleta de dos anteras (punta de flecha). g) Carpelo de flor silvestre. h) Carpelo de flor *mtagb*. La punta de flecha señala una estructura carpeloide pequeña adherida al carpelo principal. i) Carpelo triple de flor *mtagb*. Las barras indican 1 mm.

Las flores *mtagb* presentaban malformaciones principalmente en los órganos de tercer y cuarto verticilo. En el tercer verticilo se observó partición o fusión incompleta del tubo estaminal (Figura 74, e). El número de estambres estaba alterado y en ocasiones se presentaban dos estambres libres en lugar de uno. Algunas de las anteras no maduraban adecuadamente y no liberaban polen (Figura 74, e y f). Además, se observaron transformaciones homeóticas parciales de anteras en estructuras petaloideas que aparecían fusionadas al tubo estaminal (punta de flecha en Figura 74, f). Estas transformaciones se manifestaban mediante la coloración amarilla y la forma petaloide característica. El cuarto verticilo de las flores *mtagb* estaba conformado por carpelos modificados. Se presentaba un carpelo con estructuras pequeñas tipo carpelo o estigma adheridas al mismo (Figura 74, h) o carpelos múltiples (Figura 74, j). En el caso de los carpelos múltiples, se observó hasta un máximo de tres, pudiendo desarrollarse todos adecuadamente y enrollarse sobre sí mismos generando un fruto múltiple.

### **1.2.3 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)**

Para complementar los resultados de silenciamiento génico previamente descritos, se utilizó la tecnología denominada VIGS (silenciamiento génico inducido por virus) para silenciar transitoriamente los genes *AGAMOUS* de dos leguminosas: *Medicago truncatula* y *Pisum sativum*. Los experimentos se realizaron en colaboración con el laboratorio de la Dra. Elisabeth Johansen (Faculty of Agricultural Sciences, University of Århus, Dinamarca), en el que han desarrollado un vector específico para VIGS en *Pisum sativum*, basado en el *Pea early browning virus* (PEBV). Este vector ha sido utilizado exitosamente en el silenciamiento de genes específicos de hoja, raíz y meristemo floral de *Pisum sativum* (Constantin *et al.*, 2004, 2008). Además, su eficacia ha sido validada en distintas variedades de *Medicago truncatula* (Grønlund *et al.*, 2008). Las construcciones fueron realizadas en nuestro laboratorio y los ensayos se realizaron en el laboratorio de Dinamarca, aprovechando una beca obtenida para la realización de estancias breves en centros de I+D en el extranjero.

Distintos análisis filogenéticos de leguminosas (Wojciechowski, M., 2003) sugieren que los géneros *Pisum*, *Lathyrus*, *Lens*, *Trifolium* y *Medicago* están estrechamente relacionados. La ontogenia y morfología floral están conservadas entre *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* (Tucker, S., 1989, 2003; Ferrándiz *et al.*, 1999), además de existir

un elevado grado de sintenia entre estas plantas (Kaló *et al.*, 2004; Aubert *et al.*, 2006). Las principales diferencias son el tamaño de la flor, que hace más manejable experimentalmente a *Pisum sativum* (Figura 75) y la forma del fruto, enrollado y con espinas en *Medicago truncatula*.



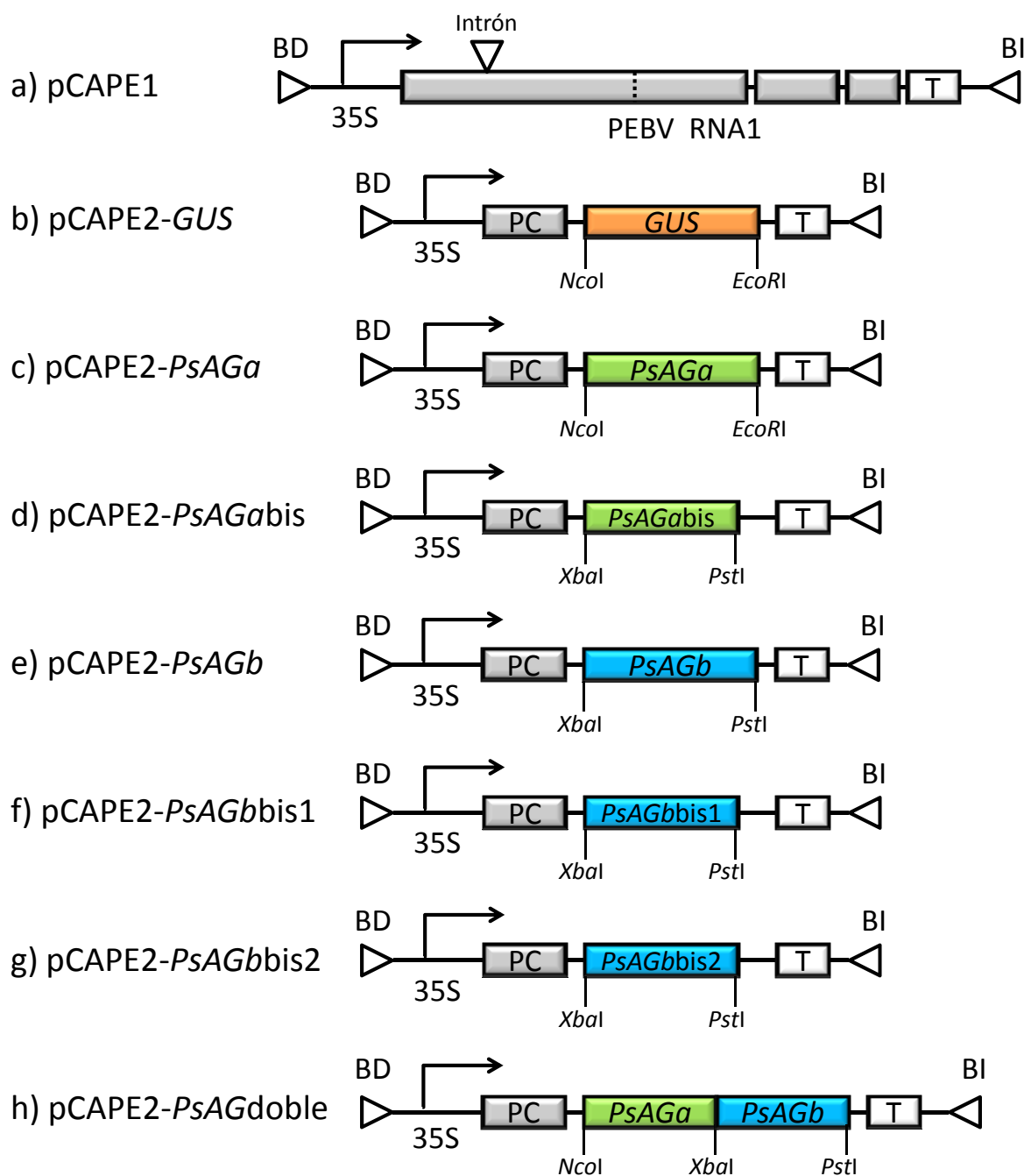
**Figura 75. Comparación del tamaño de las flores de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula*.** a) Flor de *Pisum sativum*. b) Flor de *Medicago truncatula*. La barra indica 1 cm.

En el presente trabajo se ha observado que existe una homología muy elevada entre los genes *AGAMOUS* de *Pisum sativum* y *Medicago truncatula* (ver Tabla 19), así que se ha optado por realizar los experimentos de silenciamiento en ambas plantas. Los resultados obtenidos pueden aportar información importante acerca de la función de estos genes duplicados en leguminosas.

#### 1.2.3.1 VIGS en *Pisum sativum*

Se utilizó el vector PEBV para silenciar transitoriamente los genes *PsAGa* (Berbel *et al.*, unpublished) y *PsAGb* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001) de *Pisum sativum* cv. Bonneville. Este vector consiste en dos plásmidos: pCAPE1 (que incluye el RNA1 del cDNA viral) y pCAPE2 (que incluye el RNA2 del cDNA viral y en el que se inserta el fragmento génico de interés; Constantin *et al.*, 2004). Se generaron seis construcciones de VIGS para *Pisum sativum*: dos para silenciar *PsAGa* (pCAPE2-*PsAGa* y pCAPE2-*PsAGabis*), tres para silenciar *PsAGb* (pCAPE2-*PsAGb*, pCAPE2-*PsAGbbis1* y pCAPE2-*PsAGbbis2*) y una para silenciar simultáneamente ambos genes (pCAPE2-*PsAGdoble*; ver apartado 3.1.2, Materiales y Métodos). El esquema general de estas construcciones se muestra en la Figura 76. Las construcciones pCAPE2-*PsAGa* y pCAPE2-*PsAGb* son más específicas en el silenciamiento de los genes por separado, ya que los fragmentos que contienen corresponden a la región C-terminal y la región no codificante del gen y

presentan entre ellos una homología de 65%. Las construcciones pCAPE2-*PsAGabis*, pCAPE2-*PsAGbbis1* y pCAPE2-*PsAGbbis2* incluyen fragmentos génicos más pequeños y localizados entre la caja K y la región C-terminal, zonas de alta homología (77%) entre *PsAGa* y *PsAGb*, lo que conlleva la posibilidad de silenciamiento de ambos genes.



**Figura 76. Esquema de las construcciones VIGS para *Pisum sativum*.** a) pCAPE1, que contiene el cDNA completo del RNA1. b) pCAPE2-*GUS*. Construcción utilizada como control interno de infección viral. c) y d) pCAPE2-*PsAGa* y pCAPE2-*PsAGabis*, utilizadas para silenciar el gen *PsAGa*. e), f) y g) pCAPE2-*PsAGb*, pCAPE2-*PsAGbbis1* y pCAPE2-*PsAGbbis2*, utilizadas para silenciar el gen *PsAGb*. h) pCAPE2-*PsAGdoble*, usada para silenciar *PsAGa* y *PsAGb* simultáneamente. BD, borde derecho; BI, borde izquierdo; T, terminador NOS; PC, región codificante de la proteína de la cápsida. (Imágenes adaptadas de Constantin *et al.*, 2004).

La diferencia entre las construcciones pCAPE2-*PsAGbbis1* y pCAPE2-*PsAGbbis2* es que la primera incluye las 42 pb que se pierden por el *splicing* alternativo de *PsAGb*. En la construcción pCAPE2-*PsAGdoble* se utilizan, colocados en tándem, los fragmentos de las construcciones pCAPE2-*PsAGa* y pCAPE2-*PsAGb*, solo que más cortos por el extremo 5'.

Para hacer un seguimiento del efecto del virus PEBV sobre las plantas, se utilizó la construcción control pCAPE2-*GUS* (Constantin *et al.*, unpublished), que contiene un inserto de 400 pb de la región no codificante del gen exógeno *GUS*, cuyo silenciamiento no está dirigido a ningún gen endógeno de la planta.

Las plantas VIGS de *Pisum sativum* cv. Bonneville se generaron mediante un proceso de agroinfiltración que se describe en el apartado 3.2.2 (Materiales y Métodos). Consiste en la inoculación del envés de las hojas, en plantas de dos semanas de edad, con una suspensión mixta de *A. tumefaciens* que contiene los vectores pCAPE1 y pCAPE2 (con el fragmento génico de interés) a partes iguales. Se realizaron dos experimentos independientes de transformación genética transitoria con un total de 229 plantas. Se incluyeron grupos de plantas transformadas con las seis construcciones *AGAMOUS* (40 plantas para pCAPE2-*PsAGa*, pCAPE2-*PsAGb* y pCAPE2-*PsAGdoble* y 10 plantas para cada una de las demás construcciones), plantas transformadas con la construcción pCAPE2-*GUS* (control interno de infección viral; 40 plantas) y plantas sin transformar (control externo, 39 plantas).

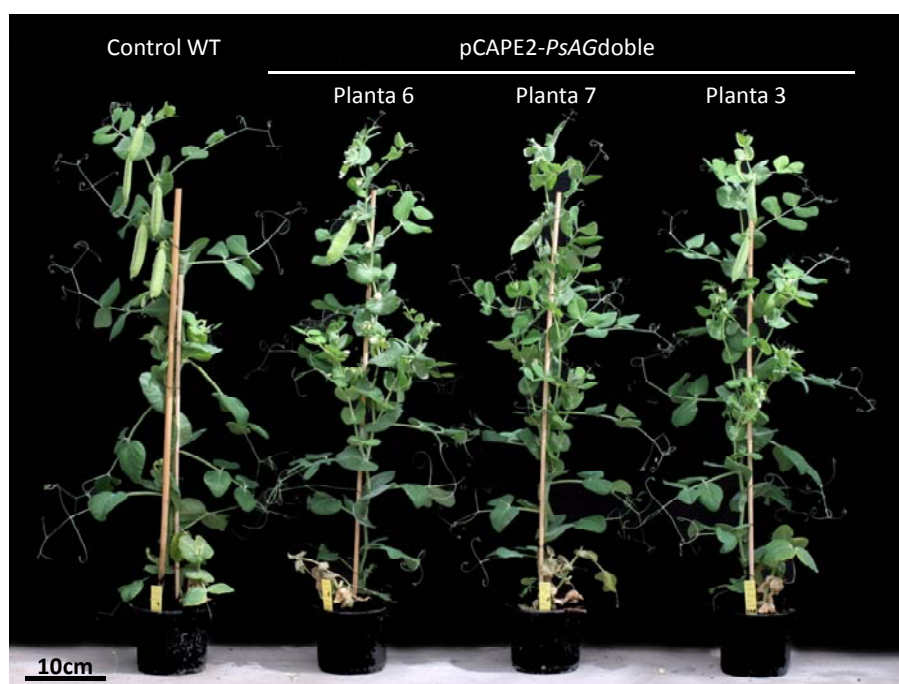
Comparando los fenotipos de las plantas pCAPE2-*PsAGabis*, pCAPE2-*PsAGbbis1* y pCAPE2-*PsAGbbis2* con las plantas pCAPE2-*PsAGa* y pCAPE2-*PsAGb*, se ha observado que efectivamente el silenciamiento generado con las tres primeras construcciones afecta a ambos genes. Por ello, el análisis del fenotipo resultante del silenciamiento transitorio de *PsAGa* y *PsAGb* se realizó principalmente en las plantas pCAPE2-*PsAGa* y pCAPE2-*PsAGb* y se presentan los resultados de las mismas.

Las plantas se analizaron visualmente y se registró el número de nudos, nudo en el que se presenta la primera flor, así como número de flores y frutos y alteraciones en los mismos.

Todas las plantas florecieron entre los nudos 10 y 11. El número total de nudos que presentaron todas las plantas estaba entre 14 y 15, excepto en las plantas pCAPE2-*PsAGdoble*, en las cuales el número medio de nudos fue de 18. Es posible que este fenotipo no fuera únicamente resultante del silenciamiento simultáneo de *PsAGa* y

*PsAGb*. Estas plantas prácticamente no formaban frutos. El fenotipo ramificado de estas plantas (Figura 77) pudo deberse a la falta de estas estructuras reproductoras florales, ya que los nutrientes favorecerían la generación de más meristemos inflorescentes al no desviarse hacia la formación de frutos (Hensel *et al.*, 1994; Beltrán *et al.*, 2007).

Las plantas *pCAPE2-PsAGa* y *pCAPE2-PsAGb* no presentaron alteraciones morfológicas en las estructuras vegetativas. La posición y complejidad de hojas y ramas laterales permanecieron inalteradas.



**Figura 77. Plantas *pCAPE2-PsAGdoble* de *Pisum sativum*.** Se muestran tres plantas *pCAPE2-PsAGdoble* comparadas con una planta silvestre (WT). Estas plantas tienen una estructura más ramificada que las plantas de fenotipo silvestre.

Las flores de las plantas VIGS se examinaron visualmente y se abrieron manualmente, buscando defectos obvios en las flores abiertas. El 67,8% de las plantas *pCAPE2-PsAGa* produjo flores anormales, mientras que solo el 35,7% de las plantas *pCAPE2-PsAGb* presentó flores con defectos. Esto puede deberse tanto a la posibilidad de que *PsAGb* tenga un papel funcional más débil como a la dificultad para reconocer defectos más tenues en las flores. El 85,7% de las plantas *pCAPE2-PsAGdoble* generó flores anormales. La Tabla 20 resume la frecuencia y tipo de fenotipos florales observados para las tres construcciones.

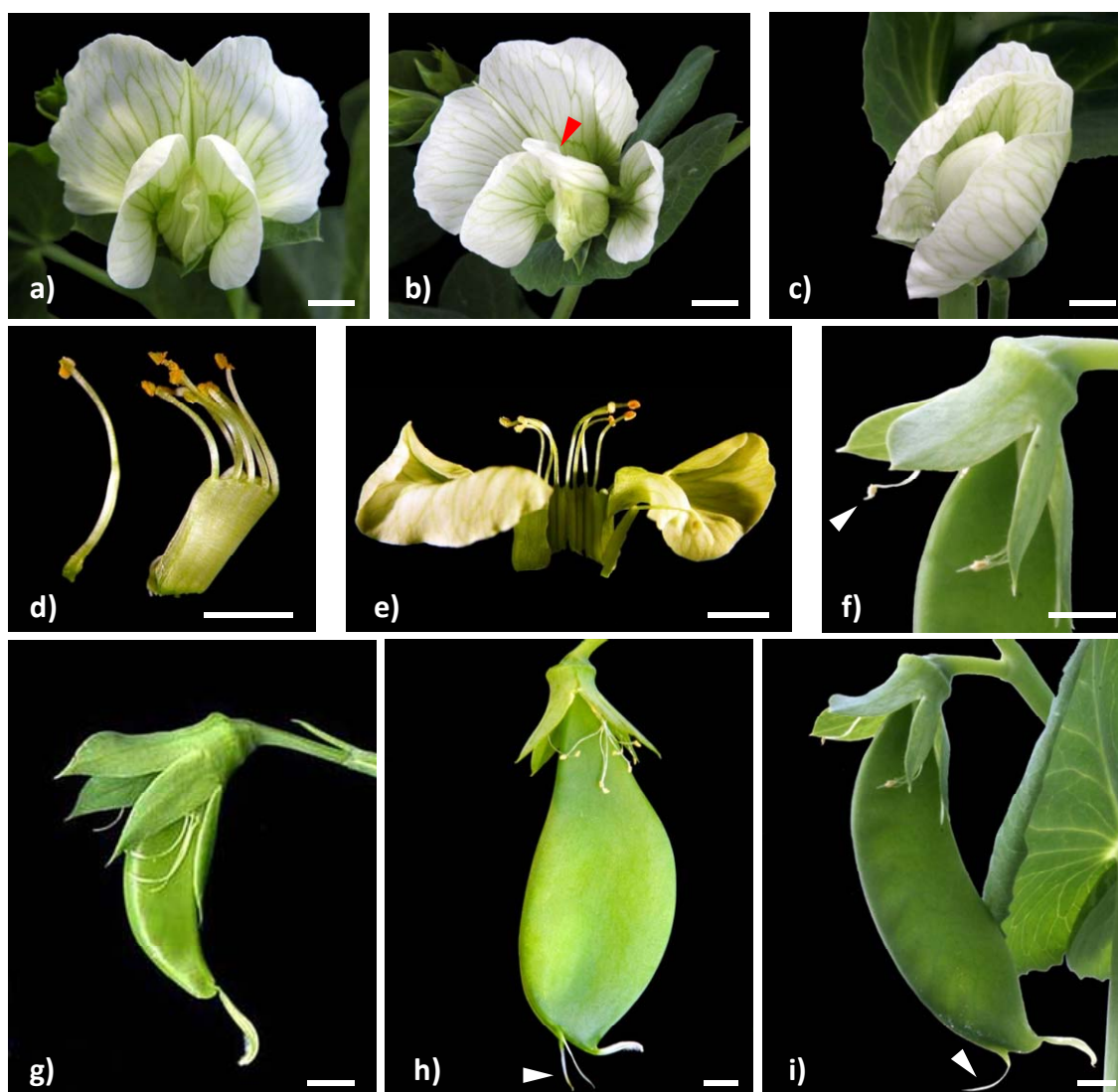
Tabla 20. Fenotipos observados en las flores de plantas VIGS de *Pisum sativum*

Fenotipo observado	WT	pCAPE2- <i>GUS</i>	pCAPE2- <i>PsAGa</i>	pCAPE2- <i>PsAGb</i>	pCAPE2- <i>PsAGdoble</i>
Plantas inoculadas	39	40	40	40	40
Flores totales analizadas	85	69	89	80	196
Flores con fenotipo en verticilos 3 y 4	0	0	3 (3,37%)	0	73 (37,24%)
Flores con conversiones homeóticas en los estambres	0	0	7 (7,86%)	1 (1,25%)	77 (39,28%)
Flores con conversiones homeóticas en el carpelo	0	0	16 (17,97%)	3 (3,75%)	101 (51,53%)
Flores con defectos en la determinación del meristemo	0	0	0	0	61 (31,12%)

Las flores pCAPE2-*PsAGa* alteradas se identificaron por su morfología asimétrica (Figura 78, b). Estas flores presentaron estambres parcialmente transformados: en las flores con alteraciones más severas, uno o dos de los estambres del tubo estaminal estaban convertidos totalmente en estructuras petaloides (Figura 78, e). Frecuentemente se presentaron anteras inmaduras que permanecían cerradas y no liberaban polen. Las alteraciones en el cuarto verticilo se apreciaron mejor al desarrollarse el fruto. Consistían principalmente en carpelos con múltiples puntas (2 ó 3) (Figura 78, h) o, en ocasiones, carpelos ligeramente abiertos en la región distal. En algunos casos los carpelos abortaron tras la antesis.

Los defectos en las flores pCAPE2-*PsAGb* fueron más difíciles de identificar. Las flores en antesis estaban abiertas y tenían una apariencia normal, excepto en algún caso puntual en el cual pudo apreciarse deformación en la morfología de los pétalos (Figura 78, c). Únicamente mediante un examen muy detallado se observaron defectos en los dos verticilos internos de la flor. En algunos estambres de flores que estaban desarrollando fruto se observó un alargamiento en el extremo distal de las anteras, generando un aspecto de antera puntiaguda (punta de flecha en Figura 78, f). Las alteraciones en el cuarto verticilo consistían principalmente en carpelos con múltiples puntas (2 ó 3) (Figura 78, i).





**Figura 78. Fenotipo de las flores pCAPE2-*PsAGa* y pCAPE2-*PsAGb*.** a) Flor silvestre. b) Flor pCAPE2-*PsAGa*; se aprecia la morfología asimétrica. La punta de flecha señala estambres petaloides atrapados por la quilla. c) Flor pCAPE2-*PsAGb*; se aprecia leve deformación en los pétalos. d) Tubo estaminal de flor silvestre. e) Tubo estaminal de flor pCAPE2-*PsAGa* que presenta estambres petaloides. f) Detalle de sépalos y fruto pCAPE2-*PsAGb*. Se observa una antera de aspecto puntiagudo (punta de flecha). g) Fruto de flor silvestre. h) Fruto pCAPE2-*PsAGa* que presenta múltiples puntas (punta de flecha). i) Fruto pCAPE2-*PsAGb* que presenta múltiples puntas (punta de flecha). Las barras indican 5 mm.

El silenciamiento simultáneo de los transcritos *PsAGa* y *PsAGb* en las plantas pCAPE2-*PsAGdoble* generó flores con un fenotipo drástico que involucraba la pérdida de la identidad de estambres (están total o considerablemente transformados en pétalos) y carpelos (transformados en estructuras sepaloideas) y una alta incidencia de pérdida de determinación del meristemo floral (Figura 79). Las flores pCAPE2-*PsAGdoble* eran generalmente de dos tipos: flores grandes con gran cantidad de órganos petaloides blancos y abiertos (Figura 79, b), que además podían presentar capullos florales en su interior (punta de flecha en Figura 79, c); o flores compactas que nunca llegaban a



abrirse compuestas por muchas capas de pétalos y órganos petaloides verdosos y finos (Figura 79, d). En las flores con fenotipo más leve, en las cuales podía distinguirse aún una especie de tubo estaminal, los estambres estaban transformados en estructuras petaloides o presentaban anteras con las puntas alargadas (Figura 79, e). Los carpelos, en caso de estar presentes, consistían en un órgano que presentaba varias puntas tipo sépalo o estigma (Figura 79, f). En ocasiones estos carpelos presentaban en su interior tejido petaloide ectópico.

La determinación del meristemo floral estaba fuertemente afectada en las flores de las plantas pCAPE2-*PsAG*doble. Frecuentemente, las flores de fenotipo grande y que presentaban gran cantidad de órganos petaloides blancos y abiertos desarrollaban en el interior del último verticilo (carpelo sepaloide de múltiples puntas) una flor ectópica (Figura 79, g y h). Este fenotipo “una flor dentro de otra” es típico en la pérdida de función C (Bowman *et al.*, 1989). Asimismo, la pérdida de determinación del meristemo se puso de manifiesto en la reversión floral que sufrían varias de las flores de plantas pCAPE2-*PsAG*doble: tras la dehiscencia de la flor, el órgano carpelo-sepaloide presente en el último verticilo generaba una rama nueva, la cual formaba hojas y zarcillos y finalmente resultaba en la producción de flores (generalmente de fenotipo silvestre) y frutos (Figura 79, i). Un despiece de una flor típica pCAPE2-*PsAG*doble se presenta en la Figura 79, j. Pueden apreciarse los sépalos inalterados y cinco pétalos de morfología similar a la silvestre. Posteriormente, se observa una sucesión de muchos órganos tipo pétalo y estambres petaloides, sin que la flor se determine en un ningún órgano carpeloide.

---

**Figura 79. Fenotipo de las flores pCAPE2-*PsAG*doble.** a) Flor silvestre. b) Flor pCAPE2-*PsAG*doble con gran número de órganos petaloides. c) Flor pCAPE2-*PsAG*doble. La punta de flecha señala un capullo floral ectópico en el interior de la flor. d) Flor pCAPE2-*PsAG*doble compacta con órganos petaloides verdosos y finos. e) Tubo estaminal de flor pCAPE2-*PsAG*doble que presenta estambres petaloides. f) Órgano con puntas sepaloideas presente en el verticilo del carpelo. g) Flor pCAPE2-*PsAG*doble con fenotipo “una flor dentro de otra (punta de flecha). h) Detalle del interior de la flor pCAPE2-*PsAG*doble con fenotipo “una flor dentro de otra tras el despiece. i) Reversión floral en flor pCAPE2-*PsAG*doble. La punta de flecha señala los sépalos de la flor original. j) Despiece de flor pCAPE2-*PsAG*doble. Las barras indican 5 mm.

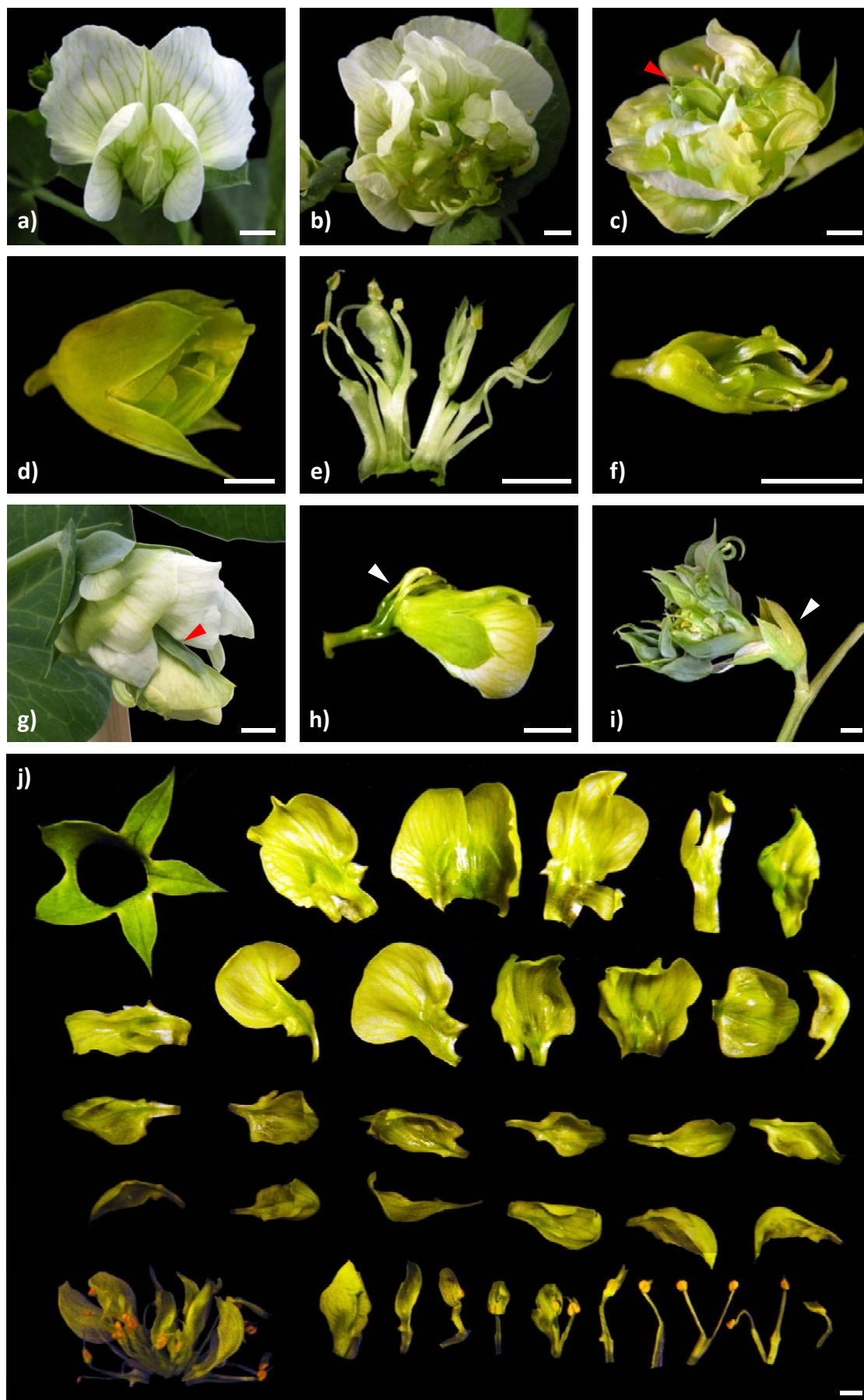


Figura 79. Fenotipo de las flores *pCAPE2-PsAGdoble*.

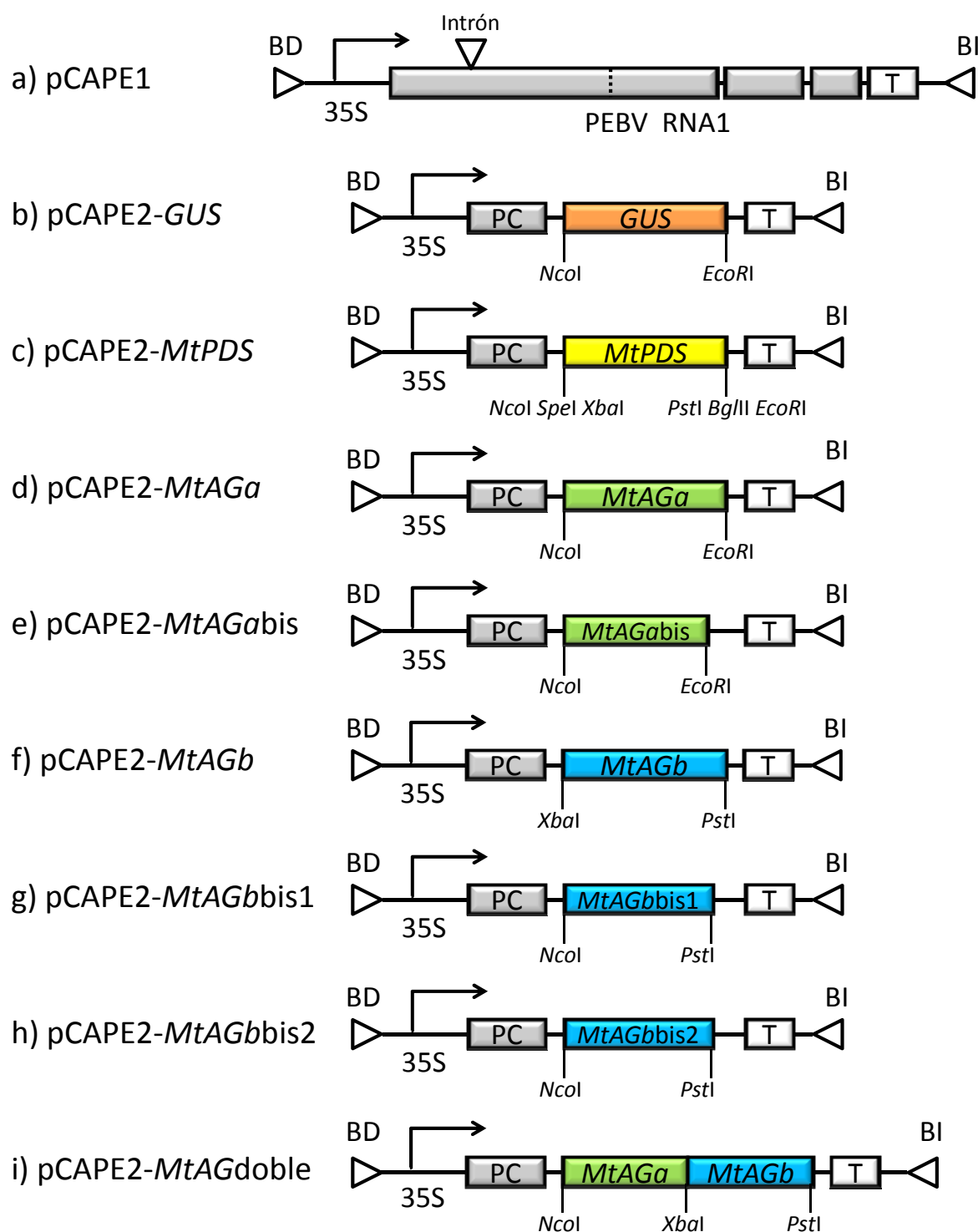
### 1.2.3.2 VIGS en *Medicago truncatula*

El vector PEBV de *Pisum sativum* también se utilizó para silenciar transitoriamente los genes *MtAGa* y *MtAGb* (este trabajo) en *Medicago truncatula* cv. SA1335. Se generaron seis construcciones de VIGS para *Medicago truncatula*: dos para silenciar *MtAGa* (pCAPE2-*MtAGa* y pCAPE2-*MtAGabis*), tres para silenciar *MtAGb* (pCAPE2-*MtAGb*, pCAPE2-*MtAGbbis1* y pCAPE2-*MtAGbbis2*) y una para silenciar simultáneamente ambos genes (pCAPE2-*MtAGdoble*; ver apartado 3.1.2, Materiales y Métodos). Los fragmentos génicos utilizados en estas construcciones son homólogos a los fragmentos utilizados para las construcciones de *Pisum sativum*. Igualmente, se espera mayor especificidad de las construcciones pCAPE2-*MtAGa* y pCAPE2-*MtAGb* que de las construcciones pCAPE2-*MtAGabis*, pCAPE2-*MtAGbbis1* y pCAPE2-*MtAGbbis2* en el silenciamiento de los genes por separado.

Para hacer un seguimiento del efecto del virus PEBV sobre las plantas, se utilizó la construcción control pCAPE2-*GUS* (Constantin *et al.*, unpublished) y para definir el momento a partir del cual pueden observarse los efectos del silenciamiento génico, se utilizó la construcción pCAPE2-*MtPDS*, que incluye un fragmento de 476 pb del gen *MtPDS*, cuyo silenciamiento genera un fenotipo de blanqueo de hojas (Kumagai *et al.*, 1995; Constantin *et al.*, 2004). El esquema general de estas construcciones se muestra en la Figura 80.

Las plantas VIGS de *Medicago truncatula* se generaron mediante agroinfiltración (ver apartado 3.2.2, Materiales y Métodos). Se realizaron dos experimentos independientes de transformación genética transitoria con un total de 153 plantas. Se incluyeron grupos de plantas transformadas con las seis construcciones *AGAMOUS* (20 plantas para pCAPE2-*MtAGa* y pCAPE2-*MtAGb*, 18 para pCAPE2-*MtAGabis*, 17 para pCAPE2-*MtAGbbis1* y pCAPE2-*MtAGbbis2* y 21 para pCAPE2-*MtAGdoble*), 13 plantas transformadas con la construcción pCAPE2-*GUS*, 19 plantas transformadas con la construcción pCAPE2-*MtPDS* y 8 plantas sin transformar (control externo).

Tras la agroinoculación, las plantas se dejaron crecer hasta observar el fenotipo de blanqueo en las hojas de las plantas pCAPE2-*MtPDS* (19-20 días post-infiltración), señal de que el silenciamiento se estaba produciendo. Hasta este momento, todas las flores y frutos generados en las plantas se retiraron manualmente.



**Figura 80. Esquema de las construcciones VIGS para *Medicago truncatula*.** a) pCAPE1, que contiene el cDNA completo del RNA1. b) pCAPE2-*GUS*. Construcción utilizada como control positivo de infección viral, sin fenotipo. c) pCAPE2-*MtPDS*. Construcción utilizada como control positivo de infección viral, con fenotipo. d) y e) pCAPE2-*MtAGa* y pCAPE2-*MtAGabis*, utilizadas para silenciar el gen *MtAGa*. f), g) y h) pCAPE2-*MtAGb*, pCAPE2-*MtAGbbis1* y pCAPE2-*MtAGbbis2*, utilizadas para silenciar el gen *MtAGb*. i) pCAPE2-*MtAGdoble*, usada para silenciar *MtAGa* y *MtAGb* simultáneamente. BD, borde derecho; BI, borde izquierdo; T, terminador NOS; PC, región codificante de la proteína de la cápside. (Imágenes adaptadas de Constantin *et al.*, 2004).

A partir de la aparición del fenotipo de blanqueo, las plantas se analizaron visualmente y se colectaron todas las flores con el fin de ser analizadas.

Las plantas pCAPE2-*GUS* y pCAPE2-*MtPDS* no presentaban ningún tipo de alteración morfológica apreciable ni en las estructuras vegetativas ni en las reproductivas. Las plantas transformadas con las construcciones *AGAMOUS* tampoco presentaban alteraciones en las estructuras vegetativas. La posición y complejidad de hojas y ramas laterales permanecieron inalteradas.

Con la finalidad de no pasar por alto ninguna modificación en las flores de las plantas VIGS, todas las flores de todas las plantas fueron despiezadas y analizadas por microscopía estereoscópica. Únicamente 5 de las 21 plantas pCAPE2-*MtAGdoble* (23,8%) generaron flores modificadas. Ninguna de las plantas de las demás construcciones produjo flores anormales. La Tabla 21 resume la frecuencia y tipo de fenotipos florales observados.

**Tabla 21. Fenotipos observados en las flores de plantas VIGS de *Medicago truncatula***

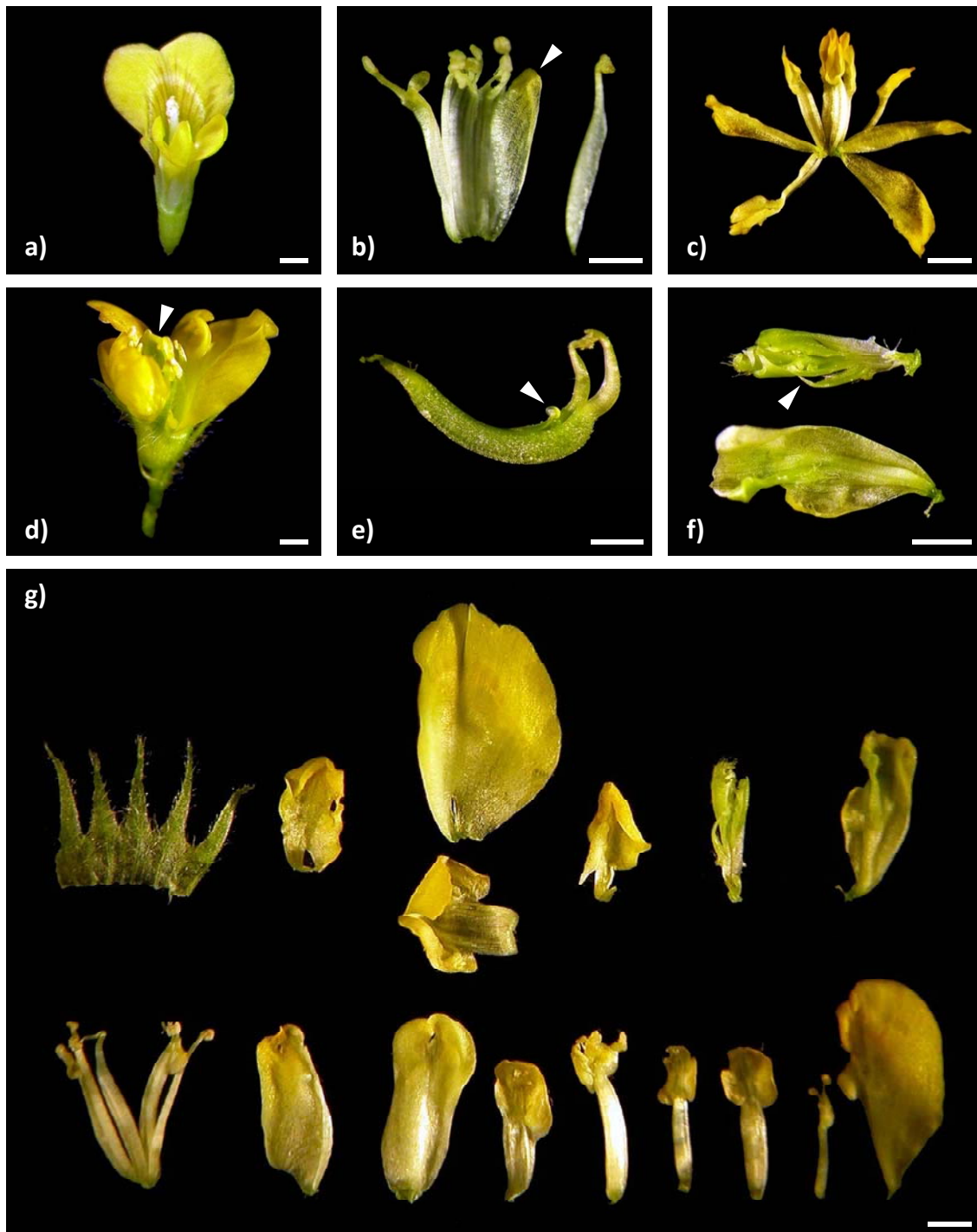
Fenotipo observado	WT	pCAPE2- <i>GUS</i>	pCAPE2- <i>MtPDS</i>	pCAPE2- <i>MtAGa</i> <sup>a</sup>	pCAPE2- <i>MtAGb</i> <sup>b</sup>	pCAPE2- <i>MtAGdoble</i>
Plantas inoculadas	8	13	19	38	54	21
Flores totales analizadas	40	65	95	168	299	149
Flores con fenotipo en verticilos 3 y 4	0	0	0	0	0	1 (0,67%)
Flores con conversiones homeóticas en los estambres	0	0	0	0	0	11 (7,38%)
Flores con conversiones homeóticas en el carpelo	0	0	0	0	0	2 (1,34%)
Flores con defectos en la determinación del meristemo	0	0	0	0	0	1 (0,67%)

<sup>a</sup> Se suman los datos de las plantas pCAPE2-*MtAGa* y pCAPE2-*MtAGabis1*

<sup>b</sup> Se suman los datos de las plantas pCAPE2-*MtAGb*, pCAPE2-*MtAGbbis1* y pCAPE2-*MtAGbbis2*

El silenciamiento simultáneo de los transcritos *MtAGa* y *MtAGb* en las plantas pCAPE2-*MtAGdoble* generó algunas flores con un fenotipo que involucraba la pérdida de la identidad de estambres (transformados en estructuras petaloides) y carpelos (están deformes o recuerdan estructuras sepaloides). Se pudo observar un caso de pérdida de determinación del meristemo floral (Figura 81). Las flores pCAPE2-*MtAGdoble* que

presentaron alteraciones fueron deformes o asimétricas (Figura 81, d) y además podían presentar estructuras petaloides o sepaloideas en su interior (punta de flecha en Figura 81, d).



**Figura 81. Alteraciones morfológicas observadas en flores pCAPE2-MtAGdoble.** a) Flor silvestre. b) Tubo estaminal de flor pCAPE2-MtAGdoble que presenta anteras aplastadas, inmaduras o petaloides (punta de flecha). c) Estambres petaloides de flor pCAPE2-MtAGdoble. d) Flor pCAPE2-MtAGdoble con órganos petaloides. La punta de flecha señala un órgano sepaloide en el interior. e) Carpelo doble de flor pCAPE2-MtAGdoble con un óvulo a la vista (punta de flecha). f) Órgano compuesto por capas y con puntas sepaloideas (punta de flecha) presente en el verticilo del carpelo. g) Despiece de flor pCAPE2-MtAGdoble. Las barras indican 1 mm.

En las flores en las cuales podía distinguirse aún el tubo estaminal, las anteras se observaban inmaduras y aplanadas (Figura 81, b) o estaban transformadas en estructuras petaloides (punta de flecha en Figura 81, b). En algunos casos se perdía la fusión del tubo estaminal y los estambres sueltos presentaban diferentes niveles de transformación en órganos petaloides (Figura 81, c). En las flores pCAPE2-MtAGdoble alteradas se observaron pocas conversiones homeóticas en el cuarto verticilo. Generalmente, los carpelos eran de aspecto silvestre pero levemente empequeñecidos. Se observó la presencia de un carpelo doble (Figura 81, e) que presentaba una ruptura que dejaba ver los óvulos (punta de flecha en Figura 81, e) o un carpelo transformado en un órgano compuesto por capas y que presentaba varias puntas tipo sépalo (Figura 81, f). Este último no estaba determinado ni presentaba óvulos en su interior. El despiece de la flor pCAPE2-MtAGdoble que presenta indeterminación meristemática se presenta en la Figura 81, g. Pueden apreciarse los sépalos inalterados y cinco pétalos de morfología similar a la silvestre. Posteriormente, se observa una sucesión de órganos tipo pétalo y estambres petaloides, y un órgano sepaloide indeterminado compuesto por capas.

El fenotipo de las flores pCAPE2-MtAGdoble recuerda al fenotipo de las flores pCAPE2-PsAGdoble. Sin embargo en *Medicago truncatula*, a diferencia de *Pisum sativum*, no se observaron fenotipos en las flores de las plantas afectadas en la expresión de uno de los genes. Además, la frecuencia en la aparición de fenotipos alterados en *Medicago truncatula* (2% flores alteradas) es mucho menor que en *Pisum sativum* (45% flores alteradas), debido a la menor eficiencia de infección del virus PEBV en *Medicago truncatula*, al no ser su huésped natural.

#### **1.2.4 Expresión constitutiva en plantas de *Arabidopsis thaliana***

Los análisis de secuencia y patrones de expresión de *MtAGa* y *MtAGb* sugieren una posible función de ambos como genes de identidad de órgano floral de clase C. Para comprobar esta hipótesis se utilizó la expresión constitutiva en el sistema transgénico heterólogo *Arabidopsis thaliana* como herramienta alternativa para el estudio de la función de dichos genes. Las regiones codificantes de *MtAGa* y *MtAGb* (en ambas formas: *MtAGbS* y *MtAGbL*) se clonaron en el vector binario de expresión en plantas pBIN-JIT bajo el control del doble promotor 2X35S CaMV (ver apartado 3.1.3, Materiales y Métodos).

Como resultado de la transformación de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones 2X35S::MtAGa, 2X35S::MtAGbS y 2X35S::MtAGbL se obtuvieron más de 300 plantas T<sub>1</sub> independientes capaces de crecer en medio de selección con kanamicina. En la Tabla 22 se muestra el número de líneas resistentes a kanamicina obtenido, indicando aquellas que presentaron fenotipo alterado (alrededor de 1/3 de las plantas 2X35S::MtAGa y 2X35S::MtAGbS y cerca de 2/3 de las plantas 2X35S::MtAGbL).

**Tabla 22. Número de líneas resistentes a kanamicina y número de líneas con fenotipo alterado por transformación con las construcciones de expresión constitutiva**

Construcción	Líneas resistentes	Líneas fenotipo alterado
2X35S::MtAGa	119	45 (37.8%)
2X35S::MtAGbS	118	43 (36,4%)
2X35S::MtAGbL	118	71 (60,2%)

#### 1.2.4.1 Expresión constitutiva de MtAGa en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Con el fin de determinar el número de inserciones de T-DNA de MtAGa se realizó el análisis de segregación de varias líneas transgénicas que mostraban alteraciones fenotípicas en la T<sub>1</sub>, mediante la siembra de la progenie T<sub>2</sub> en medio de selección con kanamicina. Se sembraron semillas procedentes de plantas control (sin transformar) y transgénicas 2X35S::MtAGa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23. Segregación de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas T<sub>2</sub> 2X35S::MtAGa**

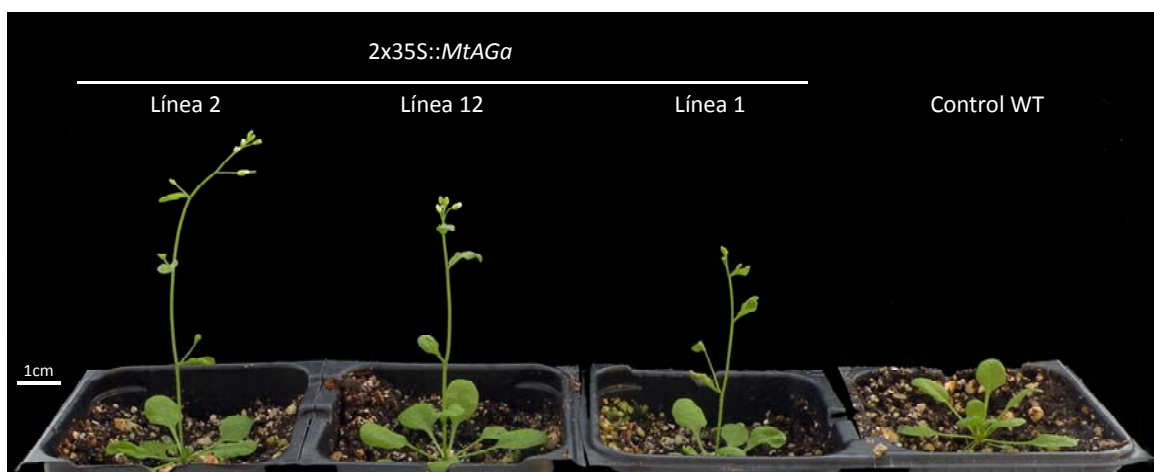
Línea	Plantas T <sub>2</sub> analizadas	Fenotipo Kan <sup>R</sup>		Segregación	Valor $\chi^2$	Nivel de significación (P)	No. Copias
		+ (R)	- (S)				
1	163	116	47	3:1	1,2781	0,2590	1
2	185	143	42	3:1	0,5207	0,4740	1
7	187	138	49	3:1	0,1444	0,7039	1
8	163	148	15	15:1	2,4250	0,1264	2
19	180	128	52	3:1	1,4519	0,2297	1
28	89	72	17	3:1	1,6517	0,1990	1
60	187	136	51	3:1	0,5152	0,4762	1
81	186	178	8	15:1	1,206	0,2734	2
84	177	137	40	3:1	0,5443	0,4647	1

Kan: kanamicina; R: resistentes; S: sensibles



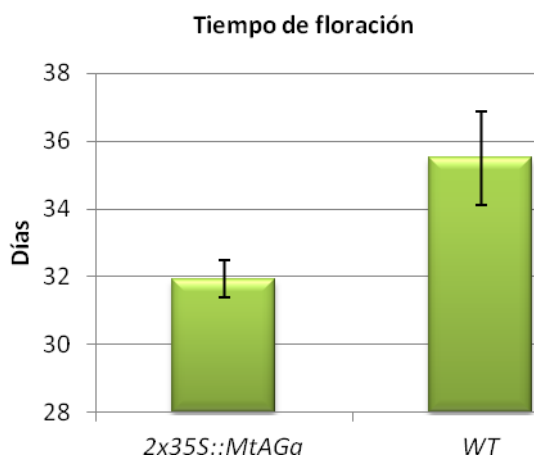
La tolerancia a kanamicina en las líneas T<sub>2</sub> analizadas se ajusta a una segregación 3:1, que corresponde a la esperada para una única inserción del transgén, con excepción de las líneas 2X35S::*MtAGa*-8 y 2X35S::*MtAGa*-81 cuyos datos de segregación (15:1) sugieren que se han producido dos inserciones.

Las líneas con expresión constitutiva de *MtAGa* que presentaban alteraciones fenotípicas mostraban fenotipos similares, con distintos grados de intensidad. Todas las líneas con fenotipo modificado presentaban adelanto del tiempo de floración respecto a la línea control. En la Figura 82 se ejemplifica cómo tres líneas representativas han florecido, mientras que la planta control continúa su desarrollo vegetativo.



**Figura 82. Plantas de líneas que expresan constitutivamente *MtAGa*.** Se aprecia adelanto del tiempo de floración de estas líneas respecto a una planta silvestre (WT).

Las plantas transgénicas y las plantas control realizan la transición floral con el mismo número de hojas de roseta (8 – 9), solo que las transgénicas crecen más rápido, pasando a la fase reproductiva en un tiempo más corto. En la Figura 83 se muestran los días que tardan en florecer, de media, estas plantas.



**Figura 83. Tiempo de floración de las plantas 2x35S::*MtAGa*.** Se muestran los días que tardan en florecer las plantas 2x35S::*MtAGa* comparadas con las plantas control (WT). Las barras indican el error estándar.

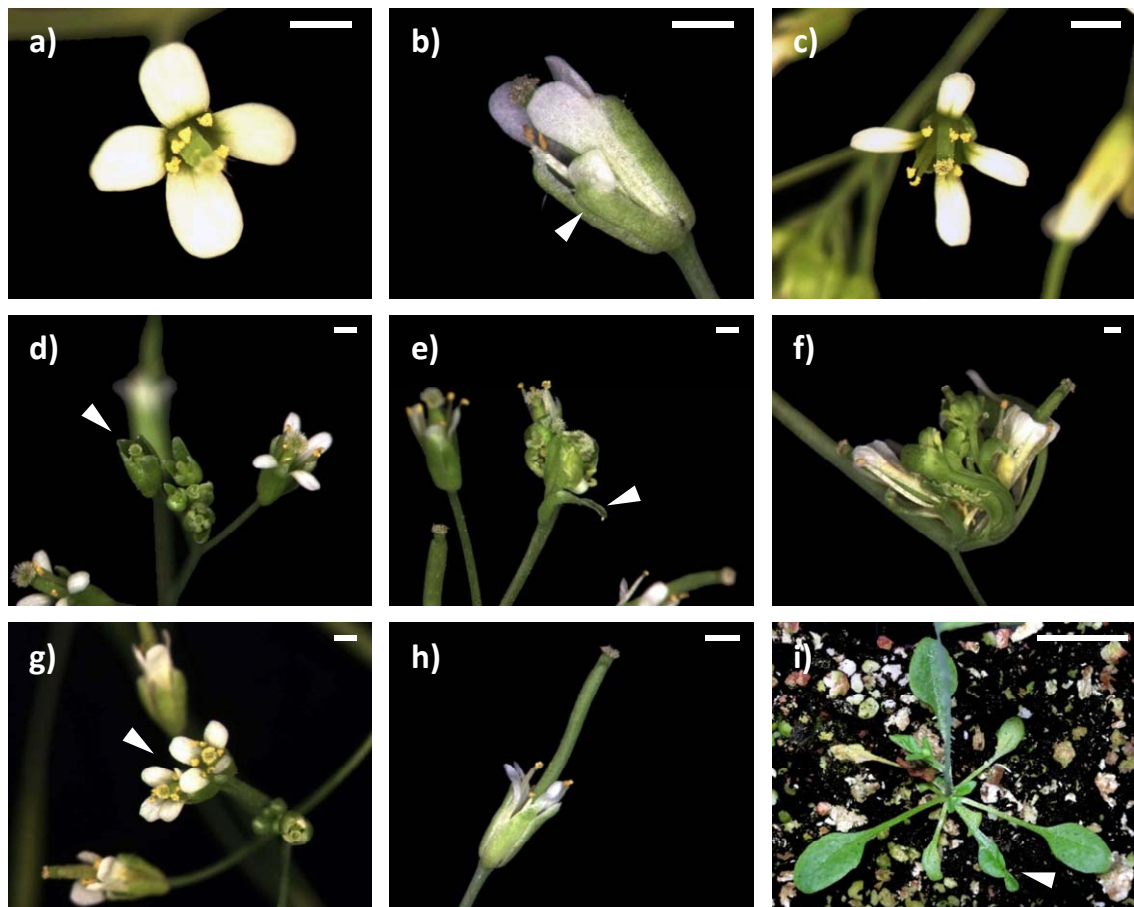
La flor de *Arabidopsis thaliana* tiene una estructura simple, típica de las Brassicaceae. Posee un cáliz con cuatro sépalos y una corola de cuatro pétalos, cuya posición es alterna a la de los sépalos. En androceo está compuesto por seis estambres y el gineceo por dos carpelos fusionados.

El fenotipo de las flores de las líneas 2x35S::*MtAGa* está alterado: los órganos del primer verticilo suelen estar curvados hacia el interior de la flor (Figura 84, b), en ocasiones atrapando a los pétalos (indicado con punta de flecha en Figura 84, b). También presentan ocasionalmente desnivel en su altura. Los pétalos presentan transformaciones homeóticas leves hacia estambres, que se ponen de manifiesto por cambios en su morfología: aparecen más estrechos que los de la planta control (Figura 84, c). Además, la disposición de los pétalos pierde simetría. En ocasiones el número de órganos florales producido se ve alterado, encontrando flores con más o menos pétalos. El desarrollo alterado de los órganos del primer y segundo verticilo puede observarse desde estadios tempranos del desarrollo floral. A diferencia de las plantas control, en las líneas 2x35S::*MtAGa* muchas yemas florales tempranas del ápice inflorescente se encuentran abiertas (indicado con punta de flecha en Figura 84, d). Este aspecto “abierto y vacío” es resultado de la curvatura anormal de los sépalos y del tamaño reducido de los pétalos en las plantas transgénicas.

Además del adelanto en el tiempo de floración y las transformaciones homeóticas en el primer y segundo verticilo, se observan alteraciones en la arquitectura de la planta, como la determinación del meristemo apical en estructuras terminales modificadas, en contraste con el crecimiento indeterminado de dicho meristemo en las plantas control. Dichas estructuras consisten, en general, en transformaciones carpeloides retorcidas y fusionadas que contienen órganos florales en su interior (Figura 84, e y f). En ocasiones, en la base de dichas estructuras se forma una hoja caulinar curvada (indicado con punta de flecha en Figura 84, e).

En las plantas 2x35S::*MtAGa* es usual encontrar flores y frutos “dobles”, es decir, dos flores fusionadas que se originan a partir del mismo pedicelo (indicado con punta de flecha en Figura 84, g). Estas flores desarrollan frutos dobles. Los frutos de fenotipo normal de las plantas transgénicas suelen presentar no-abscisión de los órganos florales, que senescen pero permanecen adheridos al fruto (Figura 84, h). Frecuentemente, los órganos vegetativos también se ven modificados, apareciendo curvadas tanto las hojas

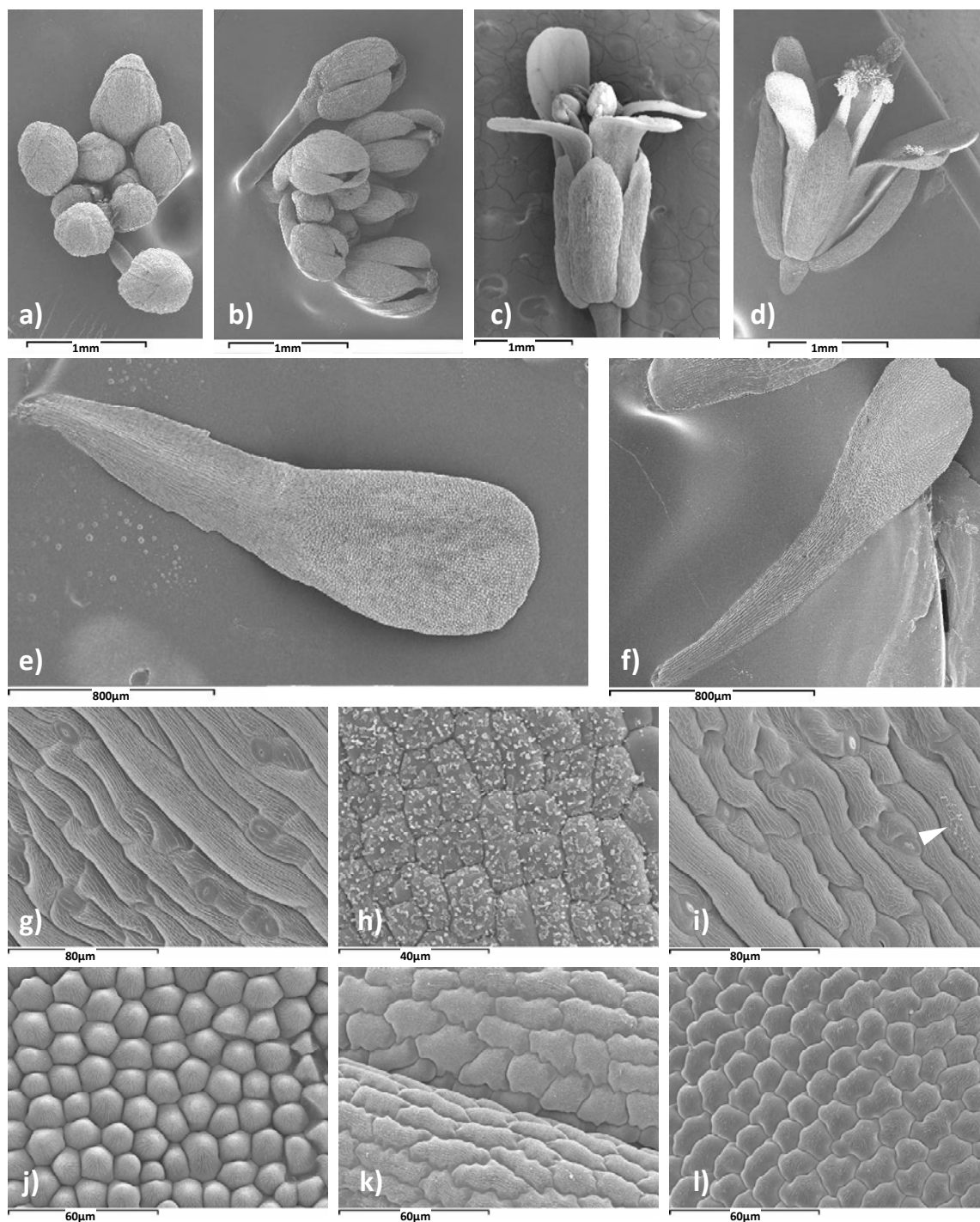
caulinares como las que forman parte de la roseta (indicado con punta de flecha en Figura 84, i).



**Figura 84. Fenotipo de las líneas transgénicas con expresión constitutiva de *MtAGa* en *Arabidopsis thaliana*.** a) Flor silvestre. b) Flor *2x35S::MtAGa*, la punta de flecha señala un sépalo curvado que atrapa al pétalo. c) Flor *2x35S::MtAGa* cuyos pétalos están estrechados. d) Ápice inflorescente *2x35S::MtAGa*; muchas yemas florales se presentan abiertas. e) y f) Estructuras terminales modificadas producidas por plantas *2x35S::MtAGa*; la punta de flecha señala una hoja caulinar curvada. g) Flores dobles presentes en las plantas transgénicas, indicadas por una punta de flecha. h) Fruto *2x35S::MtAGa*; no-abscisión de los órganos florales al desarrollarse el fruto. i) Roseta de una planta *2x35S::MtAGa*; la punta de flecha señala una de las hojas curvadas. Las barras indican 1 mm, excepto en i, donde indica 1 cm.

El fenotipo de las flores de las plantas *2x35S::MtAGa* se analizó mediante criomicroscopía electrónica de barrido. En la Figura 85 se pueden apreciar con detalle las transformaciones homeóticas anteriormente mencionadas. Se observa el aspecto “abierto y vacío” de las yemas florales tempranas de las plantas *2x35S::MtAGa* (Figura 85, b), así como un tamaño más compacto de las flores transgénicas (Figura 85, d) en comparación con las flores silvestres (Figura 85, c). Puede observarse en las flores

*2x35S::MtAGa* una curvatura de los sépalos hacia el interior (Figura 85, d) ligeramente más acentuada que en las flores silvestres.



**Figura 85. Fenotipo de las flores *2x35S::MtAGa* observado mediante criomicroscopía electrónica de barrido.** a) Ápice inflorescente de planta silvestre. b) Ápice inflorescente de planta *2x35S::MtAGa*. c) Flor de fenotipo silvestre. d) Flor *2x35S::MtAGa* con curvatura de sépalos y pétalos estrechados. e) Pétalo de flor de fenotipo silvestre. f) Pétalo estrechado y más pequeño de flor *2x35S::MtAGa*. g) Detalle de tejido de sépalo silvestre. h) Detalle de tejido de carpelo silvestre. i) Detalle de tejido de sépalo *2x35S::MtAGa*; la punta de flecha señala la presencia de ceras características de tejido de carpelo. j) Detalle de tejido de pétalo silvestre. k) Detalle de tejido de antera silvestre. l) Detalle de tejido de pétalo *2x35S::MtAGa* que recuerda la estructura tisular característica de antera. Las barras indican 1 mm en a, b, c y d; 800 μM en e y f; 80 μM en g y i; 40 μM en h y 60 μM en j, k y l.

También puede verse que los pétalos de las flores transgénicas presentan estrechamiento, principalmente en la región media y basal de los mismos (Figura 85, f), además de presentar un tamaño reducido en cerca de un 20% respecto a un pétalo silvestre (Figura 85, e). A nivel celular, se observa que el tejido del sépalo 2x35S::*MtAGa* (Figura 85, i) presenta una estructura muy similar a la del sépalo silvestre (Figura 85, g), aunque presenta algunas ceras en su superficie (punta de flecha en la Figura 85, i), que están ausentes en sépalos silvestres, pero son comunes en carpelos silvestres (Figura 85, h). Las células del tejido de pétalo 2x35S::*MtAGa* (Figura 85, l) difieren de las células típicas de pétalo silvestre (Figura 85, j), recordando más bien a las células ornamentadas típicas de las anteras silvestres (Figura 85, k).

#### 1.2.4.2 Expresión constitutiva de *MtAGbS* y *MtAGbL* en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se realizó el análisis de segregación de algunas líneas 2X35S::*MtAGbL* que presentaban alteraciones fenotípicas en la T<sub>1</sub>, en función de la proporción de plantas T<sub>2</sub> resistentes a kanamicina. Los resultados se muestran en la Tabla 24. La tolerancia a kanamicina en las líneas T<sub>2</sub> analizadas se ajusta a una segregación 3:1, que corresponde a una única inserción del transgén. En las líneas transgénicas 2X35S::*MtAGbL*-2 y 2X35S::*MtAGbL*-17 hay dos inserciones. No se analizaron plantas 2X35S::*MtAGbS* ya que, comparadas con las plantas control, no presentaban alteraciones fenotípicas evidentes.

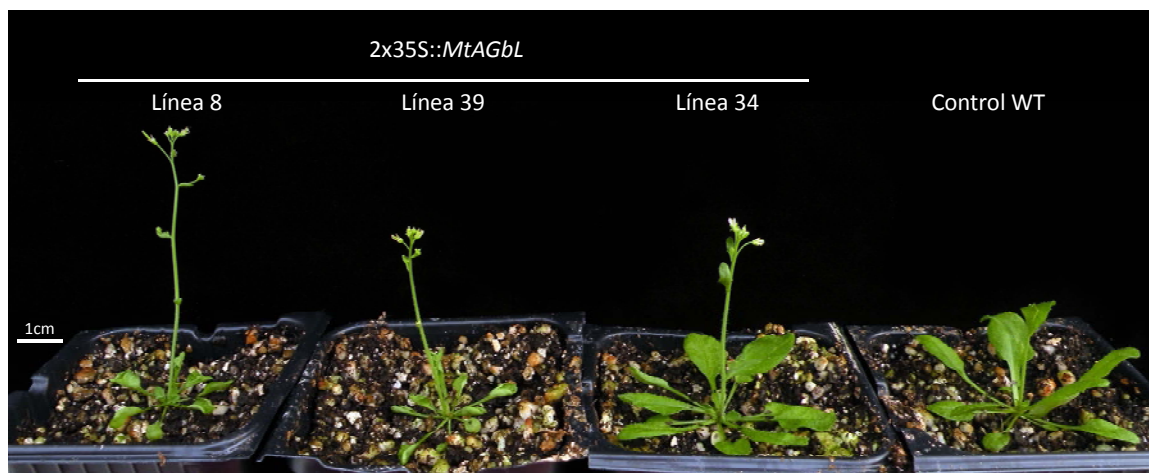
**Tabla 24. Segregación de la resistencia a kanamicina en plantas transgénicas T<sub>2</sub> 2X35S::*MtAGbL***

Línea	Plantas T <sub>2</sub> analizadas	Fenotipo Kan <sup>R</sup>		Segregación	Valor $\chi^2$	Nivel de significación (P)	No. Copias
		+ (R)	- (S)				
<b>2</b>	97	92	5	15:1	0,1990	0,6598	2
<b>3</b>	89	70	19	3:1	0,6330	0,4296	1
<b>17</b>	172	165	7	15:1	1,3950	0,2387	2
<b>34</b>	42	29	13	3:1	0,7937	0,3765	1
<b>39</b>	195	152	43	3:1	0,0278	0,8754	1

Kan: kanamicina; R: resistentes; S: sensibles

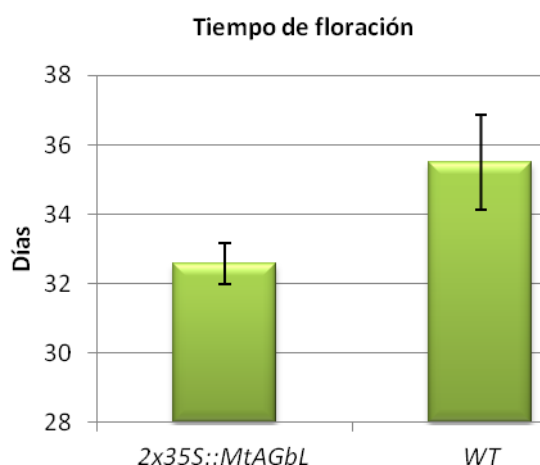
Las líneas con expresión constitutiva de *MtAGbL* que presentaban alteraciones mostraban fenotipos similares y, en la mayoría de las plantas, severos. Todas las líneas con fenotipo modificado presentaban adelanto del tiempo de floración respecto a la línea control, aunque este adelanto no fue tan acusado como en las plantas

*2x35S::MtAGa*. En la Figura 86 se ejemplifica cómo tres líneas representativas han florecido e incluso fructificado (líneas 8 y 39), mientras que la planta control ha elongado el tallo, pero aún no ha florecido.



**Figura 86. Plantas de líneas que expresan constitutivamente *MtAGbL*.** Se aprecia adelanto del tiempo de floración de estas líneas respecto a una planta silvestre (WT).

Al igual que las plantas *2x35S::MtAGa*, las plantas transgénicas *2x35S::MtAGbL* realizan la transición floral con el mismo número de hojas de roseta que las plantas control, solo que las transgénicas pasan a la fase reproductiva en un tiempo más corto. En la Figura 87 se muestran los días que tardan en florecer, de media, las plantas que expresan constitutivamente *MtAGb* en su forma larga.

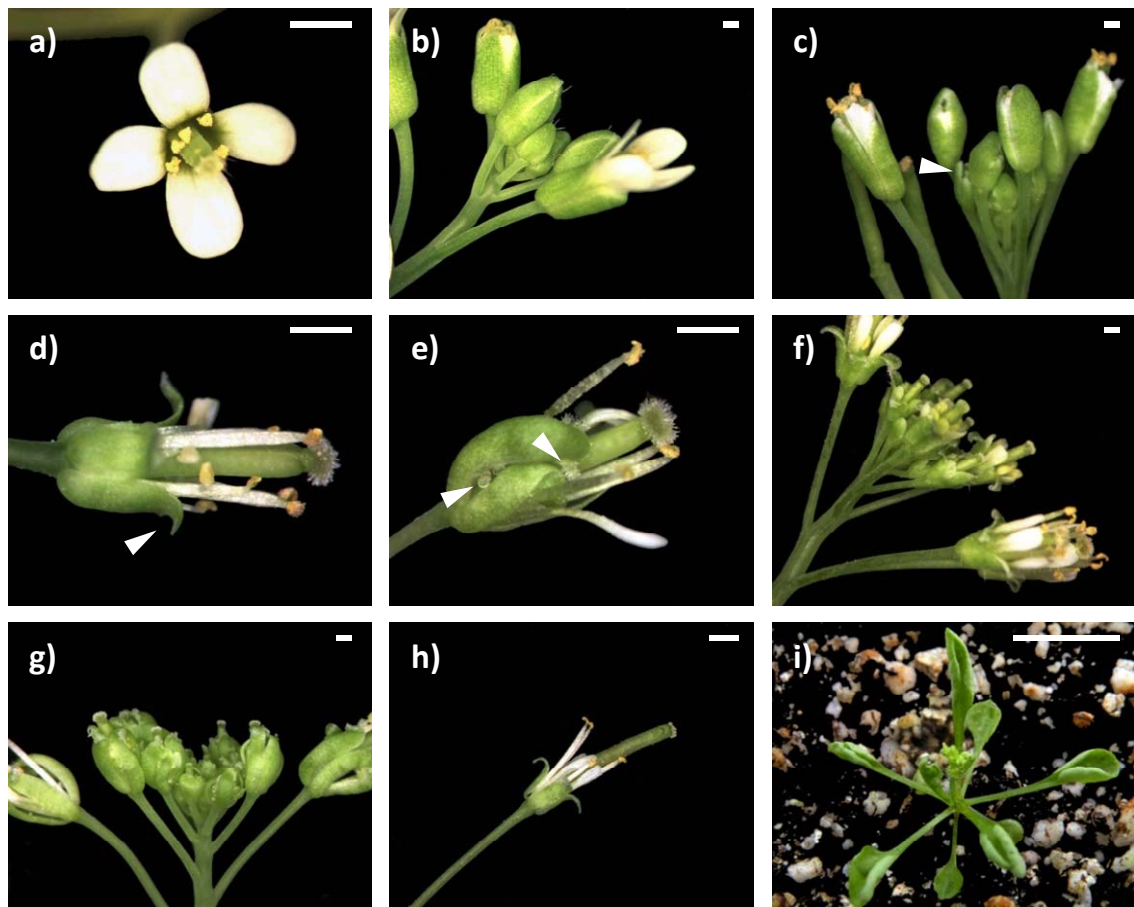


**Figura 87. Tiempo de floración de las plantas *2x35S::MtAGbL*.** Se muestran los días que tardan en florecer estas plantas comparadas con las plantas control (WT). Las barras indican el error estándar.

Las flores de las líneas *2x35S::MtAGbL* presentan las conversiones homeóticas esperadas para la expresión constitutiva de un gen de clase C. Los sépalos modificados suelen estar curvados hacia el exterior de la flor (indicado con punta de flecha en Figura



88, d) o se presentan transformados en órganos carpeloides con óvulos y papilas estigmáticas ectópicas (indicados con punta de flecha en Figura 88, e).



**Figura 88. Fenotipo de las líneas transgénicas con expresión constitutiva de *MtAGbS* o *MtAGbL* en *Arabidopsis thaliana*.** a) Flor silvestre. b) Ápice inflorescente silvestre; c) Ápice inflorescente 2x35S::*MtAGbS*; alguna yema floral se presenta abierta. d) Flor 2x35S::*MtAGbL* con conversiones homeóticas de pétalos a estambres. La punta de flecha señala un sépalo curvado. e) Flor 2x35S::*MtAGbL* con conversiones homeóticas de sépalos a carpelos. Las puntas de flecha señalan óvulos y papilas estigmáticas ectópicas. f) Ápice inflorescente 2x35S::*MtAGbL*; las yemas florales se presentan abiertas. g) Ápice inflorescente 2x35S::*MtAGbL* con conversiones homeóticas de sépalos a carpelos. Las yemas florales se presentan abiertas. h) Fruto 2x35S::*MtAGbL*; no-abscisión de los órganos florales al desarrollarse el fruto. i) Roseta de una planta 2x35S::*MtAGbL* con las hojas curvadas. Las barras indican 1 mm, excepto en i, donde indica 1 cm.

Los pétalos presentan transformaciones homeóticas en estambres: aparecen muy estrechados (Figura 88, e) o totalmente convertidos en estambres (Figura 88, d). El desarrollo alterado de estos órganos en las líneas 2x35S::*MtAGbL* puede detectarse desde estadios tempranos del desarrollo floral. La mayoría de las yemas florales se encuentran abiertas y tienen un aspecto vacío, independientemente de si las flores que se desarrollen a partir de dichas yemas presenten fenotipo con sépalos curvados hacia

fuera o sépalos carpeloides (Figura 88, f y g). Este aspecto resulta de la curvatura anormal de los sépalos y de las alteraciones de los pétalos.

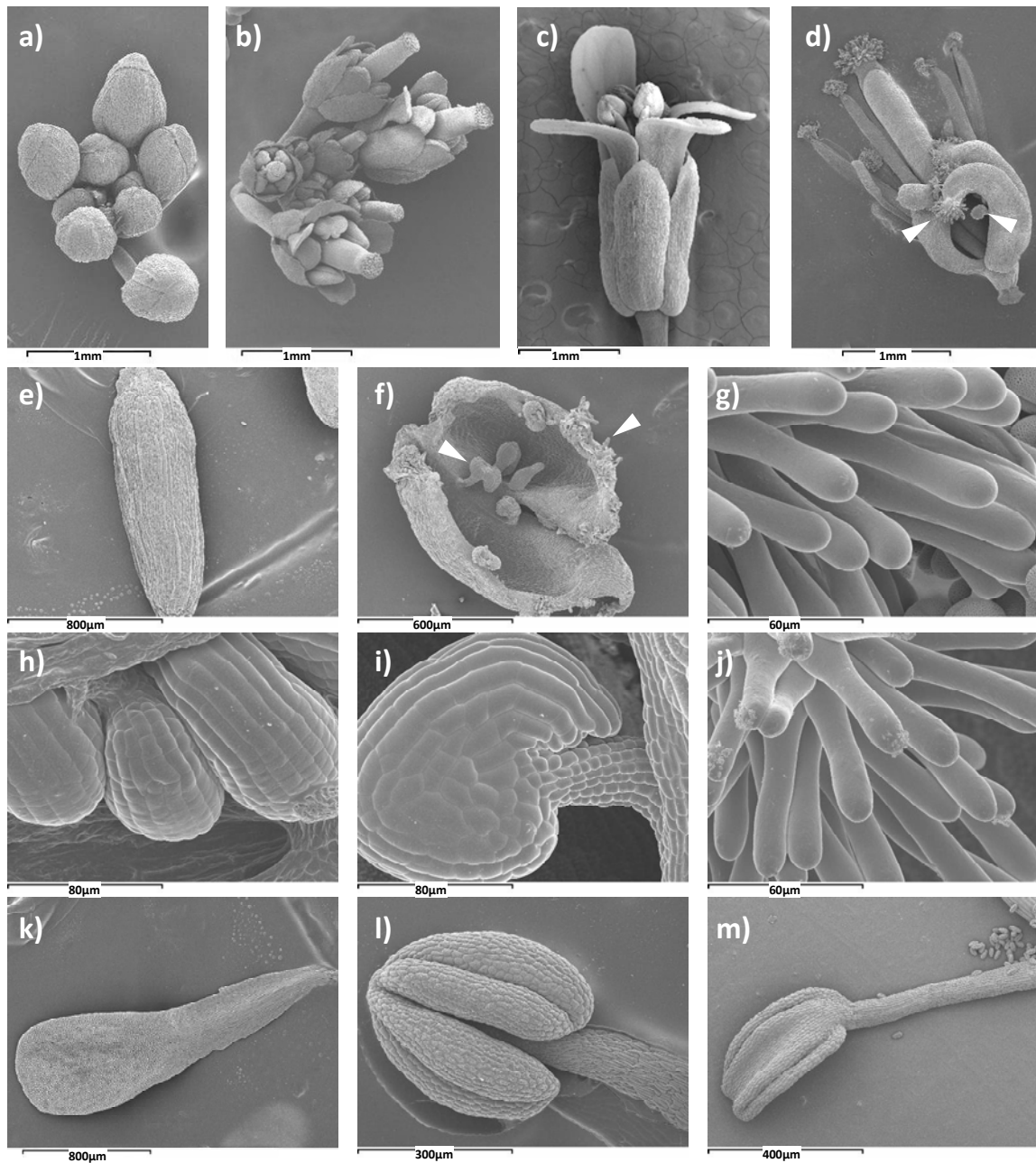
Además de las transformaciones homeóticas en el primer y segundo verticilo, se observan alteraciones en la arquitectura de la planta. Al igual que en las líneas *2x35S::MtAGa*, los frutos *2x35S::MtAGbL* presentan no-abscisión de los órganos florales, que senescen pero permanecen adheridos al fruto (Figura 88, h). Los órganos vegetativos también se ven modificados, apareciendo curvadas tanto las hojas caulinares como las de la roseta (Figura 88, i). Estos fenotipos son más severos en estas plantas que en las plantas *2x35S::MtAGa*.

El fenotipo de las flores de las plantas *2x35S::MtAGbL* se analizó mediante criomicroscopía electrónica de barrido. La Figura 89 presenta detalles de los aspectos fenotípicos comentados, mientras que en la Figura 90 se pueden apreciar las conversiones homeóticas de los tejidos a nivel celular.

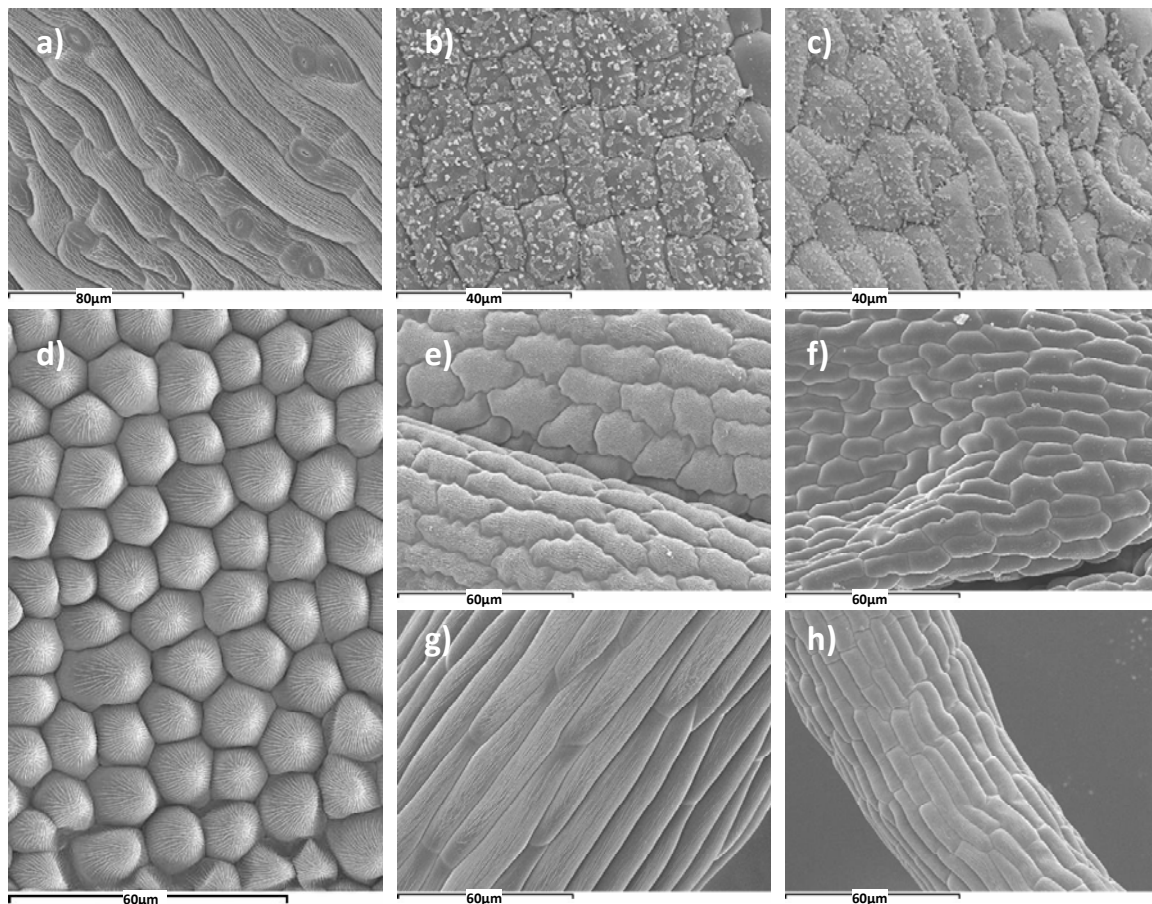
Se observa el aspecto totalmente abierto de las yemas florales tempranas de las plantas *2x35S::MtAGbL* (Figura 89, b), así como las transformaciones homeóticas de los órganos de primer y segundo verticilo en las flores transgénicas (Figura 89, d). Puede observarse en las flores *2x35S::MtAGbL* la conversión de sépalos en órganos carpeloides (Figura 89, f), que diferencian estructuras semejantes a óvulos y papilas estigmáticas (indicado con puntas de flecha). Estos óvulos (Figura 89, i) y papilas estigmáticas (Figura 89, j) ectópicos presentan los fenotipos de papilas estigmáticas y óvulos silvestres (Figura 89, g y h). También puede verse que los pétalos de las flores transgénicas presentan conversiones homeóticas en estambres (Figura 89, m), presentando pseudo-anteras similares a las anteras silvestres (Figura 89, l).

A nivel celular, las transformaciones homeóticas de sépalo en carpelo y de pétalo en estambre son casi completas. Los tejidos celulares de los sépalos *2x35S::MtAGbL* son muy similares a los observados en carpelos silvestres, con abundante presencia de ceras (Figura 90, c). Las células de las pseudo-anteras presentes en los órganos del segundo verticilo de las flores *2x35S::MtAGbL* (Figura 90, f) difieren de las células típicas de pétalo silvestre (Figura 90, d), recordando a las células ornamentadas típicas de las anteras silvestres (Figura 90, e). Además, las células de la región basal de estos órganos del segundo verticilo (Figura 90, h) se asemejan a las células del tejido de filamento estaminal de una planta silvestre (Figura 90, g).





**Figura 89. Fenotipo de los órganos de las flores  $2x35S::MtAGbL$  observado mediante criomicroscopía electrónica de barrido.** a) Ápice inflorescente de planta silvestre. b) Ápice inflorescente de planta  $2x35S::MtAGbL$ . c) Flor de fenotipo silvestre. d) Flor  $2x35S::MtAGbL$  con conversiones homeóticas en los verticilos primero y segundo; las puntas de flecha señalan la presencia de papilas estigmáticas y óvulos ectópicos. e) Sépalo de flor de fenotipo silvestre. f) Sépalo de flor  $2x35S::MtAGbL$ ; las puntas de flecha señalan la presencia de papilas estigmáticas y óvulos ectópicos. g) Papilas estigmáticas de flor de fenotipo silvestre. h) Óvulos de fenotipo silvestre. i) Óvulo ectópico de flor  $2x35S::MtAGbL$ . j) Papilas estigmáticas de flor  $2x35S::MtAGbL$ . k) Pétalo de flor de fenotipo silvestre. l) Antera de flor de fenotipo silvestre. m) Pétalo  $2x35S::MtAGbL$  transformado en estambre. Las barras indican 1 mm en a, b, c y d; 800  $\mu\text{M}$  en e, y k; 600  $\mu\text{M}$  en f; 400  $\mu\text{M}$  en m; 300  $\mu\text{M}$  en l; 80  $\mu\text{M}$  en h y i y 60  $\mu\text{M}$  en g y j.



**Figura 90. Morfología celular de los órganos modificados *2x35S::MtAGbL* observada mediante criomicroscopía electrónica de barrido.** a) Detalle de tejido de sépalo silvestre. b) Detalle de tejido de carpelo silvestre. c) Detalle de tejido de sépalo *2x35S::MtAGbL*, con estructura tisular de carpelo. d) Detalle de tejido de pétalo silvestre. e) Detalle de tejido de antera silvestre. f) Detalle de tejido de la región distal del pétalo *2x35S::MtAGbL* que recuerda la estructura tisular característica de antera. g) Detalle de tejido de filamento estaminal silvestre. h) Detalle de tejido de la región basal del pétalo *2x35S::MtAGbL* que recuerda la estructura tisular característica de filamento de estambre. Las barras indican 80  $\mu\text{M}$  en a; 60  $\mu\text{M}$  en d, e, f, g y h y 40  $\mu\text{M}$  en b y c.

---

# **CAPÍTULO II**

---

## **DISCUSIÓN**

---



En este capítulo se describe el análisis molecular y funcional de los posibles ortólogos de *AGAMOUS* de *Medicago truncatula*. Se han identificado dos genes parálogos, *MtAGa* y *MtAGb*, cuya secuencia y patrón de expresión están estrechamente relacionados con los genes de clase C de *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*. Se han realizado experimentos de pérdida y ganancia de función para investigar si estos genes parálogos desempeñan un papel en la especificación de la identidad de los órganos florales y/o en la determinación del meristemo floral, funciones características de la mayoría de los genes de clase C ortólogos a *AGAMOUS* (*AG*, Yanofsky *et al.*, 1990) o *PLENA* (*PLE*, Bradley *et al.*, 1993).

Se han analizado dos tipos de plantas de *Medicago truncatula* con pérdida de función del gen *MtAGb*: plantas transgénicas generadas utilizando la técnica del RNA interferente y un mutante etiquetado por inserción del retrotransposón *Tnt1*. Además, se han obtenido plantas de *Medicago truncatula* con pérdida de función de los genes *MtAGa* y *MtAGb*, así como plantas de *Pisum sativum* con pérdida de función de los genes *PsAGa* y *PsAGb* (ortólogos de *MtAGa* y *MtAGb*) utilizando la tecnología VIGS. Considerando los altos niveles de sintenia entre estas dos leguminosas (Choi *et al.*, 2004; Kaló *et al.*, 2004), se ha considerado que es muy probable que las funciones génicas sean análogas. Para complementar los resultados obtenidos mediante pérdida de función génica, se han realizado experimentos de ganancia de función mediante la sobreexpresión de *MtAGa* y *MtAGb* en un sistema heterólogo: *Arabidopsis thaliana*.

## **1 *MtAGa* Y *MtAGb* PRESENTAN HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL CON GENES DE FUNCIÓN C**

Para clasificar a los genes MADS-box en sub-grupos dentro de la familia, se han utilizado varios criterios. Éstos incluyen la similitud de secuencia, la presencia de residuos aminoacídicos en posiciones características en el dominio MADS y la presencia/ausencia de una extensión N-terminal, entre otros (Davies *et al.*, 1999). Se ha propuesto que estas características podrían sugerir funciones para genes MADS-box recién descubiertos (Theissen, 1996). *MtAGa* y *MtAGb* son dos genes MADS-box de *Medicago truncatula* cuyas proteínas presentan porcentajes elevados de homología de secuencia con proteínas codificadas por genes del linaje *euAG* del grupo *AG* y comparten

las características típicas de los genes de función C, como la organización génica, la similitud de secuencia y el potencial de interacción proteína-proteína.

Se ha descrito que entre genes MADS-box cercanamente relacionados, aunque funcionalmente divergentes, es el dominio C-terminal el que presenta el mayor grado de diversificación aminoacídica (Moore *et al.*, 2005). Este es el caso de MtAGa y MtAGb, que presentan un 81% de homología al comparar las secuencias completas, pero 68% considerando únicamente la región C-terminal. Estudios previos de genes MADS-box como *AP3* y *PI* muestran también diferencias en el dominio C-terminal (Kramer *et al.*, 1998; Lawton-Rauh *et al.*, 1999; Purugganan y Suddith, 1999; Lamb e Irish, 2003), que resultan en diversificación funcional. Estos datos llevan a pensar que la diversificación funcional entre *MtAGa* y *MtAGb* es altamente posible.

Una característica común a los miembros del linaje C es la presencia de una extensión N-terminal (de 13 a más de 52 aminoácidos) que precede al dominio MADS (Jager *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2004) y que no está presente en otros genes MADS-box tipo MIKC (Purugganan *et al.*, 1995). En MtAGa y MtAGb la caja MADS está precedida por 15 y 16 aminoácidos, respectivamente. Este fragmento también se ha encontrado en las proteínas ortólogas de las leguminosas *Pisum sativum*, *Lotus japonicus* y *Glycine max* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001; Dong *et al.*, 2005 y este trabajo). Mizukami *et al.* (1996) describen que la extensión N-terminal de AG no es esencial para los aspectos más importantes de la función génica. Sin embargo, ya que esta región se ha mantenido durante la evolución de las proteínas del linaje C, podría tener una función *in vivo* específica para ellas (Mizukami *et al.*, 1996) como, por ejemplo, la modulación de la actividad de unión a DNA (Riechmann y Meyerowitz, 1997).

En el extremo C-terminal de MtAGa y MtAGb hay dos regiones cortas altamente conservadas, llamadas “AG motif I” y “AG motif II”. También se observaron en MtSHP (ver apartado 1.5.2, Resultados Capítulo I). Estos motivos no parecen tener relación con ningún motivo funcional conocido, pero su conservación en genes del grupo AG los define como sinapomorfias del mismo (Kramer *et al.*, 2004).

*MtAGbS* y *MtAGbL* son dos transcritos del gen *MtAGb* derivados de un evento de *splicing* alternativo. Este fenómeno se ha observado en genes MADS-box, como *AP3*, gen de identidad floral de clase B (Sablowski *et al.*, 1998; Yi y Jack, 1998) o *EAP2* de *Eucalyptus globulus* (un gen de clase A homólogo de *AP1*; Kyojuka *et al.*, 1997). El

*splicing* alternativo que afecta a miembros de la familia AG se ha descrito previamente (Kitahara y Matsumoto, 2000; Cheng *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Lightfoot *et al.*, 2008), pero la significación funcional de estos eventos aún no se ha elucidado (Hands *et al.*, 2011). Análisis genómicos en *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana* sugieren que el 20% de los genes sufren *splicing* alternativo, siendo la retención de intrones el efecto más común (Wang y Brendel, 2006). La pérdida o ganancia de exones puede resultar en la pérdida o adquisición de módulos funcionales discretos (Long *et al.*, 1996) o en la neofuncionalización mediante la modificación de secuencia (Drea *et al.*, 2006). Las dos isoformas de *MtAGb* difieren en que *MtAGbL* presenta el sexto exón, que está ausente en *MtAGbS*. Este exón está conformado por las 42 pb del final de la caja K, región implicada en la dimerización e interacción con otras proteínas (Lightfoot *et al.*, 2008). Como se ha podido demostrar mediante experimentos de expresión constitutiva, únicamente *MtAGbL* es funcional como gen de clase C en *Medicago truncatula*. Sin embargo, no debe descartarse una posible función discreta de *MtAGbS*. La producción de transcritos alternativos provee una manera de diversificar las funciones génicas (Hands *et al.*, 2011). Así pues, es posible que ambos transcritos tengan funciones distintas en cuanto a sus interacciones proteína-proteína o en sus actividades transcripcionales.

El número y posición de los intrones están usualmente conservados entre los homólogos de AG de diferentes especies (Yanofsky *et al.*, 1990; Theissen *et al.*, 1995; Rutledge *et al.*, 1998; Kitahara y Matsumoto, 2000). En *MtAGa* y *MtAGb* así como en los genes *LjAGa* y *LjAGb*, ortólogos de *MtAGa* y *MtAGb* en *Lotus japonicus* (Dong *et al.*, 2005), estas características están conservadas. Este hecho aporta evidencia adicional de que *MtAGa* y *MtAGb* son genes homólogos a AG.

En los genes homólogos a AG, el primer intrón es grande, de 3 a 5 Kb (Brunner *et al.*, 2000) y hay evidencia que sugiere que contiene elementos reguladores que contribuyen al control de su expresión espacial y temporal (Bradley *et al.*, 1993; Sieburth y Meyerowitz, 1997; Bomblies *et al.*, 1999; Deyholos y Sieburth, 2000). En el intrón correspondiente de *MtAGb* se identificaron posibles secuencias reguladoras como cajas CArG (Shore y Sharrocks, 1995) y sitios de unión de factores de transcripción, como LFY (LEAFY; Schultz y Haughn, 1991) o WUS (WUSCHEL; Laux *et al.*, 1996), cuya unión a AG se requiere para la actividad normal del promotor (Busch *et al.*, 1999; Lohmann *et al.*,

2001). También se ha encontrado una secuencia de 70 nucleótidos que está conservada en los intrones correspondientes de varios genes de clase C y para la cual se ha sugerido un papel en la regulación negativa de la expresión génica (Davies, 1999a). Además, este fragmento incluye una secuencia CCAATCA, que se requiere para mantener la expresión de *AG* (Davies *et al.*, 1999; Mantovani, R., 1998). Quedan pendientes de realización experimentos para comprobar la funcionalidad de estos posibles elementos reguladores del intrón de *MtAGb*.

La presencia de todas estas características indica que *MtAGa* y *MtAGb* son genes de función C.

## **2 *MtAGa* Y *MtAGb* FUNCIONAN COMO GENES DE CLASE C**

Los genes de función C se expresan principalmente en los dos verticilos internos de la flor y contribuyen al desarrollo y determinación de la identidad de estambres y carpelos, así como a la determinación del meristemo floral. Los genes *MtAGa* y *MtAGb* de *Medicago truncatula* se expresan con un patrón similar durante la mayor parte del desarrollo floral, coincidiendo con el descrito para genes de función C como *AG* o *PLE* (Yanofsky *et al.*, 1990; Drews *et al.*, 1991; Bowman *et al.*, 1991a; Bradley *et al.*, 1993), aunque el inicio de la expresión de *MtAGa* y *MtAGb* se produce en un estadio previo, antes de la iniciación de los primordios de sépalos. Este tipo de expresión temprana se describió para *PsAGb* de *Pisum sativum* y *LjAGa/LjAGb* de *Lotus japonicus*, relacionándola con la iniciación y determinación precoz del carpelo en las leguminosas (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001; Dong *et al.*, 2005). Curiosamente, durante el desarrollo tardío del carpelo, se observó que la expresión de *MtAGa* y *MtAGb* tendía a ser más intensa en la región abaxial del carpelo y posteriormente se limitaba a la región distal del mismo. Esta expresión no se ha descrito en otras leguminosas (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001; Dong *et al.*, 2005), así que es posible que esté relacionada con la morfología particular del carpelo (y posterior fruto) de *Medicago truncatula*. Además, la expresión diferencial de *MtAGa* y *MtAGb* en la semilla (epidermis y endotelio, respectivamente) lleva a pensar que estos genes tienen alguna función, aún desconocida, en el fruto.



AG es el único gen de clase C en *Arabidopsis thaliana*, pero se han aislado dos genes de clase C en *Antirrhinum majus* (Bradley *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1999), *Lotus japonicus* (Dong *et al.*, 2005), *Petunia hybrida* (Angenent *et al.*, 1993; Tsuchimoto *et al.*, 1993), *Nicotiana tabacum* (Kempin *et al.*, 1993), *Populus trichocarpa* (Brunner *et al.*, 2000), *Eschscholzia californica* (Yellina *et al.*, 2010) y *Papaver somniferum* (Hands *et al.*, 2011), entre otras. En la mayoría de estos casos, los patrones de expresión de ambos genes son casi idénticos. Sin embargo, en otras especies que contienen dos homólogos AG se ha podido observar diversificación de función y/o expresión. Este es el caso de *OsMADS3* y *OsMADS58* de *Oryza sativa*, los cuales se expresan en los verticilos tres y cuatro, pero difieren en su expresión temporal (Yamaguchi *et al.*, 2006) o los genes *ZAG1* y *ZMM2* de *Zea mays*, cuyos patrones de expresión diferenciales, el primero en carpelos y el segundo en estambres, indican que se han subfuncionalizado (Mena *et al.*, 1996). Los dos ortólogos de AG en *Medicago truncatula* también presentan diferencias de expresión durante el desarrollo floral. Antes de que los primordios comunes se dividan en primordios de órganos, *MtAGa* presenta expresión intensa en todo el meristemo, mientras que *MtAGb* se expresa en la región central del mismo. Esto apunta a que *MtAGa* puede tener un papel significativo en la determinación de la identidad del meristemo floral. Más adelante, *MtAGb* tiene una expresión más intensa que su parólogo en los órganos de tercer y cuarto verticilo, sugiriendo que está más implicado que *MtAGa* en la especificación de la identidad de los órganos reproductores florales.

Según el modelo ABC, la pérdida de función C resulta en la expansión de la función A al tercer y cuarto verticilo (Bowman *et al.*, 1991a; Coen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994; Yanofsky, 1995; Ng y Yanofsky, 2001; Lohmann y Weigel, 2002; Jack, 2004). El mutante de pérdida de función C de *Arabidopsis thaliana* se caracteriza por presentar conversiones homeóticas de estambres en estructuras petaloides y de carpelos en estructuras sepaloideas además de perder la determinación del meristemo floral (Bowman *et al.*, 1989; Yanofsky *et al.*, 1990). En *Medicago truncatula*, el *knock-down* (mediante RNAi) o *knock-out* (mediante inserción de *Tnt1*) del gen *MtAGb* resulta en las conversiones homeóticas esperadas para una pérdida de función C. Sin embargo, las alteraciones observadas son más complejas que las descritas en *Arabidopsis thaliana*. Por un lado, los estambres no pierden del todo su identidad (indicando que *MtAGb* no es capaz de establecer del todo la identidad de los órganos reproductores), así que

probablemente no es el único gen involucrado en dicho proceso; por otro lado, el carpelo no se transforma en una estructura sepaloide sino que se presenta una multiplicación de carpelos en el cuarto verticilo, recordando los múltiples sépalos presentes en el primer verticilo. Se han descrito mutantes con carpelos múltiples en *Medicago truncatula* (Nair *et al.*, 2008), *Pisum sativum* (Kosterin, 1999) y *Glycine max* (Shuff y Thomas, 1993). Sin embargo, no se han aislado los genes afectados y se ha sugerido que las mutaciones se deben al efecto de factores ambientales o incluso variación somaclonal. En *Oryza sativa*, un mutante del gen ortólogo de *AG OsMADS3* presenta múltiples carpelos que se desarrollan en el cuarto verticilo, están fusionados en la base y su morfología es prácticamente normal. Tras el desarrollo de los múltiples carpelos el meristemo floral se consume, sugiriendo que el defecto en la determinación del meristemo floral es incompleto en este mutante (Yamaguchi *et al.*, 2006). Del mismo modo, el fenotipo de carpelos múltiples en *Medicago truncatula* sugiere que *MtAGb* no es capaz de indeterminar totalmente el meristemo floral.

En *Pisum sativum*, el *knock-down* (mediante VIGS) de *PsAGa* o *PsAGb* resulta en conversiones homeóticas leves en los órganos de tercer y cuarto verticilo. El tipo de conversiones son las esperadas para una pérdida de función C. No obstante, la levedad de los fenotipos sugiere que *PsAGa* y *PsAGb* son esencialmente redundantes, pudiendo uno complementar la función del otro. El silenciamiento de dos genes a la vez es importante cuando existen dos rutas redundantes o parcialmente redundantes que deben ser inhibidas para poder observar un fenotipo fuerte. Este tipo de silenciamiento puede obtenerse mediante VIGS en *Pisum sativum* (Constantin *et al.*, 2004). Así pues, las flores de *Pisum sativum* y de *Medicago truncatula* en las cuales se han silenciado ambos genes endógenos simultáneamente, muestran conversiones homeóticas evidentes de estambres en estructuras petaloideas y de carpelos en estructuras sepaloideas, además de la indeterminación del meristemo floral: fenotipo típico para la pérdida de función C. La reversión floral observada en las plantas pCAPE2-*PsAG*doble es un indicador más del estado indeterminado del meristemo en estas plantas. Se sabe que tras el establecimiento del meristemo floral, el gen *AG* sigue siendo requerido para mantener un estado indeterminado y reproductivo del meristemo (Okamuro *et al.*, 1996; Gregis *et al.*, 2006) y que las mutaciones en el mismo pueden llevar a una parcial o completa reversión floral (Okamuro *et al.*, 1996; Mizukami y Ma, 1997; Parcy *et al.*, 2002). Los

resultados obtenidos mediante VIGS indican que ambos parálogos no solo son redundantes, sino que además son indispensables para completar la función C.

Siguiendo la predicción del modelo ABC, la ganancia de función C conlleva la represión de la función A y, con ello, la expansión de la función C al primer y segundo verticilo (Coen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994; Yanofsky, 1995; Ng and Yanofsky, 2001; Lohmann y Weigel, 2002; Jack, 2004). La expresión ectópica de AG en *Arabidopsis thaliana* ocasiona conversiones homeóticas de los órganos del primer verticilo en estructuras carpeloides y estaminoidía en los órganos del segundo verticilo, además de floración temprana, hojas curvadas y pérdida de la determinación de la inflorescencia. (Mizukami y Ma, 1992). La expresión ectópica de muchos genes homólogos a AG de eudicotiledóneas, como *NAG1* de *Nicotiana tabacum* (Kempin *et al.*, 1993), *TAG1* de *Solanum lycopersicum* (Pnueli *et al.*, 1994; Busi *et al.*, 2003), *CUM1* de *Cucumis sativus* (Kater *et al.*, 1998), *CaMADS1* de *Corylus avellana* (Rigola *et al.*, 2001), *VvMADS1* de *Vitis vinifera* (Boss *et al.*, 2001), *TrAG* y *TrSHP* de *Taihangia rupestris* (Lü *et al.*, 2007) y *PsAGb* de *Pisum sativum* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001) resulta en alteraciones fenotípicas que reproducen las observadas en la expresión ectópica de AG en *Arabidopsis thaliana*. El fenotipo observado en las plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan constitutivamente *MtAGa* o *MtAGb* indica que estos genes son capaces de especificar la identidad de estambres y carpelos, ya que se ha observado la presencia de sépalos carpeloides y pétalos con características estaminoides. Además, se ha presentado adelanto en el tiempo de floración. Este fenotipo coincide, en esencia, con el observado al expresar ectópicamente genes de clase C de diferentes especies tanto en sistemas homólogos como heterólogos. No obstante, se han observado fenotipos diferenciales en la sobreexpresión de *MtAGa* y *MtAGb*. En las plantas *2x35S::MtAGbL* se observaron conversiones homeóticas muy intensas tanto en órganos como en tejidos. Estas conversiones fueron mucho más evidentes que en las plantas *2x35S::MtAGa*, indicando que *MtAGb* probablemente tenga una implicación mayor que *MtAGa* en la especificación de la identidad de los órganos reproductores. Por otra parte, en las plantas *2x35S::MtAGa* se observó mayor adelanto en el tiempo de floración y la generación tanto de estructuras terminales modificadas como de frutos y flores dobles, apuntando a un posible papel clave de *MtAGa* en la determinación del meristemo floral. En *Arabidopsis thaliana* se ha comprobado que la función de AG en la determinación del

meristemo puede separarse genéticamente de su función en la identidad de órganos (Mizukami y Ma, 1995; Sieburth *et al.*, 1995). En varias especies que presentan duplicación en los genes de clase C las funciones de AG también parecen haberse subfuncionalizado. En *Antirrhinum majus*, *PLE* (gen de clase C del linaje *PLE*) tiene una función similar a la de AG, mientras que *FAR* (gen de clase C del linaje *euAG*), es responsable del desarrollo de los órganos reproductores masculinos y es parcialmente redundante con *PLE* (Bradley *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1999). En *Oryza sativa*, *OsMADS3* y *OsMADS58* tienen papeles distintos: *OsMADS3* se requiere principalmente para la especificación de la identidad de estambre y *OsMADS58* confiere la determinación floral (Yamaguchi *et al.*, 2006). En *Cucumis sativus*, la expresión constitutiva de *CUM1* fenocopia a la de AG, mientras que la de *CUM10* resulta en transformaciones parciales de pétalos en estructuras tipo estambre, indicando un papel más limitado en la identidad de órganos florales (Kater *et al.*, 1998). Estos resultados muestran que, a diferencia de *Arabidopsis thaliana*, la función C en algunas angiospermas está dirigida por múltiples genes MADS que han desarrollado papeles distintos y parcialmente redundantes en el desarrollo floral (Hsu *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos mediante pérdida y ganancia de función de *MtAGa* y *MtAGb* indican que son genes de clase C que además de tener un alto grado de redundancia, se han subfuncionalizado de tal manera que *MtAGa* tiene un papel prioritario en la determinación del meristemo floral, mientras que *MtAGb* juega un papel clave en la especificación de la identidad de los órganos reproductores florales. Estas posibles funciones génicas encajan con los patrones de expresión diferenciales descritos anteriormente.

### **3 EL UMBRAL DE EXPRESIÓN DE *MtAGa* Y *MtAGb* REQUERIDO PARA DETERMINAR EL MERISTEMO O PARA ESTABLECER LA IDENTIDAD DE ÓRGANO FLORAL ES VARIABLE**

Según el análisis de los niveles de expresión de los genes *MtAGa* y *MtAGb* en las plantas RNAi, el silenciamiento no ha sido específico para *MtAGb*, sino que ha afectado también a su parálogo, en diferentes proporciones. En el mutante *mtagb*, obtenido

mediante inserción de *Tnt1*, los niveles de expresión de *MtAGb* son nulos y que la expresión de *MtAGa* no se ve afectada. En resumen, los fenotipos observados en relación con los niveles de expresión génica se muestran en la siguiente Tabla (Tabla 25).

**Tabla 25. Fenotipos observados en relación con los niveles de expresión génica**

Planta analizada	Nivel de <i>MtAGa</i>	Nivel de <i>MtAGb</i>	Fenotipo alterado
<b>35S::RNAi-<i>MtAGb</i> 1.1</b>	70%	60%	Ausente
<b>35S::RNAi-<i>MtAGb</i> 1.3</b>	85%	15%	Ausente
<b>35S::RNAi-<i>MtAGb</i> 5.7</b>	40%	40%	<b>Presente</b>
<b>Mutante <i>mtagb</i></b>	100%	0%	<b>Presente</b>

La presencia de fenotipo alterado en el mutante *mtagb* sugiere que el gen *MtAGa* no es totalmente redundante con *MtAGb*, ya que no es capaz de complementar plenamente la función C en el mismo. La redundancia funcional parcial es más estable evolutivamente que la redundancia funcional completa, como se ha podido observar para los parálogos *SEP* o *SHP* (Nowak *et al.*, 1997; Wagner, 1999). Es de esperar que la redundancia funcional completa se vaya perdiendo a lo largo del tiempo mientras los genes duplicados llegan a un estado de equilibrio de redundancia parcial (Wagner, 1999; Moore *et al.*, 2005).

Por otro lado, la ausencia de fenotipo en la planta 35S::RNAi-*MtAGb* 1.3, en la que hay un mínimo nivel de expresión de *MtAGb* indica que, siempre y cuando esté presente *MtAGa*, se requiere poca expresión de *MtAGb* (15%) para completar la función C. Finalmente, la presencia de fenotipo alterado en la planta 35S::RNAi-*MtAGb* 5.7, donde ambos genes están disminuidos hasta un 40%, apunta a que también hay un nivel de expresión mínimo de *MtAGa* requerido para completar la función C, siempre y cuando coexista con la expresión mínima necesaria de *MtAGb*. Este nivel de expresión mínimo requerido de *MtAGa* está por encima del 40%.

En *Arabidopsis thaliana*, el papel de AG en la determinación floral se ha asociado con un nivel más alto de actividad AG comparado con el nivel que se requiere para la especificación de la identidad de órganos reproductores florales (Mizukami y Ma, 1995). Se ha propuesto un modelo cuantitativo que sugiere que las diferentes funciones de AG dependen de la cantidad de producto génico requerido. Los fenotipos de diferentes mutantes *ag* han permitido ordenar las funciones, desde el mayor nivel requerido hasta

el menor, de la siguiente manera: determinación > especificación de carpelo > especificación de estambre (Sieburth *et al.*, 1995).

Los fenotipos obtenidos en las plantas VIGS de *Pisum sativum* también concuerdan con estas suposiciones. El fenotipo de las flores pCAPE2-*PsAGa* es ligeramente más fuerte que el fenotipo de las flores pCAPE2-*PsAGb*, indicando que con una disminución similar en los niveles de expresión de ambos genes, es más probable obtener fenotipos de silenciamiento en pCAPE2-*PsAGa*. Esta observación puede relacionarse con el hecho de que se requiere un mayor nivel de expresión mínima de *PsAGa* para completar la función C. También hay que considerar que los niveles génicos mínimos requeridos pueden ser variables entre *Pisum sativum* y *Medicago truncatula*. Así, la ausencia de fenotipos en las flores VIGS de *Medicago truncatula* en las que se intenta silenciar *MtAGa* o *MtAGb* puede deberse no solo a la menor eficiencia del virus en esta planta sino también al hecho de que la disminución de expresión génica no sea suficiente para generar un fenotipo evidente.

#### **4 *MtAGa* Y *MtAGb* SON GENES DUPLICADOS PARCIALMENTE REDUNDANTES QUE SE HAN SUBFUNCIONALIZADO ADQUIRIENDO PAPELES EN DIFERENTES ASPECTOS DE LA FUNCIÓN C**

Una ruta común mediante la cual evolucionan nuevos genes es la duplicación génica seguida de diversificación de función (Force *et al.*, 1999). Se cree que este proceso acelera la velocidad de especiación (Irish, 2003). Un evento de duplicación a partir de un ancestro común produjo los linajes C y D (Kramer *et al.*, 2004); posteriormente, en la base de las eudicotiledóneas superiores tuvo lugar una segunda duplicación, esta vez dentro del linaje C, dando lugar a los linajes *euAG* y *PLE*, que incluyen *AG* y *SHP1/SHP2*, respectivamente (Becker y Theissen, 2003; Irish, 2003; Kramer *et al.*, 2004; Zahn *et al.*, 2006).

El análisis de los homólogos *AGAMOUS* tanto de eudicotiledóneas superiores como de monocotiledóneas indica que estas funciones están ampliamente conservadas, pero que las duplicaciones génicas han introducido variación (Bradley *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1993; Pnueli *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999; Kapoor *et al.*, 2002;

Kyozuka y Shimamoto, 2002). Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana*, *AG* juega un papel crítico en la formación de estambres y carpelos y en la determinación del meristemo floral y los genes *SHP1* y *SHP2* están involucrados en el desarrollo de carpelos y se requieren para la diferenciación de la zona de dehiscencia (Liljegren *et al.*, 2000; Pinyopich *et al.*, 2003). En *Antirrhinum majus*, el ortólogo de *SHP1/SHP2*, *PLE*, es funcionalmente similar a *AG* (Carpenter y Coen, 1990), mientras que el gen del linaje *euAG*, *FAR*, tiene un papel menor en la identidad de órganos y la determinación meristemática, pero juega un papel en el desarrollo tardío de estambres (Davies *et al.*, 1999). La duplicación de genes de clase C seguida de diversificación también se ha descrito, entre otros, en *Zea mays* (Mena *et al.*, 1996), *Cucumis sativus* (Kater *et al.*, 1998), *Petunia hybrida* (Kramer *et al.*, 2004), *Oryza sativa* (Yamaguchi *et al.*, 2006) y *Eschscholzia californica* (Yellina *et al.*, 2010).

En la presente Tesis Doctoral, se ha observado que en la leguminosa *Medicago truncatula* también existe duplicación de los genes de clase C. Se han aislado tres genes MADS-box pertenecientes al linaje C: *MtAGa*, *MtAGb* y *MtSHP*. Los dos primeros son miembros del linaje *euAG* y el último es miembro del linaje *PLE*. La expresión de *MtSHP* se detecta primordialmente en la región interna del carpelo, en óvulos y semillas. Por otro lado, el patrón de expresión de *MtAGa* y *MtAGb* se centra en los órganos reproductores de la flor siendo distinto pero solapante al patrón de expresión de *MtSHP*. Así pues, puede deducirse que tras la duplicación de los genes de clase C en *Medicago truncatula*, ocurrieron cambios en su expresión temporal y espacial, lo que sugiere que han sufrido varios grados de sub- y/o neofuncionalización en sus funciones en la regulación del desarrollo de las estructuras reproductoras. Muchos miembros de los linajes parálogos *euAG* y *PLE* han mantenido secuencias proteicas que pueden proveer la asumida función ancestral, aunque hayan pasado por eventos de sub y/o neofuncionalización mediante cambios en sus patrones de expresión (Pinyopich *et al.*, 2003; Ferrario *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2004; Zahn *et al.*, 2006).

La expresión constitutiva de *MtAGa* y *MtAGb* en *Arabidopsis thaliana* ha mostrado que estos genes son redundantes en cuanto a la función C. Sería interesante comprobar la función de *MtSHP* mediante la misma aproximación, ya que se sabe que la expresión constitutiva de *PsmADS8*, el ortólogo de *MtSHP* en *Pisum sativum*, genera fenotipos similares a los obtenidos con la sobreexpresión de *MtAGa* y *MtAGb* (Navarro, C., Tesis

Doctoral, 2001), sugiriendo que la función C se mantiene en *PsMADS8* y probablemente también en *MtSHP*.

Una tercera duplicación en *Medicago truncatula* dentro del linaje C, sublinaje *euAG*, ha resultado en los genes *MtAGa* y *MtAGb*. Esta duplicación parece ser específica de las especies leguminosas, ya que se presenta también en *Lotus japonicus* (Dong *et al.*, 2005), *Glycine max* (Huang *et al.*, unpublished; Cheung *et al.*, unpublished) y *Pisum sativum* (Navarro, C., Tesis Doctoral, 2001; Berbel *et al.*, unpublished; este trabajo), pero no se ha descrito en otras eudicotiledóneas superiores. A día de hoy, el estudio funcional de estos parálogos del linaje *euAG* solo se ha realizado en el presente trabajo. Los resultados muestran que los genes *MtAGa* y *MtAGb* presentan redundancia funcional parcial en lo que respecta a la función C, aunque se han subfuncionalizado, particionando esta función AG ancestral entre ambos parálogos.

El origen de los parálogos *MtAGa* y *MtAGb* probablemente está asociado con una duplicación del genoma entero de *Medicago truncatula*. En las leguminosas, el momento de los eventos hipotéticos de duplicación permanece en disputa; sin embargo, se ha descrito la posibilidad de un evento antiguo de duplicación del genoma completo seguido por pérdida de genes y reorganización (Cannon *et al.*, 2006), ocurrido hace ~40 millones de años (Lavin *et al.*, 2005), antes de la especiación de las leguminosas. Este evento explicaría la presencia de ortólogos de ambos genes en diferentes especies leguminosas.

La redundancia funcional parcial entre genes duplicados homólogos a AG refleja la actividad conservada derivada de las regiones codificantes (Pinyopich *et al.*, 2003; Zahn *et al.*, 2006). En *Arabidopsis thaliana*, la expresión ectópica de AG, *SHP1* o *SHP2* causa alteraciones similares en el fenotipo floral (Mandel *et al.*, 1992a; Mizukami y Ma, 1992; Liljegren *et al.*, 2000; Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003). La expresión ectópica de *MtAGa* y *MtAGb* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* también causa estos fenotipos, sugiriendo que ambos poseen actividades ancestrales en sus regiones codificantes. En *Medicago truncatula*, la redundancia funcional parcial entre los genes *euAG* ha sido retenida al igual que entre los genes duplicados del clado *AGAMOUS* en otras eudicotiledóneas (Kramer *et al.*, 2004; Scutt *et al.*, 2006). Esta redundancia funcional ocurre inmediatamente tras la duplicación génica y se pierde cuando los genes duplicados llegan a un estado de equilibrio de redundancia parcial (Wagner, 1999). A



pesar de su naturaleza temporal, los genes duplicados funcionalmente redundantes existen en abundancia, ya que la redundancia protege contra las mutaciones deletéreas y contribuye a la robustez genética de un organismo (Krakauer y Nowak, 1999; Wagner, 1999; Gu, 2003; Lü *et al.*, 2007). La redundancia funcional es frecuente en los genes ligados al desarrollo, como *MtAGa* y *MtAGb*, ya que protege contra errores en el desarrollo (Moore *et al.*, 2005).

Sin embargo, los genes duplicados no suelen persistir evolutivamente a menos que se presente sub- o neofuncionalización mediante cambios en la expresión génica y/o secuencia codificante, resultando en divergencia funcional (Force *et al.*, 1999; Nowak *et al.*, 1997; Wagner, 1999). En los genes *euAG* de *Medicago truncatula* las funciones ancestrales del linaje C se han dividido entre los duplicados, causando que se mantengan selectivamente sin neofuncionalización (siguiendo el modelo DDC de Force *et al.*, 1999). *MtAGa* y *MtAGb* se han subfuncionalizado de tal manera que el primero tiene un papel primordial en la determinación del meristemo floral, mientras que el segundo está involucrado en el establecimiento de la identidad de los órganos reproductores. En este caso, la acción combinada de ambas copias génicas es necesaria para completar los requerimientos del locus ancestral. Esta complementación de subfunciones ha determinado que ambas copias se conserven en el genoma.

La diversificación funcional también puede asociarse a las diferencias en la especificidad de las reacciones proteína-proteína. Por ejemplo, *MtAGa* y *MtAGb* podrían estar interactuando específicamente con factores que se expresan preferentemente en los verticilos tres y cuatro. Los candidatos posibles de “partner” proteico podrían ser las proteínas *SEP*-like. En *Arabidopsis thaliana*, las proteínas de clase B y C requieren de las proteínas *SEP*-like para poder funcionar (revisado por Malcomber y Kellog, 2005), y estas proteínas forman complejos proteicos (Pelaz *et al.*, 2000; Honma y Goto, 2001). Según el modelo del cuarteto, los productos de los genes de clase B, C y *SEP* ensamblan complejos cuaternarios que especifican los estambres, mientras que las proteínas de clase C y *SEP* controlan la identidad del carpelo (Theissen y Saedler, 2001; Zahn *et al.*, 2005b; Wang *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que *SEP3* puede mediar la interacción entre *AG* y el dímero de proteínas de clase B *AP3-PI* (Honma y Goto, 2001).

Los patrones de interacción de las proteínas pueden proveer información adicional sobre las diferencias funcionales (Immink *et al.*, 2003). En *Medicago truncatula* la

diversidad de complejos proteicos que pueden formarse se incrementa debido a la existencia de genes duplicados de las clases B y C. Los cambios en la composición de dichos complejos pueden producir un gran número de posibles sitios diana, modificando las interacciones proteína-proteína y aumentando el abanico de posibles funciones para los complejos formados. Identificar los “partners” proteicos de MtAGa y MtAGb podría ayudar a elucidar la naturaleza molecular de la subfuncionalización de estos genes en *Medicago truncatula*.

En general, la diversificación funcional de los genes MADS-box ha contribuido enormemente a la regulación genética precisa y compleja del desarrollo floral, además de dirigir la diversidad floral (Theissen *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2004; Irish y Litt, 2005). Parece ser que la base de las eudicotiledóneas superiores fue un periodo crítico en la evolución de las angiospermas, con muchos cambios significativos tanto en la morfología floral (Endress, 1990; Kramer *et al.*, 2004), como en los linajes génicos que controlan la identidad de los órganos florales, entre ellos, la duplicación en los linajes AG, AP3 y AP1 (Litt e Irish, 2003; Kramer *et al.*, 2005). En *Medicago truncatula* se ha observado duplicación en los linajes A, B y C. Es probable que los diferentes papeles de estos genes en el desarrollo de los órganos florales y en la determinación meristemática contribuyan a la trayectoria evolutiva única de las leguminosas y a la formación de órganos florales característicos.

Parece ser que los factores moleculares que controlan el desarrollo de órganos florales están bastante conservados entre *Medicago truncatula*, *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana*. Es bien sabido que los genes implicados en el modelo ABC establecen dominios de expresión específicos para el diseño floral. Sin embargo, el diseño floral de las leguminosas probablemente no solo responde a este modelo, sino que además puede estar regido por varios procesos como: la alteración de las funciones de los genes clave, la duplicación génica, la pérdida o ganancia de dominios proteicos funcionales y los cambios en los patrones de expresión (Dong *et al.*, 2005; este trabajo). Así pues, aunque se espera que el modelo ABC sea válido (al menos parcialmente) en las leguminosas, es necesario caracterizar los diferentes ortólogos de genes ABC para comprender cómo el modelo puede explicar el diseño floral particular de estas plantas.

---

## CONCLUSIONES

---



De los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes **conclusiones:**

**PRIMERA:** Se han aislado y caracterizado once miembros de la familia génica MADS-box de *Medicago truncatula*. Según la homología de secuencia y los patrones de expresión, seis de ellos podrían estar involucrados en funciones ABC(DE): *MtTM6* y *MtNMH7* como genes de clase B, ortólogos de *AP3/DEF*; *MtAGa*, *MtAGb* y *MtSHP* como genes de clase C, ortólogos de *AG/PLE* (los dos primeros) y de *SHP* (el último); y *MtSEP* como gen de clase E, ortólogo de *SEP1/2*. *MtSOC1a* y *MtSOC1b*, posibles ortólogos de *SOC1*, participarían en la integración de señales de las vías que controlan el tiempo de floración. *MtSOC1-like*, según sugiere su patrón de expresión, podría ser funcionalmente redundante con *MtSOC1a* y *MtSOC1b*, aunque no se puede descartar que ejerza alguna función adicional en la determinación de la identidad de los órganos florales. *MtAGL6* y *MtAGL6-like* presentan homología con genes poco caracterizados en otras especies. Su patrón de expresión es compatible con un papel en la identidad del meristemo floral y el desarrollo de órganos florales. Además, se ha visto que *MtAGL6-like* forma parte de una rama filogenética separada en la cual sólo se agrupa con genes de leguminosas.

**SEGUNDA:** Varios de los genes aislados (*MtSEP*, *MtAGL6-like*, *MtSOC1a*, *MtSOC1b* y *MtSOC1-like*) se expresan en tejidos vegetativos además de hacerlo en flores, así que puede que tengan un rango de funciones más amplio que la regulación de los eventos del desarrollo floral.

**TERCERA:** Varios genes pertenecientes a la familia MADS-box presentes como copia única en *Arabidopsis thaliana* se encuentran duplicados en *Medicago truncatula* y viceversa, siendo el historial de duplicaciones de *Medicago truncatula* similar al observado en otras leguminosas.

**CUARTA:** Se han aislado y caracterizado dos nuevos genes MADS-box de *Medicago truncatula*, *MtAGa* y *MtAGb*, que presentan similitud de secuencia con genes de función C del linaje *euAGAMOUS*. Su patrón de expresión en flores de *Medicago truncatula* de fenotipo silvestre, así como los estudios funcionales llevados a cabo mediante técnicas

de RNA interferente, VIGS y mutagénesis inducida por *Tnt1* en *Medicago truncatula* y expresión génica constitutiva en *Arabidopsis thaliana*, demuestran que ambos genes son componentes de la función C en *Medicago truncatula*.

**QUINTA:** *MtAGb* se encuentra como dos especies de mRNA (*MtAGbS* y *MtAGbL*), que son consecuencia del *splicing* alternativo del RNA. El análisis funcional ha mostrado que únicamente *MtAGbL* es funcional como gen de clase C. Por el momento se desconoce el posible significado funcional de este evento de *splicing*.

**SEXTA:** Los experimentos de pérdida y ganancia de función de *MtAGa* y *MtAGb* indican que estos genes parálogos tienen un alto grado de redundancia en lo que respecta a la función C, aunque se han subfuncionalizado, dividiendo esta función de tal manera que *MtAGa* tiene un papel prioritario en la determinación del meristemo floral, mientras que *MtAGb* juega un papel clave en la especificación de la identidad de los órganos reproductores florales.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

---





- Albert, V.A., Gustafsson, M.H.G. y Di Laurenzio, L.** (1998). Ontogenetic systematics, molecular developmental genetics, and the angiosperm petal. En: *Molecular Systematics of Plants*, II. Soltis, D., Soltis, P. y Doyle, J.J., eds. (New York: Chapman and Hall). 349-374.
- Alvarez-Buylla, E.R., Garcia-Ponce, B. y Garay-Arroyo, A.** (2006). Unique and redundant functional domains of *APETALA1* and *CAULIFLOWER*, two recently duplicated *Arabidopsis thaliana* floral MADS-box genes. *J Exp Bot.* **57**, 3099-3107.
- Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Ribas de Pouplana, L., Martínez-Castilla, L. y Yanofsky, M.F.** (2000a). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 5328-5333.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F. y Yanofsky, M.F.** (2000b). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* **24**, 457-466.
- Amasino, R.** (2004). Vernalization, competence and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell.* **16**, 2553-2559.
- Ampomah-Dwamena, C., Morris, B.A., Sutherland, P., Veit, B. y Yao, J.** (2002). Down-regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversión. *Plant Physiol.* **130**, 605-617.
- Andersen, J.W., Story, L., Sieling, B., Chen, W.J., Petro, M.S. y Story, J.** (1984). Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr.* **40**, 1146-1155.
- Angenent, G.C. y Colombo, L.** (1996). Molecular control of ovule development. *Trends Plant Sci.* **1**, 228-232.
- Angenent, G.C., Franken, J., Busscher, M., Colombo, L. y van Tunen, A.J.** (1993). Petal and stamen formation in petunia is regulated by the homeotic gene *fbp1*. *Plant J.* **4**, 101-112.
- Angenent, G.C., Franken, J., Busscher, M., Van Dijken, A., VanWent, J.L., Dons, H.J.M. y Van Tunen, A.J.** (1995). A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell.* **7**, 1569-1582.
- Aoki, S., Uehara, K., Imafuku, M., Hasebe, M. e Ito, M.J.** (2004). Phylogeny and divergence of basal angiosperms inferred from *APETALA3*- and *PISTILLATA*-like MADS-box genes. *Plant Res.* **117**, 229-244.
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A.K., Singh, V.P., Tyagi, A.K. y Kapoor, S.** (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics.* **8**, 242.

**Aubert, G., Morin, J., Jacquin, F., Loridon, K., Quillet, M.C., Petit, A., Rameau, C., Lejeune-Hénaut, I., Huguet, T. y Burstin, J.** (2006). Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene approach and for investigating the synteny with the model species *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet.* **112**, 1024-1041.

**Bechtold, N., Ellis, J., y Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants.* *Comp. Rend. L'Acad. des Sci. Serie III.* **316**, 1194-1199.

**Becker, A. y Theissen, G.** (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol.* **29**, 464-489.

**Beltrán, J.P., Roque, E., Medina, M., Madueño, F., Gómez, M.D. y Cañas, L.** (2007). Androsterilidad inducida mediante ingeniería genética en plantas: fundamentos y aplicaciones biotecnológicas. *An R Acad Nac Farm.* **73**, 1237-1264.

**Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P., Tang, Y y Udvardi, M.** (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **55**, 504-513.

**Benlloch, R.** (2005). *Medicago truncatula* (Gaernt.) como especie modelo para el análisis genético molecular del desarrollo floral en leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

**Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A. y Madueño, F.** (2007). Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Ann Bot.* **100**, 659-676.

**Benlloch, R., Navarro, C., Beltrán, J.P. y Cañas, L.A.** (2003). Floral development of the model legume *Medicago truncatula*: ontogeny studies as a tool to better characterize homeotic mutations. *Sex Plant Reprod.* **15**, 231-241.

**Benlloch, R., Roque, E., Ferrándiz, C., Cosson, V., Caballero, T., Penmetsa, R.V., Beltrán, J.P., Cañas, L.A., Ratet, P. y Madueño, F.** (2009). Analysis of B function in legumes: PISTILLATA proteins do not require the PI motif for floral organ development in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **60**, 102-111.

**Berbel, A.** (2002). Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo floral de guisante (*Pisum sativum* L.) en sistemas heterólogos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

**Berbel, A., Navarro, C., Ferrándiz, C., Cañas, L.A., Beltrán, J.P. y Madueño, F.** (2005). Functional conservation of PISTILLATA activity in a pea homolog lacking the PI motif. *Plant Physiol.* **139**, 174-185.

**Berbel, A., Navarro, C., Ferrándiz, C., Cañas, L.A., Madueño, F. y Beltrán J.P.** (2001). Analysis of PEAM4, the pea AP1 functional homologue, supports a model for AP1-like

genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species. *Plant J.* **25**, 441-451.

**Bomblies, K., Dagenais, N. y Weigel, D.** (1999). Redundant enhancers mediate transcriptional repression of *AGAMOUS* by *APETALA2*. *Dev Biol.* **216**, 260-264.

**Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K. y Melzer, S.** (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 591-599.

**Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. y Dean, C.** (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell.* **16**, S18-S31.

**Boss, P.K., Sensi, E., Hua, C., Davies, C. y Thomas, M.R.** (2002). Cloning and characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Sci.* **162**, 887-895.

**Boss, P.K., Vivier, M., Matsumoto, S., Dry, I.B. y Thomas, M.R.** (2001). A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to *AGAMOUS* and *SHATTERPROOF*, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Mol Biol.* **45**, 541-553.

**Bowman, J.L.** (1997). Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. *Journal of Bioscience.* **22**, 515-527.

**Bowman, J.L., Drews, G.N. y Meyerowitz, E.M.** (1991a). Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell.* **3**, 749-758.

**Bowman, J.L., Smyth, D.R. y Meyerowitz, E.M.** (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **1**, 37-52.

**Bowman, J.L., Smyth, D.R. y Meyerowitz, E.M.** (1991b). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development.* **112**, 1-20.

**Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N. y Coen, E.** (1993). Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell.* **72**, 85-95.

**Broholm, S.K., Pöllänen, E., Ruokolainen, S., Tähtiharju, S., Kotilainen, M., Albert, V.A., Elomaa, P. y Teeri, T.H.** (2010). Functional characterization of B class MADS-box transcription factors in *Gerbera hybrida*. *J Exp Bot.* **61**, 75-85.

**Brunner, A.M., Rottmann, W.H., Sheppard, L.A., Krutovskii, K., DiFazio, S.P., Leonardi, S. y Strauss, S.H.** (2000). Structure and expression of duplicate *AGAMOUS* orthologues in poplar. *Plant Mol Biol.* **44**, 619-634.

- Buchner, P. y Boutin, J.P.** (1998). A MADS box transcription factor of the *AP1/AGL9* subfamily is also expressed in the seed coat of pea (*Pisum sativum*) during development. *Plant Mol Biol.* **38**, 1253-1255.
- Burgeff, C., Liljegren, S.J., Tapia-Lopez, R., Yanofsky, M.F. y Alvarez-Buylla, E.R.** (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta.* **214**, 365-372.
- Busch, M.A., Bomblies, K. y Weigel, D.** (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science.* **285**, 585-587.
- Busi, M.V., Bustamante, C., D'Angelo, C., Hidalgo-Cuevas, M., Boggio, S., Valle, E. y Zabaleta, E.** (2003). MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Mol Biol* **52**, 801-815.
- Cannon, S.B., Sterck, L., Rombauts, S., Sato, S., Cheung, F., Gouzy, J., Wang, X., Mudge, J., Vasdewani, J., Schiex, T., Spannagl, M., Monaghan, E., Nicholson, C., Humphray, S.J., Schoof, H., Mayer, K.F., Rogers, J., Quétier, F., Oldroyd, G.E., Debelle, F., Cook, D.R., Retzel, E.F., Roe, B.A., Town, C.D., Tabata, S., Van de Peer, Y. y Young, N.D.** (2006). Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**, 14959-14964.
- Carlsbecker, A., Tandre, K., Johanson, U., Englund, M. y Engström, P.** (2004). The MADS-box gene *DAL1* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant J.* **40**, 546-557.
- Carmel-Goren, L., Liu, Y.S., Lifschitz, E. y Zamir, D.** (2003). The *SELF-PRUNING* gene family in tomato. *Plant Mol Biol.* **52**, 1215-1222.
- Carpenter, R. y Coen, E.S.** (1990). Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev.* **4**, 1483-1493.
- Causier, B., Castillo, R., Zhou, J., Ingram, R., Xue, Y., Schwarz-Sommer, Z. y Davies, B.** (2005). Evolution in action: following function in duplicated floral homeotic genes. *Curr Biol.* **15**, 1508-1512.
- Causier, B., Schwarz-Sommer, Z. y Davies, B.** (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol.* **21**, 73-79.
- Chanderbali, A.S., Kim, S., Buzgo, M., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Soltis, D.E. y Soltis, P.S.** (2006). Genetic footprints of stamen ancestors guide perianth evolution in *Persea* (Lauraceae). *Int J Plant Sci.* **167**, 1075-1089.
- Cheng, X., Wen, J., Tadege, M., Ratet, P. y Mysore, K.S.** (2011). Reverse genetics in *Medicago truncatula* using *Tnt1* insertion mutants. *Methods Mol Biol.* **678**, 179-190.

- Cheng, Y., Kato, N., Wang, W., Li, J. y Chen, X.** (2003). Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of *AGAMOUS* pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*. **4**, 53-66.
- Cho, S., Jang, S., Chae, S., Chung, K.M., Moon, Y., An, G. y Jang, S.K.** (1999). Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* *APETALA1* as a transcription activation domain. *Plant Mol Biol*. **40**, 419-429.
- Choi, H.K., Mun, J.H., Kim, D.J., Zhu, H., Baek, J.M., Mudge, J., Roe, B., Ellis, N., Doyle, J., Kiss, G.B., Young, N.D. y Cook, D.R.** (2004). Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**, 15289-15294.
- Clough, S.J. y Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **16**, 735-743.
- Coen, E.S. y Meyerowitz, E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. **353**, 31-37.
- Colombo, L., Franken, J., Koetje, E., Van Went, J., Dons, H.J.M., Angenent, G., y Van Tunen, A.J.** (1995). The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell*. **7**, 1859-1868.
- Colombo, M., Brambilla, V., Marcheselli, R., Caporali, E., Kater, M.M. y Colombo, L.** (2010). A new role for the *SHATTERPROOF* genes during *Arabidopsis* gynoecium development. *Dev Biol*. **337**, 294-302.
- Conant, G.C. y Wolfe, K.H.** (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet*. **9**, 938-950.
- Constantin, G.D., Grønlund, M., Johansen, I.E., Stougaard, J. y Lund, O.S.** (2008). Virus-induced gene silencing (VIGS) as a reverse genetic tool to study development of symbiotic root nodules. *Mol Plant Microbe Interact*. **21**, 720-727.
- Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E. y Lund, O.S.** (2004). Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant Journal*. **40**, 622-631.
- Cook, D.R.** (1999). *Medicago truncatula*—a model in the making!. *Curr Opin Plant Biol*. **2**, 301-304.
- Cooper, B., Clarke, J.D., Budworth, P., Kreps, J., Hutchison, D., Park, S., Guimil, S., Dunn, M., Luginbuhl, P., Ellero, C., Goff, S.A. y Glazebrook, J.** (2003). A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**, 4945-4950.
- Crawford, E.J., Lake, A.W.H. y Boyce K.G.** (1989). Breeding Annual *Medicago* Species for Semiarid Conditions in Southern Australia. *Advances in Agronomy*. **42**, 399-437.

**Cseke, L.J., Zheng, J. y Podila, G.K.** (2003). Characterization of *PTM5* in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene*. **318**, 55-67.

**Cui, L., Wall, P.K., Leebens-Mack, J.H., Lindsay, B.G., Soltis, D.E., Doyle, J.J., Soltis, P.S., Carlson, J.E., Arumuganathan, K., Barakat, A., Albert, V.A., Ma, H. y dePamphilis, C.W.** (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* **16**, 738-749.

**Davies, B., Di Rosa, A., Eneva, T., Saedler, H. y Sommer, H.** (1996). Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of *Antirrhinum* MADS-box genes. *Plant J.* **10**, 663-677.

**Davies, B., Motte, P., Keck, E., Saedler, H., Sommer, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1999). *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* **18**, 4023-4034.

**Dayhoff, M.O.** (1979). En: Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol 5, Supplement 3. (Washington, DC, USA: Nat. Biomed. Res. Found.). 345-352.

**De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y. y Theissen G.** (2003). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends Plant Sci.* **8**, 475-483.

**de Folter, S., Immink, R.G., Kieffer, M., Pařenicová, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M., Davies, B. y Angenent, G.C.** (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS box transcription factors. *Plant Cell.* **17**, 1424-1433.

**de Martino, G., Pan, I., Emmanuel, E., Levy, A. y Irish, V.F.** (2006). Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell.* **18**, 1833-1845.

**Decroocq, V., Zhu, X., Kauffman, M., Kyozyuka, J., Peacock, W.J., Dennis, E.S. y Llewellyn, D.J.** (1999). A *TM3*-like MADS-box gene from *Eucalyptus* expressed in both vegetative and reproductive tissues. *Gene*. **228**, 155-160.

**Delaet, J., Clinkemillie, D., Jansen, S. y Smets, E.** (1995). Floral ontogeny in the *Plumbaginaceae*. *J Plant Res.* **108**, 289-304.

**Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep.* **1**, 19-21.

**Deyholos, M.K. y Sieburth, L.E.** (2000). Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. *Plant Cell.* **12**, 1799-1810.

- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. y Yanofsky, M.F.** (2004). The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol.* **14**, 1935-1940.
- Dolan, J.W. y Fields, S.** (1991). Cell-type-specific transcription in yeast. *Biochim Biophys. Acta.* **1088**, 155-169.
- Dong, Z.C., Zhao, Z., Liu, C.W., Luo, J.H., Yang, J., Huang, W.H., Hu, X.H., Wang, T.L. y Luo, D.** (2005). Floral patterning in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **137**, 1272-1282.
- Doyle, J.J.** (1994). Evolution of a plant homeotic multigene family: Toward connecting molecular systematics and molecular developmental genetics. *Systematic Biology.* **43**, 307-328.
- Doyle, J.J.** (2001). Leguminosae. En: Encyclopedia of Genetics. Brenner, S., Miller, J.H., eds. (San Diego: Academic Press). 1081-1085.
- Doyle, J.J. y Luckow, M.A.** (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* **131**, 900-910.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., Ballenger, J.A. y Palmer, J.D.** (1996). The distribution and phylogenetic significance of a 50 kb chloroplast DNA inversión in the flowering plant family Leguminosae. *Mol Phylogenet Evol.* **5**, 429-438.
- Drea, S.C., Lao, N.T., Wolfe, K.H. y Kavanagh, T.A.** (2006). Gene duplication, exon gain and neofunctionalization of *OEP16*-related genes in land plants. *Plant J.* **46**, 723-735.
- Drews, G.N., Bowman, J.L. y Meyerowitz, E.M.** (1991). Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell.* **65**, 991-1002.
- Duarte, J.M., Cui, L., Wall, P.K., Zhang, Q., Zhang, X., Leebens-Mack, J., Ma, H., Altman, N. y dePamphilis, C.W.** (2006). Expression pattern shifts following duplication indicative of subfunctionalization and neofunctionalization in regulatory genes of *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol.* **23**, 469-478.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H. y Sommer, H.** (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins *SQUAMOSA*, *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* **18**, 5370-5379.
- Endress, P.K.** (1990). Patterns of floral construction in ontogeny and phylogeny. *Biol J Linn Soc.* **39**, 153-175.
- Evans, R.C. y Dickinson, T.A.** (1996). North-American black fruited hawthorns. II. Floral development of 10-stamen and 20-stamen morphotypes in *Crataegus* section *Douglasii* (*Rosaceae, maloideae*). *Amer J Bot.* **83**, 961-978.

**Fan, H.Y., Hu, Y., Tudor, M. y Ma, H.** (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J.* **12**, 999-1010.

**Fan, J., Li, W., Dong, X., Guo, W. y Shu, H.** (2007). Ectopic expression of a hyacinth *AGL6* homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in *Arabidopsis*. *Sci China C Life Sci.* **50**, 676-689.

**Farag, M.A., Huhman, D.V., Dixon, R.A. y Sumner, L.W.** (2008). Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* **146**, 387-402.

**Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M., Kater, M. y Colombo, L.** (2003). MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **15**, 2603-2611.

**Feinberg, A.P. y Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132**, 6-13.

**Ferrándiz, C.** (1996). Morfogénesis floral de mutantes homéoticos de *Pisum sativum* L. Aislamiento y caracterización molecular de genes de la familia MADS. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

**Ferrándiz, C., Liljegren, S.J., y Yanofsky, M.F.** (2000). Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science.* **289**, 436-438.

**Ferrandiz, C., Navarro, C., Gomez, M.D., Canas, L.A. y Beltran, J.P.** (1999). Flower development in *Pisum sativum*: from the war of the whorls to the battle of the common primordia. *Dev Genet.* **25**, 280-290.

**Ferrario, S., Immink, R.G. y Angenent, G.C.** (2004). Conservation and diversity in flower land. *Curr Opin Plant Biol.* **7**, 84-91.

**Flanagan, C.A. y Ma, H.** (1994). Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene *AGL2* in wild-type and mutant *Arabidopsis* flowers. *Plant Mol Biol.* **26**, 581-595.

**Flanagan, C.A., Hu, Y. y Ma, H.** (1996). Specific expression of the *AGL1* MADS-box gene suggests regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development. *Plant J.* **10**, 343-353.

**Foo, E., Bullier, E., Goussot, M., Foucher, F., Rameau, C. y Beveridge, C.A.** (2005). The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell.* **17**, 464-474.



- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L. y Postlethwait, J.** (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*. **151**, 1531-1545.
- Fukui, M., Futamura, N., Mukai, Y., Wang, Y., Nagao, A. y Shinohara, K.** (2001). Ancestral MADS box genes in Sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don (Taxodiaceae), homologous to the B function genes in angiosperms. *Plant Cell Physiol.* **42**, 566-575.
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F. y Young, N.D.** (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol.* **137**, 1228-1235.
- Goto, K. y Meyerowitz, E.M.** (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* **8**, 1548-1560.
- Graham, P.H y Vance, C.P.** (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* **131**, 872-877.
- Gregis, V., Sessa, A., Colombo, L. y Kater, M.M.** (2006). *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18**, 1373-1382.
- Griffiths, S., Dunford, R.P., Coupland, G. y Laurie, D.A.** (2003). The evolution of *CONSTANS*-like gene families in barley, rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **131**, 1-13.
- Grønlund, M., Constantin, G., Piednoir, E., Kovacev, J., Johansen, I.E. y Lund, O.S.** (2008). Virus-induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. *Virus Research.* **135**, 345-349.
- Grusak, M.A.** (2002). Phytochemicals in plants: genomics-assisted plant improvement for nutritional and health benefits. *Curr Opin Biotechnol.* **13**, 508-511.
- Gu, X.** (2003). Evolution of duplicate genes versus genetic robustness against null mutations. *Trends Genet.* **19**, 354-356.
- Guerineau, F. y Mullineaux, P.** (1993). Plant Transformation and expression vectors. En: Plant Molecular Biology LABFAX. Croy, R.R.D., ed., (Oxford, UK: βios Scientific and Blackwell Scientific). 121-147.
- Hands, P., Vosnakis, N., Betts, D., Irish, V.F. y Drea, S.** (2011). Alternate transcripts of a floral developmental regulator have both distinct and redundant functions in opium poppy. *Ann Bot.* **107**, 1557-1566.
- Hartmann, U., Hoehmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H. y Huijser, P.** (2000). Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **21**, 351-360.

**Hartweck, L.M., Scott, C.L. y Olszewski, N.E.** (2002). Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics*. **161**, 1279-1291.

**Hasebe, M. y Banks, J.A.** (1997). Evolution of MADS gene family in plants. En: Evolution and Diversification of Land Plants. Iwatsuki, K. y Raven, R.H., eds. (Tokyo, Japan: Springer-Verlag). 179-197.

**Haghn, G.W. y Somerville, C.R.** (1988). Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Dev Genet*. **9**, 73-89.

**Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M. y Shimamoto, K.** (2003). Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*. **422**, 719-722.

**He, C. y Saedler, H.** (2005). Heterotopic expression of *MPF2* is the key to the evolution of the Chinese lantern of *Physalis*, a morphological novelty in Solanaceae. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**, 5779-5784.

**He, X.L. y Zhang, J.Z.** (2005). Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics*. **169**, 1157-1164.

**Heard, J. y Dunn, K.** (1995). Symbiotic induction of a MADS-box gene during development of alfalfa root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**, 5273-5277.

**Hecht, V., Foucher, F., Ferrándiz, C., Macknight, R., Navarro, C., Morin, J., Vardy, M.E., Ellis, N., Beltrán, J.P., Rameau, C. y Weller, J.L.** (2005). Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes. *Plant Physiol*. **137**, 1420-1434. Erratum in: *Plant Physiol* **138**, 2417.

**Hellens, R.P., Edwards, A., Leyland, N.R., Bean, S. y Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Plant Mol Biol*. **42**, 819-832.

**Hensel, L.L., Nelson, M., Richmond, T. y Bleecker, A.B.** (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **106**, 863-876.

**Hewitt, E.J.** (1966). En: Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. 2nd Ed. (Farnham Royal, England: Commonw. Agr. Bur. Tech. Commun.).

**Hirsch, A.M.** (2004). Plant-microbe symbioses: a continuum from commensalism to parasitism. *Symbiosis*. **37**, 345-363.

**Hirsch, A.M., Krupp, R.S.N., Lin, Y., Wang, S.W., Yang, W. y Tucker, S.C.** (2002). Inflorescence and flower development in wild-type and *sid* mutant in *Melilotus alba*. *Can J Bot*. **80**, 732-740.

- Hong, R.L., Hamaguchi, L., Busch, M.A. y Weigel, D.** (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell*. **15**, 1296-1309.
- Honma, T. y Goto, K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*. **409**: 525-529.
- Hsu, H.F., Hsieh, W.P., Chen, M.K., Chang, Y.Y. y Yang, C.H.** (2010). C/D class MADS box genes from two monocots, orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) and lily (*Lilium longiflorum*), exhibit different effects on floral transition and formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. **51**, 1029-1045.
- Hsu, H.F., Huang, C.H., Chou, L.T. y Yang, C.H.** (2003). Ectopic expression of an orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. **44**, 783-794.
- Huang, F., Chi, Y., Gai, J. y Yu, D.** (2009). Identification of transcription factors predominantly expressed in soybean flowers and characterization of *GmSEP1* encoding a SEPALLATA1-like protein. *Gene*. **438**, 40-48.
- Huang, H., Tudor, M., Weiss, C.A., Hu, Y. y Ma, H.** (1995). The *Arabidopsis* MADS-box gene *AGL3* is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol Biol*. **28**, 549-567.
- Immink, R.G., Ferrario, S., Busscher-Lange, J., Kooiker, M., Busscher, M., and y Angenent, G.C.** (2003). Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family. *Mol Gen Genom*. **268**, 598-606.
- Immink, R.G., Gadella, T.W.Jr., Ferrario, S., Busscher, M. y Angenent, G.C.** (2002). Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. **99**, 2416-2421.
- Immink R.G., Tonaco I.A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A.D., Busscher-Lange, J, Borst, J.W. y Angenent, G.C.** (2009). *SEPALLATA3*: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol*. **10**, R24.
- Irish, V.F.** (2003). The evolution of floral homeotic gene function. *Bioessays*. **25**, 637-646.
- Irish, V.F. y Litt, A.** (2005). Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployment. *Curr Opin Genet Dev*. **15**, 454-460.
- Jack, T.** (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*. **16**, S1-S17.
- Jack, T., Fox, G.L. y Meyerowitz, E.M.** (1994). *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: transcriptional and post transcriptional regulation determine floral organ identity. *Cell*. **76**, 703-716.

**Jager, M., Hassanin, A., Manuel, M., Le Guyader, H. y Deutsch, J.** (2003). MADS-box genes in *Ginkgo biloba* and the evolution of the *AGAMOUS* family. *Mol Biol Evol.* **20**, 842-854.

**Jensen, E.S. y Hauggaard-Nielsen, H.** (2003). How can increased use of biological N<sub>2</sub> fixation in agriculture benefit the environment?. *Plant and Soil.* **252**, 177-186.

**Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Montagu, M.V. y Okamoto, J.K.** (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell.* **6**, 1211-1225.

**Kalo, P., Seres, A., Taylor, S.A., Jakab, J., Kevei, Z., Kereszt, A., Endre, G., Ellis, T. H.N. y Kiss, G.B.** (2004). Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol Genet Genomics*, **272**, 235-246.

**Kamenetsky, R. y Akhmetova, M.** (1994). Floral development of *Eremurus-Alticus* (*Liliaceae*). *Israel J Plant Sci.* **290**, 344-347.

**Kang, H.G., Jeon, J.S., Lee, S. y An, G.** (1998). Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice plants. *Plant Mol Biol.* **38**, 1021-1029.

**Kapoor, M., Tsuda, S., Tanaka, Y., Mayama, T., Okuyama, Y., Tsuchimoto, S. y Takatsuji, H.** (2002). Role of petunia *pMADS3* in determination of floral organ and meristem identity, as revealed by its loss of function. *Plant J.* **32**, 115-127.

**Kater, M.M., Colombo, L., Franken, J., Busscher, M., Masiero, S., Van Lookeren Campagne, M.M. y Angenent, G.C.** (1998). Multiple *AGAMOUS* homologs from cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. *Plant Cell.* **10**, 171-182.

**Kempin, S.A., Mandel, M.A. y Yanofsky, M.F.** (1993). Conversion of perianth into reproductive organs by ectopic expression of the tobacco floral homeotic gene *NAG1*. *Plant Physiol.* **103**, 1041-1046.

**Kim, S., Koh J., Ma, H., Hu, Y., Endress P.K., Hauser B.A., Buzgo M., Soltis P.S. y Soltis D.E.** (2005). Sequence and expression Studies of A-, B-, and E-Class MADS-Box homologues in *Eupomatia* (*Eupomatiaceae*): Support for the bracteate origin of the calyptra. *Int J Plant Sci.* **166**, 185-198.

**Kirchoff, B.K.** (1997). Inflorescence and flower development in the *Hedychae* (*Zingiberaceae*)-*Hedychium*. *Can J Bot.* **75**, 581-594.

**Kitahara, K. y Matsumoto, S.** (2000). Rose MADS-box genes '*MASAKO C1* and *D1*' homologous to class C floral identity genes. *Plant Sci.* **151**, 121-134.

- Kitamura-Abe, S., Itoh, H., Washio, T., Tsutsumi, A. y Tomita, M.J.** (2004). Characterization of the splice sites in GT-AG and GC-AG introns in higher eukaryotes using full-length cDNAs. *Bioinform Comput Biol.* **2**, 309-331.
- Komeda, Y.** (2004). Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol.* **55**, 521-535.
- Koncz, C., y Schell, J.** (1986). The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet.* **204**, 383-396.
- Kondrashov, F.A., Rogozin, I.B., Wolf, Y.I. y Koonin, E.V.** (2002). Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biol.* **3**, research0008.1-research0008.9.
- Koo, S.C., Bracko, O., Park, M.S., Schwab, R., Chun, H.J., Park, K.M., Seo, J.S., Grbic, V., Balasubramanian, S., Schmid, M., Godard, F., Yun, D.J., Lee, S.Y., Cho, M.J., Weigel, D. y Kim, M.C.** (2010). Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box gene *AGAMOUS-LIKE6*. *Plant J.* **62**, 807-816.
- Kosterin, O.E.** (1999). A floral homeotic mutation affecting B function of florigenesis control in the pea. *Pisum Genetics.* **31**, 9-10.
- Kotoda, N., Hayashi, H., Suzuki, M., Igarashi, M., Hatsuyama, Y., Kidou, S., Igasaki, T., Nishiguchi, M., Yano, K., Shimizu, T., Takahashi, S., Iwanami, H., Moriya, S. y Abe, K.** (2010). Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of Apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Cell Physiol.* **51**, 561-575.
- Krakauer, D.C. y Nowak, M.A.** (1999). Evolutionary preservation of redundant duplicated genes. *Semin Cell Dev Biol.* **10**, 555-559.
- Kramer, E.M.** (2007). Understanding the genetic basis of floral diversity. *Bioscience.* **57**, 479-487.
- Kramer, E.M. y Hall, J.C.** (2005). Evolutionary dynamics of genes controlling floral development. *Curr Opin Plant Biol.* **8**, 13-18.
- Kramer, E.M. e Irish, V.F.** (1999). Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature.* **399**, 144-148.
- Kramer, E.M. e Irish, V.** (2000). Evolution of the petal and stamen developmental programs: evidence from comparative studies of the lower eudicots and basal angiosperms. *Int J Plant Sci.* **161**, S29-S40.
- Kramer E.M. y Zimmer, E.A.** (2006). Gene duplication and floral developmental genetics of basal eudicots. En: *Advances in Botanical Research: Developmental Genetics of the Flower*. Soltis, D.E., Soltis, P.S. y Leebens-Mack, J., eds. (London: Academic Press). 354-385.

**Kramer, E.M., Di Stilio, V.S. y Schlüter P.M.** (2003). Complex patterns of gene duplication in the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages of the Ranunculaceae. *Int J Plant Sci.* **164**, 1-11.

**Kramer, E.M., Dorit, R.L. y Irish, V.F.** (1998). Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics.* **149**, 765-783.

**Kramer, E.M., Jaramillo, M.A. y Di Stilio, V.S.** (2004). Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the *AGAMOUS* subfamily of MADS box genes in angiosperms. *Genetics.* **166**, 1011-1023.

**Kramer, E.M., Su, H.J., Wu, C.C. y Hu, J.M.** (2006). A simplified explanation for the frameshift mutation that created a novel C-terminal motif in the *APETALA3* gene lineage. *BMC Evol Biol.* **6**, 30.

**Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. y Grill, L.K.** (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 1679-1683.

**Kyojuka, J. y Shimamoto, K.** (2002). Ectopic expression of *OsMADS3*, a rice ortholog of *AGAMOUS*, caused a homeotic transformation of lodicules to stamens in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol.* **43**, 130-135.

**Kyojuka, J., Harcourt, R., Peacock, W.J. y Dennis, E.S.** (1997). *Eucalyptus* has functional equivalents of the *Arabidopsis AP1* gene. *Plant Mol Biol.* **35**, 573-584.

**Lamb, R.S. e Irish, V.F.** (2003). Functional divergence within the *APETALA3/PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**, 6558-6563.

**Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J. y Jürgens, G.** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development.* **122**, 87-96.

**Lavin, M., Herendeen, P.S. y Wojciechowski, M.F.** (2005). Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst Biol.* **54**, 575-594.

**Lawton-Rauh, A.L., Buckler, E.S. y Purugganan, M.D.** (1999). Patterns of molecular evolution among paralogous floral homeotic genes. *Mol Biol Evol.* **16**, 1037-1045.

**Lee, H., Suh, S.S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.H., Kim, S.G., Lee, J.S., Kwon, Y.M. y Lee, I.** (2000). The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **14**, 2366-2376.

**Lee, J. y Lee, I.** (2010). Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *J Exp Bot.* **61**, 2247-2254.

- Lee, J.H., Cho, Y.S., Yoon, H.S., Suh, M.C., Moon, J., Lee, I., Weigel, D., Yun, C.H. y Kim, J.K. (2005). Conservation and divergence of *FCA* function between *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol.* **58**, 823-838.
- Lee, J.M., Grant, D., Vallejos, C.E. y Shoemaker, R.C. (2001). Genome organization in dicots. II. *Arabidopsis* as a “bridging species” to resolve genome evolution events among legumes. *Theor Appl Genet.* **103**, 765-773.
- Lee, S., Kim, J., Son, J.S., Nam, J., Jeong, D.H., Lee, K., Jang, S., Yoo, J., Lee, J., Lee, D.Y., Kang, H.G. y An, G. (2003). Systematic reverse genetic screening of T-DNA tagged genes in rice for functional genomic analyses: MADS-box genes as a test case. *Plant Cell Physiol.* **44**, 1403-1411.
- Leebens-Mack, J., Soltis, D.E. y Soltis, P.S. (2005). Plant reproductive genomics at the Plant and Animal Genome Conference. *Comp Funct Genomics.* **6**, 159-169.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G. y Laux T. (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell.* **105**, 805-814.
- Leseberg, C.H., Li, A., Kang, H., Duvall, M. y Mao, L. (2006). Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. *Gene.* **378**, 84-94.
- Lewis, G., Schrire, B., MacKinder B. y Lock, M. (2005). En: Legumes of the World. (Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanical Gardens, Kew).
- Li, G., Meng, Z., Kong, H., Chen, Z. y Lu, A. (2003). ABC model and floral evolution. *Chin Sci Bull.* **48**, 2651-2657.
- Li, H., Liang, W., Jia, R., Yin, C., Zong, J., Kong, H. y Zhang, D. (2010). The *AGL6*-like gene *OsMADS6* regulates floral organ and meristem identities in rice. *Cell Research.* **20**, 299-313.
- Lightfoot, D.J., Malone, K.M., Timmis, J.N. y Orford, S.J. (2008). Evidence for alternative splicing of MADS-box transcripts in developing cotton fibre cells. *Mol Genet Genomics.* **279**, 75-85.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L. y Yanofsky, M.F. (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature.* **404**, 766-770.
- Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling, T. y Geurts, R. (2004). RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J Exp Bot.* **55**, 983-992.

**Litt, A. e Irish, V.F.** (2003). Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: implications for the evolution of floral development. *Genetics*. **165**, 821-833.

**Litt, A. y Kramer, E.M.** (2010). The ABC model and the diversification of floral organ identity. *Semin Cell Dev Biol*. **21**, 129-137.

**Livak, K.J. y Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*. **25**, 402-408.

**Lohmann, J.U. y Weigel, D.** (2002). Building beauty: The genetic control of floral patterning. *Dev Cell*. **2**, 135-142.

**Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R. y Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*. **105**, 793-803.

**Long, M., de Souza, S.J., Rosenberg, C. y Gilbert, W.** (1996). Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome c1 precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**, 7727-7731.

**Lopez-Dee, Z.P., Wittich, P., Enrico Pè, M., Rigola, D., Del Buono, I., Gorla, M.S., Kater, M.M. y Colombo, L.** (1999). *OsMADS13*, a novel rice MADS-box gene expressed during ovule development. *Dev Genet*. **25**, 237-244.

**Losa, A., Caporali, E., Spada, A., Martinelli, S. y Marziani, G.** (2004). *AOM3* and *AOM4*: Two MADS box genes expressed in reproductive structures of *Asparagus officinalis*. *Sex Plant Reprod*. **16**, 215-221.

**Lü, S., Du, X., Lu, W., Chong, K. y Meng, Z.** (2007). Two *AGAMOUS*-like MADS-box genes from *Taihangia rupestris* (Rosaceae) reveal independent trajectories in the evolution of class C and class D floral homeotic functions. *Evol Dev*. **9**, 92-104.

**Lynch, M. y Conery, J.S.** (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*. **290**, 1151-1155.

**Ma, H., Yanofsky, M.F. y Meyerowitz, E.M.** (1991). *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev*. **5**, 484-495.

**Madar, Z. y Stark, A.H.** (2002). New legume sources as therapeutic agents. *Br J Nutr*. **88**, S287-S292.

**Maere, S., De Bodt, S., Raes, J., Casneuf, T., Van Montagu, M., Kuiper, M. y Van de Peer, Y.** (2005). Modeling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**, 5454-5459.



- Malcomber, S.T. y Kellogg, E.A.** (2005). *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *Trends Plant.* **10**, 427-435.
- Mandel, M.A. y Yanofsky, M.F.** (1998). The *Arabidopsis* *AGL9* MADS box gene is expressed in young flower primordia. *Sex Plant Reprod.* **11**, 22-28.
- Mandel, M.A., Bowman, J.L., Kempin, S.A., Ma, H., Meyerowitz, E.M. y Yanofsky, M.F.** (1992a). Manipulation of flower structure in transgenic tobacco. *Cell.* **71**, 133-143.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. y Yanofsky, M.F.** (1992b). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature.* **360**, 273-277.
- Mandel, T., Lutziger, I. y Kuhlemeier, C.** (1994). A ubiquitously expressed MADS-box gene from *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol.* **25**, 319-321.
- Mantovani, R.** (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1135-1143.
- Melzer, R., Verelst, W. y Theissen, G.** (2009). The class E floral homeotic protein *SEPALLATA3* is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes *in vitro*. *Nucl Acids Res.* **37**, 144-157.
- Melzer, R., Wang, Y.Q. y Theissen, G.** (2010). The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *Semin Cell Dev Biol.* **21**, 118-128.
- Mena, M., Ambrose, B.A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Yanofsky, M.F. y Schmidt, R.J.** (1996). Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science.* **274**, 1537-1540.
- Mena, M., Mandel, M.A., Lerner, D.R., Yanofsky, M.F. y Schmidt, R.J.** (1995). A characterization of the MADS-box gene family in maize. *Plant J.* **8**, 845-854.
- Menzel, G., Apel, K. y Melzer, S.** (1996). Identification of two MADS box genes that are expressed in the apical meristem of the long-day plant *Sinapis alba* in transition to flowering. *Plant J.* **9**, 399-408.
- Mizukami, Y. y Ma, H.** (1992). Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell.* **71**, 119-131.
- Mizukami, Y. y Ma, H.** (1995). Separation of *AG* function in floral meristem determinacy from that in reproductive organ identity by expressing antisense *AG* RNA. *Plant Mol Biol.* **28**, 767-784.
- Mizukami, Y. y Ma, H.** (1997). Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell.* **9**, 393-408.

- Mizukami, Y., Huang, H., Tudor, M., Hu, Y. y Ma, H.** (1996). Functional domains of the floral regulator *AGAMOUS*: characterization of the DNA binding domain and analysis of dominant negative mutations. *Plant Cell*. **8**, 831-845.
- Moon, J., Suh, S.S., Lee, H., Choi, K.R., Hong, C.B., Paek, N.C., Kim, S.G. y Lee, I.** (2003). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J*. **35**, 613-623.
- Moon, Y.H., Kang, H.G., Jung, J.Y., Jeon, J.S., Sung, S.K. y An, G.** (1999). Determination of the motif responsible for interaction between the rice *APETALA1/AGAMOUS-LIKE9* family proteins using a yeast two-hybrid system. *Plant Physiol*. **120**, 1193-1204.
- Moore, R.C., Grant, S.R. y Purugganan, M.D.** (2005). Molecular population genetics of redundant floral-regulatory genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol*. **22**, 91-103.
- Mount, S.M.** (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res*. **10**, 459-472.
- Mouradov, A., Cremer, F. y Coupland, G.** (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*. **14**, 111-130.
- Mouradov, A., Glassick, T.V., Hamdorf, B.A., Murphy, L.C., Maria, S.S., Yang, Y. y Teasdale, R.D.** (1998). Family of MADS-box genes expressed early in male and female reproductive structures of Monterey pine. *Plant Phys*. **117**, 55-61.
- Mouradov, A., Hamdorf, B., Teasdale, R.D., Kim, J.T., Winter, K.U. y Theissen, G.** (1999). A *DEF/GLO*-like MADS-box gene from a gymnosperm: *Pinus radiata* contains an ortholog of angiosperm B class floral homeotic genes. *Dev Genet*. **25**, 245-252.
- Moyroud, E., Minguet, E.G., Ott, F., Yant, L., Posé, D., Monniaux, M., Blanchet, S., Bastien, O., Thévenon, E., Weigel, D., Schmid, M. y Parcy, F.** (2011). Prediction of regulatory interactions from genome sequences using a biophysical model for the *Arabidopsis* *LEAFY* transcription factor. *Plant Cell*. **23**, 1293-1306.
- Münster, T., Deleu W., Wingen L.U., Ouzunova M., Cacharron, J., Faigl, W., Werth, S., Kim, J.T.T., Saedler, H. y Theissen, G.** (2002). Maize MADS-box genes galore. *Maydica*. **47**, 287-301.
- Münster, T., Pahnke, J., Di Rosa, A., Kim, J.T., Martin, W., Saedler, H. y Theissen, G.** (1997). Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 2415-2420.
- Nair, R., Peck, D., Dundas, I., Samac, D., Moore, A. y Randles, J.** (2008). Morphological characterisation and genetic analysis of a bi-pistil mutant (*bip*) in *Medicago truncatula* Gaertn. *Sex Plant Reprod*. **21**, 133-141.

- Nakamura, T., Song, I.J., Fukuda, T., Yokoyama, J., Maki, M., Ochiai, T., Kameya, T. y Kanno, A.** (2005). Characterization of *TrcMADS1* gene of *Trillium camtschatcense* (Trilliaceae) reveals functional evolution of the *SOC1/TM3*-like gene family. *J Plant Res.* **118**, 229-234.
- Nam, J., dePamphilis, C.W., Ma, H. y Nei, M.** (2003). Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants. *Mol Biol Evol.* **20**, 1435-1447.
- Nam, J., Kim, J., Lee, S., An, G., Ma, H. y Nei, M.** (2004). Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**, 1910-1915.
- Navarro, C.** (2001). Genes reguladores del desarrollo floral en guisante (*Pisum sativum* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Nayak, S.N., Zhu, H., Varghese, N., Datta, S., Choi, H.K., Horres, R., Jüngling, R., Singh, J., Kishor, P.B., Sivaramakrishnan, S., Hoisington, D.A., Kahl, G., Winter, P., Cook, D.R. y Varshney, R.K.** (2010). Integration of novel SSR and gene-based SNP marker loci in the chickpea genetic map and establishment of new anchor points with *Medicago truncatula* genome. *Theor Appl Genet.* **120**, 1415-1441.
- Nei, M., Gu, X. y Sitnikova, T.** (1997). Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**, 7799-7806.
- Ng, M. y Yanofsky, M.F.** (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Genet.* **2**, 186-195.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. y Treisman, R.** (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. *Cell.* **55**, 989-1003.
- Nowak, M.A., Boerlijst, M.C., Cooke, J. y Smith, J.M.** (1997). Evolution of genetic redundancy. *Nature.* **388**, 167-171.
- Ohmori, S., Kimizu, M., Sugita, M., Miyao, A., Hirochika, H., Uchida, E., Nagato, Y. y Yoshida, H.** (2009). *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an *AGL6*-like MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice. *Plant Cell.* **21**, 3008-3025.
- Ohno, S.** (1970). En: Evolution by Gene Duplication. (Heidelberg, Germany: Springer).
- Okamuro, J.K., den Boer, B.G., Lotys-Prass, C., Szeto, W. y Jofuku, K.D.** (1996). Flowers into shoots: photo and hormonal control of a meristem identity switch in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 13831-13836.

**Oldroyd, G.E. y Geurts, R.** (2001). *Medicago truncatula*, going where no plant has gone before. *Trends in Plant Science*. **6**, 552-554.

**Onouchi, H., Igeño, M.I., Périlleux, C., Graves, K. y Coupland, G.** (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering time genes. *Plant Cell*. **12**, 885-900.

**Paetau, I., Chen, C.Z. y Jane, J.L.** (1994) Biodegradable plastic made from soybean products: 1. Effect of preparation and processing on mechanical properties and water absorption. *Indust Eng Chem Res*. **33**, 1821-1827

**Paez-Valencia, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., Contreras-Ramos, A., Hernandez-Lucas, I., Orozco-Segovia, A. y Gamboa-deBuen, A.** (2008). Localization of the MADS domain transcriptional factor *NMH7* during seed, seedling and nodule development of *Medicago sativa*. *Plant Science*. **175**, 596-603.

**Parcy, F., Bomblies, K. y Weigel, D.** (2002). Interaction of *LEAFY*, *AGAMOUS* and *TERMINAL FLOWER1* in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Development*. **129**, 2519-2527.

**Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. y Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature*. **395**, 561-566.

**Pařenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. y Colombo, L.** (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell*. **15**, 1538-1551.

**Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. y Yanofsky, M.F.** (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*. **405**, 200-203.

**Pelucchi, N., Fornara, F., Favalli, C., Masiero, S., Lago, C., Pe, M.E., Colombo, L. y Kater, M.M.** (2002). Comparative analysis of rice MADS-box genes expressed during flower development. *Sex Plant Reprod*. **15**, 113-122.

**Perl-Treves, R., Kahana, A., Rosenman, N., Xiang, Y. y Silberstein, L.** (1998). Expression of multiple *AGAMOUS*-like genes in male and female flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Physiol*. **39**, 701-710.

**Perrière, G. y Gouy, M.** (1996) WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*. **78**, 364-369.

**Petersen, K., Didion, T., Andersen, C.H. y Nielsen, K.K.** (2004). MADS-box genes from perennial ryegrass differentially expressed during transition from vegetative to reproductive growth. *J Plant Physiol*. **161**, 439-447.

- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E. y Yanofsky, M.F.** (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*. **424**, 85-88.
- Pnueli, L., Abu-Abeid, M., Zamir, D., Nacken, W., Schwarz-Sommer, Z. y Lifschitz, E.** (1991). The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J.* **1**, 255-266.
- Pnueli, L., Hareven, D., Rounsley, S.D., Yanofsky, M.F. y Lifschitz, E.** (1994). Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*. **6**, 163-173.
- Polhill, R.M., Raven, P.H. y Stirton, C.H.** (1981). Evolution and systematics of the Leguminosae. En *Advances in Legume Systematics Part 1*. Polhill, R.M. y Raven, P.H., eds. (Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanical Gardens, Kew). 1-26.
- Poupin, M.J., Federici, F., Medina, C., Matus, J.T., Timmermann, T. y Arce-Johnson, P.** (2007). Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box *TM6*, *PISTILLATA* and *APETALA3* genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene*. **404**, 10-24.
- Prince, V.E. y Pickett, F.B.** (2002). Splitting pairs: the diverging fates of duplicate genes. *Nat Rev Genet*. **3**, 827-837.
- Purugganan, M.D. y Suddith, J.I.** (1998). Molecular population genetics of the *Arabidopsis* *CAULIFLOWER* regulatory gene: non neutral evolution and naturally occurring variation in floral homeotic function. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 8130-8134.
- Purugganan, M.D., Rounsley, S.D., Schmidt, R.J. y Yanofsky, M.F.** (1995). Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics*. **140**, 345-356.
- Putterill, J., Laurie, R. y Macknight, R.** (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* **26**, 363-373
- Rastogi, S. y Liberles, D.A.** (2005). Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evolutionary Biology*. **5**, 28.
- Reinheimer, R. y Kellogg, E.A.** (2009). Evolution of *AGL6*-like MADS box genes in grasses (Poaceae): ovule expression is ancient and Palea expression is new. *Plant Cell*. **21**, 2591-2605.
- Repetto, O., Rogniaux, H., Firnhaber, C., Zuber, H., Küster, H., Larré, C., Thompson, R. y Gallardo, K.** (2008) Exploring the nuclear proteome of *Medicago truncatula* at the switch towards seed filling. *Plant J.* **56**, 398-410.

**Riechmann, J.L. y Meyerowitz, E.M.** (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem.* **378**, 1079-1101.

**Rigola, D., Pè, M.E., Mizzi, L., Ciampolini, F. y Sari-Gorla, M.** (2001). *CdMADS1*, an *AGAMOUS* homologue from hazelnut, produces floral homeotic conversion when expressed in *Arabidopsis*. *Sexual Plant Reproduction.* **13**, 185-191.

**Rijkema, A.S., Gerats, T. y Vandenbussche, M.** (2007). Evolutionary complexity of MADS complexes. *Curr Opin Plant Biol.* **10**, 32-38.

**Rijkema, A.S., Royaert, S., Zethof, J., van der Weerden, G., Gerats, T. y Vandenbussche, M.** (2006). Analysis of the Petunia *TM6* MADS box gene reveals functional divergence within the *DEF/AP3* lineage. *Plant Cell.* **18**, 1819-1832.

**Rijkema, A.S., Vandenbussche, M., Koes, R., Heijmans, K. y Gerats, T.** (2010). Variations on a theme: changes in the floral ABCs in angiosperms. *Semin Cell Dev Biol.* **21**, 100-107.

**Rijkema, A.S., Zethof, J., Gerats, T. y Vandenbussche, M.** (2009). The petunia *AGL6* gene has a *SEPALLATA*-like function in floral patterning. *Plant J.* **60**, 1-9.

**Robinson-Beers, K., Pruitt, R.E. y Gasser, C.S.** (1992). Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *Plant Cell.* **4**, 1237-1249.

**Robles, P. y Pelaz, S.** (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol.* **49**, 633-643.

**Ronse Decraene, L.P., Clinkemallie, D. y Smets, E.** (1993). Stamen-petal complexes in Magnoliatae. *Bull Jard Bot Nat Belg.* **62**, 97-112.

**Rounsley, S.D., Ditta, G.S. y Yanofsky, M.F.** (1995). Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell.* **7**, 1259-1269.

**Russelle, M.** (2001). Alfalfa. *Am Sci.* **89**, 252-259.

**Rutledge, R., Regan, S., Nicolas, O., Fobert, P., Côté, C., Bosnich, W., Kauffeldt, C., Sunohara, G., Séguin, A. y Stewart, D.** (1998). Characterization of an *AGAMOUS* homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. *Plant J.* **15**, 625-634.

**Sablowski, R.W.M. y Meyerowitz, E.M.** (1998). Temperature-sensitive splicing in the floral homeotic mutant *apetala3 -1*. *Plant Cell.* **10**, 1453-1463.

**Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. y Coupland, G.** (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science.* **288**, 1613-1616.

**Sambrook, J., Fritsch E.F. y Maniatis, T.** (1989). En: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. (New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

**Sattler, R.** (1967). Petal inception and the problem of pattern detection. *J Theor Biol.* **17**, 31-39.

**Savidge, B., Rounsley, S.D. y Yanofsky, M.F.** (1995). Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell.* **7**, 721-733.

**Schauer, S.E., Schlüter, P.M., Baskar, R., Gheyselinck, J., Bolanos, A., Curtis, M.D. y Grossniklaus, U.** (2009). Intronic regulatory elements determine the divergent expression patterns of *AGAMOUS-LIKE6* subfamily members in *Arabidopsis*. *Plant J.* **59**, 987-1000.

**Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C. y Jackson, S.A.** (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature.* **463**, 178-183.

**Schultz, E.A. y Haughn, G.W.** (1991). *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **3**, 771-781.

**Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. y Sommer, H.** (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science.* **250**, 931-936.

**Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P.J., Hansen, R., Tetens, F., Lönnig, W.E., Saedler, H. y Sommer, H.** (1992). Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J.* **11**, 251-263.

**Scutt, C.P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Finet, C. y Dumas, C.** (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *J Exp Bot.* **57**, 2143-2152.

**Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krober, S., Amasino, R.A. y Coupland, G.** (2006). The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**, 898-912.

**Seastedt, T.R. y Knapp, A.K.** (1993) Consequences of nonequilibrium resource availability across multiple time scales: the transient maxima hypothesis. *Am Nat.* **141**, 621-633.

**Sellars, M.J., Vuocolo, T., Leeton, L.A., Coman, G.J., Degnan, B.M. y Preston, N.P.** (2007). Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: a comparison of relative and absolute quantification procedures. *J Biotechnol.* **129**, 391-399.

**Shen, W.J. y Forde, S.** (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res.* **17**, 8385.

**Shindo, S., Ito, M., Ueda, K., Kato, M. y Hasebe, M.** (1999). Characterization of MADS genes in the gymnosperm *Gnetum parvifolium* and its implication on the evolution of reproductive organs in seed plants. *Evol Dev.* **1**, 180-190.

**Shore P. y Sharrocks A.D.** (1995). The MADS-Box family of transcription factors. *Eur J Biochem.* **229**, 1-13.

**Shuff, T. y Thomas, J.** (1993). Normal floral ontogeny and cool temperature-induced aberrant floral development in *Glycine max* (Fabaceae). *Amer J Bot.* **80**, 429-448.

**Sidow, A.** (1996). Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* **6**, 715-722.

**Sieburth, L.E. y Meyerowitz, E.M.** (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell.* **9**, 355-365.

**Sieburth, L.E., Running, M.P. y Meyerowitz, E.M.** (1995). Genetic separation of third and fourth whorl functions of *AGAMOUS*. *Plant Cell.* **7**, 1249-1258.

**Simpson, G.G. y Dean, C.** (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science.* **296**, 285-289.

**Singh, R. J.** (2005). Landmark research in grain legumes. En: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series: Grain legumes, Vol. 1. Singh, R.J. y Jauhar, P.P., eds. (Boca Raton, Fla.: CRC Press, Inc). 1-9.

**Singh, R.J., Chung, G.H. y Nelson, R.L.** (2007). Landmark research in legumes. *Genome.* **50**, 525-537.

**Smil, V.** (1999). Nitrogen in crop production. *Global Biogeochem Cycles.* **13**, 647-662.

**Smyth, D.R., Bowman, J.L. y Meyerowitz, E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 755-767.



Soderlund, C., Descour, A., Kudrna, D., Bomhoff, M., Boyd, L., Currie, J., Angelova, A., Collura, K., Wissotski, M., Ashley, E., Morrow, D., Fernandes, J., Walbot, V. y Yu, Y. (2009). Sequencing, mapping, and analysis of 27,455 maize full-length cDNAs. *PLoS Genet.* **5**, e1000740.

Soltis, D.E., Chanderbali, A.S., Kim, S., Buzgo, M. y Soltis, P.S. (2007). The ABC model and its applicability to basal angiosperms. *Ann Bot.* **100**, 155-163.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Albert, V.A., Oppenheimer, D.G., dePamphilis, C.W., Ma, H., Frohlich, M.W. y Theissen, G. (2002). Missing links: the genetic architecture of flowers [correction of flower] and floral diversification. *Trends Plant Sci.* **7**, 22-31.

Somers, D.A., Samac, D.A. y Olhoft, P.M. (2003). Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol.* **131**, 892-899.

Sommer, H., Beltrán, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.E., Saedler, H. y Schwarz-Sommer, Z. (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* **9**, 605-613.

Sprague, G.F. (1990). Combinatorial associations of regulatory proteins and the control of cell type in yeast. *Adv Genet.* **27**, 33-62.

Starker, C.G., Parra-Colmenares, A.L., Smith, L., Mitra, R.M. y Long, S.R. (2006). Nitrogen fixation mutants of *Medicago truncatula* fail to support plant and bacterial symbiotic gene expression. *Plant Phys.* **140**, 671-680.

Stellari, G.M., Jaramillo, M.A. y Kramer, E.M. (2004). Evolution of the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages of MADS-box-containing genes in the basal angiosperms. *Mol Biol Evol.* **21**, 506-519.

Sundberg, M.D. (1982). Floral ontogeny in *Cyclamen persicum* "F1 Rosemunde rose" (*Primulaceae*). *Amer J Bot.* **69**, 380-388.

Sundström, J., Carlsbecker, A., Svensson, M.E., Svenson, M., Johanson, U., Theissen, G. y Engström, P. (1999). MADS-box genes active in developing pollen cones of Norway spruce (*Picea abies*) are homologous to the B-class floral homeotic genes in angiosperms. *Dev Genet.* **25**, 253-266.

Sung, S.K. y An, G. (1997). Molecular cloning and characterization of a MADS-Box cDNA clone of the fuji apple. *Plant Cell Physiol.* **38**, 484-489.

Tadege, M., Ratet, P. y Mysore, K.S. (2005). Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*. *Trends Plant Sci.* **10**, 229-235.

Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P.X., Chabaud, M., Ratet, P. y Mysore, K.S. (2008). Large-scale insertional mutagenesis

using the *Tnt1* retrotransposón in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **54**, 335-347.

**Tadiello, A., Pavanello, A., Zanin, D., Caporali, E., Colombo, L., Rotino, G.L., Trainotti, L. y Casadoro, G.** (2009). A *PLENA*-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *J Exp Bot.* **60**, 651-661.

**Tandre, K., Albert, V.A., Sundås, A. y Engström, P.** (1995). Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Mol Biol.* **27**, 69-78.

**Tandre, K., Svenson, M., Svensson, M.E. y Engström, P.** (1998). Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant J.* **15**, 615-623.

**Tani, E., Polidoros, A.N. y Tsaftaris, A.S.** (2007). Characterization and expression analysis of *FRUITFULL*- and *SHATTERPROOF*-like genes from peach (*Prunus persica*) and their role in split-pit formation. *Tree Physiol.* **27**, 649-659.

**Theissen, G.** (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol.* **4**, 75-85.

**Theissen, G. y Saedler, H.** (1995). MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Curr Opin Genet Dev.* **5**, 628-639.

**Theissen, G. y Saedler, H.** (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature.* **409**, 469-471.

**Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J.T., Münster, T., Winter, K.U. y Saedler, H.** (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol.* **42**, 115-149.

**Theissen, G., Kim, J.T. y Saedler, H.** (1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J Mol Evol.* **43**, 484-516.

**Theissen, G., Strater, T., Fischer, A. y Saedler, H.** (1995). Structural characterization, chromosomal localization and phylogenetic evaluation of two pairs of *AGAMOUS*-like MADS-box genes from maize. *Gene.* **156**, 155-166.

**Thomas, J.** (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell.* **16**, S1-S17.

**Thompson, B.E., Bartling, L., Whipple, C., Hall, D.H., Sakai, H., Schmidt R y Hake, S.** (2009). *bearded-ear* encodes a MADS box transcription factor critical for maize floral development. *Plant Cell.* **21**, 2578-2590.

**Treisman, R.** (1992). The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 423-426.

- Trinh, H., Barker, D. y Ratet, P.** (2001). Regeneration and transformation methods. En: Course Manual of EMBO. Practical course on the new plant model system *Medicago truncatula*. Organized by Kondorosi, A. and Dénarié J. Nov 19 – Dec 1. Gif-sur-Yvette, France.
- Tröbner, W., Ramirez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönnig, W.E., Saedler, H., Sommer, H. y Schwarz-Sommer, Z.** (1992). *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO J.* **11**, 4693-4704.
- Tsuchimoto, S., Mayama, T., van der Krol, A. y Ohtsubo, E.** (2000). The whorl-specific function of a petunia class B floral homeotic gene. *Genes Cells.* **5**, 89-99.
- Tsuchimoto, S., van der Krol, A.R. y Chua, N.H.** (1993). Ectopic expression of *pMADS3* in transgenic petunia phenocopies the petunia blind mutant. *Plant Cell.* **5**, 843-853.
- Tucker, S.C.** (1984). Unidirectional organ initiation in leguminous flowers. *Amer J Bot.* **71**, 1139-1148.
- Tucker, S.C.** (1987). Floral initiation and development in legumes. En: Advances in Legume Systematics. Vol III. Stirton, C.H., ed. (Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanical Gardens, Kew). 183-239.
- Tucker, S.C.** (1989). Overlapping organ initiation and common primordia in flowers of *Pisum sativum* (*Leguminosae: Papilionoideae*). *Amer J Bot.* **76**, 714-729.
- Tucker, S.C.** (2003). Floral development in legumes. *Plant Physiol.* **131**, 911-926.
- Uimari, A., Kotilainen, M., Elomaa, P., Yu, D., Albert, V.A. y Teeri, T.H.** (2004). Integration of reproductive meristem fates by a *SEPALLATA*-like MADS-box gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**, 15817-15822.
- van der Krol, A., Brunelle, A., Tsuchimoto, S. y Chua, N.** (1993). Functional analysis of Petunia floral homeotic MADS box gene *pMADS1*. *Genes Dev.* **7**, 1214-1228.
- van der Linden, C.G., Vosman, B. y Smulders, M.J.** (2002). Cloning and characterization of four apple MADS box genes isolated from vegetative tissue. *J Exp Bot.* **53**, 1025-1036.
- Vance, C.P., Graham, P.H. y Allan, D.L.** (2000). Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. En: Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G. y Newton, W.E., eds. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers). 506-514.
- Vandenbussche, M., Theissen, G., Van de Peer, Y. y Gerats, T.** (2003a). Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4401-4409.

**Vandenbussche, M., Zethof, J., Royaert, S., Weterings, K. y Gerats, T.** (2004). The duplicated B-class heterodimer model: whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell*. **16**, 741-754.

**Vandenbussche, M., Zethof, J., Souer, E., Koes, R., Tornielli, G.B., Pezzotti, M., Ferrario, S., Angenent, G.C. y Gerats, T.** (2003b). Toward the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require *SEPALLATA*-like MADS box genes in petunia. *Plant Cell*. **15**, 2680-2693.

**Viaene, T., Vekemans, D., Becker, A., Melzer, S. y Geuten, K.** (2010). Expression divergence of the *AGL6* MADS domain transcription factor lineage after a core eudicot duplication suggests functional diversification. *BMC Plant Biol*. **10**, 148.

**Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. y Tilman, D.G.** (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol Appl*. **7**, 737-750.

**Vrebalov, J., Pan, I.L., Arroyo, A.J., McQuinn, R., Chung, M., Poole, M., Rose, J., Seymour, G., Grandillo, S., Giovannoni, J. e Irish, V.F.** (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *Plant Cell*. **21**, 3041-3062.

**Wagner, A.** (1999). Redundant gene functions and natural selection. *J Evol Biol*. **12**, 1-16.

**Walden, A.R., Wang, D.Y., Walter, C. y Gardner, R.C.** (1998). A large family of *TM3* MADS-box cDNAs in *Pinus radiata* includes two members with deletions of the conserved K domain. *Plant Sci*. **138**, 167-176.

**Wang, B.B. y Brendel, V.** (2006). Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**, 7175-7180.

**Wang, H. y Grusak, M.** (2005). Structure and development of *Medicago truncatula* pod wall and seed coat. *Annals of Botany*. **95**, 737-747.

**Wang, S.Y., Lee, P.F., Lee, Y.I, Hsiao, Y.Y., Chen, Y.Y., Pan, Z.J., Liu, Z.J. y Tsai, W.C.** (2011). Duplicated C-class MADS-box genes reveal distinct roles in gynostemium development in *Cymbidium ensifolium* (Orchidaceae). *Plant Cell Physiol*. **52**, 563-577.

**Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*. **27**: 581-590.

**Weigel, D. y Meyerowitz, E.M.** (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*. **78**, 203-209.

**Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G.,**

**Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**, 581-590.

**Western, T.L. y Haughn, G.W.** (1999). *BELL1* and *AGAMOUS* genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**, 329-336.

**Winter, K.U., Becker, A., Münster, T., Kim, J.T., Saedler, H. y Theissen, G.** (1999). MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 7342-7347.

**Wojciechowski, M.F.** (2003). Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21<sup>st</sup> century perspective. En: *Advances in Legume systematics*, Vol 10. Higher Level Systematics. Klitgaard, B.B. y Bruneau, A., eds. (Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanical Gardens, Kew). 5-35.

**Wu, C., Ma, Q., Yam, K.M., Cheung, M.Y., Xu, Y., Han, T., Lam, H.M. y Chong, K.** (2006). In situ expression of the *GmNMH7* gene is photoperiod-dependent in a unique soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) flowering reversion system. *Planta.* **223**, 725-735.

**Xu, Y., Zhang, L., Xie, H., Zhang, Y.Q., Oliveira, M.M. y Ma, R.C.** (2008). Expression analysis and genetic mapping of three *SEPALLATA*-like genes from peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Tree Genet. Genomes.* **4**, 693-703.

**Yamaguchi, T., Lee, D.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G. y Hirano, H.Y.** (2006). Functional diversification of the two C-class MADS box genes *OSMADS3* and *OSMADS58* in *Oryza sativa*. *Plant Cell.* **18**, 15-28.

**Yanofsky, M.F.** (1995). Floral meristems to floral organs: Genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **46**, 167-188.

**Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. y Meyerowitz, E.M.** (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature.* **346**, 35-39.

**Yao, J.L., Dong, Y.H. y Morris, B.A.M.** (2001). Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 1306-1311.

**Yao, J.L., Dong, Y.H., Kvarnheden, A. y Morris, B.A.M.** (1999). Seven MADS-box genes in apple are expressed in different parts of the fruit. *J Am Soc Horticult Sci.* **124**, 8-13.

**Yellina, A.L., Orashakova, S., Lange, S., Erdmann, R., Leebens-Mack, J. y Becker, A.** (2010). Floral homeotic C function genes repress specific B function genes in the carpel whorl of the basal eudicot California poppy (*Eschscholzia californica*). *Evodevo.* **1**, 1:13.

**Yi, Y. y Jack, T.** (1998). An intragenic suppressor of the *Arabidopsis* floral organ identity mutant *apetala3* -1 functions by suppressing defects in splicing. *Plant Cell*. **10**, 1465-1477.

**Young, N.D. y Udvardi, M.** (2009). Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol*. **12**, 193-201.

**Young, N.D., Cannon, S.B., Sato, S., Kim, D., Cook, D.R., Town, C.D., Roe, B.A. y Tabata, S.** (2005). Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*. **137**, 1174-1181.

**Yu, D., Kotilainen, M., Pöllänen, E., Mehto, M., Elomaa, P., Helariutta, Y., Albert, V.A. y Teeri, T.H.** (1999). Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) the Fuji apple. *Plant J*. **17**, 51-62.

**Yu, H., Ito, T., Wellmer, F. y Meyerowitz, E.M.** (2004). Repression of *AGAMOUS-LIKE24* is a crucial step in promoting flower development. *Nat Genet*. **36**, 157-161.

**Zahn, L.M., Kong, H., Leebens-Mack, J.H., Kim, S., Soltis, P.S., Landherr, L.L., Soltis, D.E., dePamphilis, C.W. y Ma, H.** (2005a). The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes: A preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics*. **169**, 2209-2223.

**Zahn, L.M., Leebens-Mack, J., DePamphilis, C.W., Ma, H. y Theissen, G.** (2005b). To B or Not to B a flower: the role of *DEFICIENS* and *GLOBOSA* orthologs in the evolution of the angiosperms. *J Hered*. **96**, 225-240.

**Zahn, L.M., Leebens-Mack, J.H., Arrington, J.M., Hu, Y., Landherr, L.L., dePamphilis, C.W., Becker, A., Theissen, G. y Ma, H.** (2006). Conservation and divergence in the *AGAMOUS* subfamily of MADS-box genes: evidence of independent sub- and neofunctionalization events. *Evol Dev*. **8**, 30-45.

**Zhang, H. y Forde, B.G.** (1998). An *Arabidopsis* MADS-box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*. **279**, 407-409.

**Zohary, D. y Hopf, M.** (2000). En: Domestication of Plants in the Old World. The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. 3rd. Ed. (New York: Oxford University Press Inc.).

**Zucchero, J.C., Caspi, M. y Dunn, K.** (2001). *ngl9*: a third MADS box gene expressed in alfalfa root nodules. *Mol Plant Microbe Interact*. **14**, 1463-1467.

---

**A**NEXOS

---





## 1 SECUENCIA GENÓMICA AMPLIFICADA QUE CONTIENE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN *MtAGa* DE *Medicago truncatula*

1 **ATGGATTTTC CAAATGAATC CATGTCAGAT TCTCCACAGA GAAAGATTGG AAGGGGAAAG**  
 61 **ATTGAGATCA AAAGGATTGA AAACACGACG AATCGTCAAG TAACTTTCTG CAAAAGAAGA**  
 121 **AATGGTTTGT TGAAGAAAGC ATATGAATTA TCTGTTCTTT GTGATGCAGA AGTTGCTCTT**  
 181 **ATAGTCTTCT CTAGCCGTGG ACGGCTCTAT GAGTATGCTA ATAACAGTGT CAAAGAGACT**  
 241 **ATTGCAAGGT ACAAAAAAGC ATGTTTCAGAT TCATCTGGCA CTGGATCTGC TACTGAGGCT**  
 301 **AATGCTCAG**g tattgattaa ttcatttttt tttcttcata ttaattcctt caaattaatg  
 361 gttgatattt tattaacta tataaaaaaa ctaacattta taaccatgat ttcatatata  
 421 ttctcd**ag**TT **TTACCAGCAA GAGGCAGACA AATTGCGTGT GCAAATTAGT AACCTGCAGA**  
 481 **ATAACAACAG** **ga**agtcata ctaaccttaa tgccttagaa ctactgaat aagaaaaaga  
 541 gaagagagaa ttacattctt ctcccttaa ttacacttat tttttattha tcttaaaatt  
 601 tatacattc ccttaaaaag taaaaccatc agtaaccaa aaaaaaagt aaaactatct  
 661 attatatttt tgtcaattta accaagcttc ttatgcatat atttttctct ctattttttg  
 721 ttcacagcat cattaagatt taagaaacct aactatctac tatgaaataa gtttttgcca  
 781 aactatttgt gctaatgaaa aagctattta tagctgaatt tcaacttcta aattacaaaa  
 841 tcaatagaaa ggtgtttcaa attatttgtc tccggcattc tacctcggca cactttatgc  
 901 taggtatggt cttttgttg taatatattc tattttgact tgtttaaaaa aaataaaatt  
 961 atttttcatc ggcttgaatg ttgcaaagaa gcaattttt gaagtgatta tttaaagttt  
 1021 ttggctatcc ttaaaatttt tttttttag taatacttat ttacttttta tgaagagaaa  
 1081 catagatttc aacacaagac aatagtgaaa ttcaattatg tttagaggaa tgagtataat  
 1141 ttatcctaaa ttttttgaag agatttcaat tttaaaacca ctaatttaat tttacaattg  
 1201 gggatgaaat aaattattat taattaacgt agtttatggt cattttacaa ctcatctcga  
 1261 ggggattgag gtccgttcct tgagttaaaa ggtcaaactt agtcgataac tcattacaca  
 1321 aatcactaat ttgttgataa aacaattttt gtaacatag tttatggtca ttttacaact  
 1381 catttcgagg ggattgaggt ccgttccttg agttaaaagg tcaaacttag tactaagagc  
 1441 atccacaatg gagaccctca aattgaagat cttaaagcggg ttccatttgt acacatcact  
 1501 ttttttatta ttttataata aaagtaccta ataggtactc ggtcactcca atggagatct  
 1561 tctaacaaaa agtctaaatg tgtcccacca ctaactctta ttcattttaa tttcagcact  
 1621 aacatattat ttttaataaaa atgtgtgtgg ggactactta aagatggggg tcttaagtta  
 1681 gaccccatgt cttagaagac cccaaatttt attcccaca tgggagtacc tattaggtac  
 1741 taggtcttaa atggtgaaga cctcaccatt gtagatgctc taagccgata cctcattaca  
 1801 caaatcacta atttgttgat aaaacaattt tgaaacctc taattaattt gtaatttga  
 1861 tcatctgaat atccttgctg aaaatgatta aaatg**ag**GC **AAATGATGGG TGAATCTTTG**  
 1921 **GGCTCTATGA ATGCCAAGGA ACTGAAAAAT CTGGAGTCTA AATTAGAAAA AGGAATTAGT**  
 1981 **CGGATTCGTT CCAAAAAAG**gt atacatattt cttatgttat caaccagtcc tttctacaat  
 2041 ttgtttcata agattcatga ttttatctac aatgttctga taaatcatgc atttttctga  
 2101 ctctctcctt tctttttgct tgctctacaa tccaacatc aactd**ag**AAT **GAGCTGTTAT**

2161 **TTGCTGAAAT TGAATACATG CAGAAGAGG**g tacacatttt tttctataca cattagtctt  
 2221 ctttagtaac aaattcaaat tatatcatga tttgtgttgc cctaagtttc aatgaagta  
 2281 tcatatacta acctatatgt acacagag**G AGATAGACTT GCACAATAAC AACCAACTTC**  
 2341 **TGAGAGCAAA** Ggtcattttct ttttatctct atatctttct tcatatactt cctatgtgca  
 2401 attttgatat tttcaagtat cttatggttt tatgattttg gtgtgtatag **ATAGCTGAAA**  
 2461 **GTGAGAGGAA CCATAGCCAC CATAGCAATA TTAATATGAG TATGTTGCC T GGAGGCACAA**  
 2521 **ACTATGAACC TATGCAGTCT CAGAATCAGC AGCAGCAATA TGAGTCTCGT GGATACTTTC**  
 2581 **AAGTTTCTGG ATTACAATCC AGTAGTAGTC AAATGACTGC ATTACAACCA AGTAGTCAGT**  
 2641 **ATGCAAGACA AGACCACATG TCCCTTCAAT TAGTTTGA**

**Anexo 1.** Como nucleótido 1 se tomó el primero de la región codificante. Los exones se representan en negrita y mayúscula, en minúscula se señalan los intrones; el codón de inicio de la traducción (ATG) y el codón de parada (TGA) se muestran subrayados. Los nucleótidos indicados en cursiva (exón I, intrón I, parte del exón II y parte del exón VII) no fueron amplificados mediante PCR. Con un triángulo se señala la supuesta posición del intrón I. Se encierran en cuadros los extremos esenciales típicos de los intrones (GT-AG) y en un círculo el extremo esencial menos común (GC).

## 2 SECUENCIA GENÓMICA AMPLIFICADA QUE CONTIENE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN *MtAGb* DE *Medicago truncatula*

1 ATGAGTTTTTC CAAACGAATC CATGCCAGAT TCTCCACAGA GAGCAAAGAT TGGAAGAGGG  
 61 AAGATTGAGA TCAAGAGGAT TGAGAACACA ACGAATCGTC AAGTTACGTT CTGCAAGCGT  
 121 AGAAATGGCT TGCTTAAGAA GGCATATGAA TTATCTGTGC TTTGTGATGC TGAAGTTGCT  
 181 CTTATAGTCT TCTCGACTCG CGGCCGCCTC TATGAATATG CAAATAACAG gtaactactg  
 241 aagaatTTTT ctagctTTTT gtgttattgt tctttttcta tttgtttgca gtttttgata  
 301 agtcaaagaa atgtctttgt tgcttctttt tgaggaacat tgagtttata tttatgttca  
 361 tgtaataaga tcttttgaaa gagtacatta gttaacttaa caaaagaga ctaatcattt  
 421 ttgtgttaaa tttttctctt tgtatgtctg ttttctgcaa ccaagattca cttgtgtttg  
 481 tttcttctat tttggccttt ttctgttctt tccataaact ttttaagttc attttctcaa  
 541 cctcttttct ttgtgtctat gagaattttc ctagtttttt tttttgggtt tgggtggacac  
 601 atagatctgg tataacagaa atgtatagaa gcactatggt tgttatttgt tagtagtatac  
 661 attcaggtaa ggatttggga agatttgaag aagggttgtg agatcagcca atccctaact  
 721 tccttcttca ttttgttctt aaactttcca ctttttcttt ttttttctct ttctctttct  
 781 aatgttattc ctcctaataa ggcctaaagc aagtggaaaa agctagttgt caatgagtta  
 841 aattgaaatt attaataaaa taataaagaa aaagcaaggg ttatttaggg tttgtgaaaa  
 901 gcctaaaact atagttcctc acttattata cagaaaaatt tcttaatgaa gaaattatac  
 961 aggaaatttt cttttttaat tcgacagaaa taaatctgat taagaacact attttcaatt  
 1021 ctttaatttga aaaaagggtt tccctcaaat ctcagcttgg ataaacaata accctagaaa  
 1081 ttagggtttt attaacatct aatttatgag atggataaca actaatcaaa gggatacaaa

1141 tgaaaatgaa agaaagacag aaactttaca aaattatagt caaaagggta tattggaat  
1201 ctcatTTTTgt tgtttaattt cccaattta ggaatatagg cctgttTgtg ttatttctgg  
1261 ttagggccta aaggactcac tagctagaca ctgatttcaa ttttTgtcttg gatgaaaga  
1321 atcttttagtc atgtca caag tgaattttct cttaaagat gaatcctaaa gttaatccta  
1381 tatatcctta gttaatcttt cagttatcat aaggtaaaaa tccaaatatt ctgttgtttt  
1441 ttttattaat ctaaataatat tgttttacat agttagaaaa gaacaataca atagagagtg  
1501 atgatgtaat gaatagggtg gttatcataa tttcattgtt gccaaagatc tttcaataa  
1561 tagatcaaat ctgtgaaagt tatagactga ggaagaaaa ggaagggtt ttctttctaa  
1621 gctaaatgaa tgatgtaaat ggaggcagag acaacgtacg acaatttgag acagccaata  
1681 agattgttat caacattttt gtcttcttcc atgcaacgga aacgtactac tgttccttct  
1741 gctacatcta tagcagtgtc tgcccgaacc tatttggacg gctgtgattt tatcacattc  
1801 agaaagaaaa gactgaaaac aaaataaaaat attattttta tattttacta ataagtttgg  
1861 taaaaaaca aggtaggtaa taaattgtat ttgagagtat tatccaatgt gtaggagatg  
1921 gttccttcat atggcagtgg aaataattta aaaaaagcac taaaatggg tgaaccaatc  
1981 atatttagga acctgagcca gcgtggcagg tgcaaccaat caatggctcg acgaaattaa  
2041 ggtatcactg gtcaaatatg ctgaaaaatga acaaaaaata aaaagggtt tttaccattt  
2101 ctttttatgc tattatttat tgtattttat tatcaacaca tccaatcaac tttgtttctg  
2161 atgaatgcac atctaataca cattgacgtc aaggttttga ggaatgagat cttttgatgt  
2221 gtgtttttca agattgtgtt ttaaggttca gtttactcaa ctagctggat gatttgactg  
2281 caaattatgt cattattttg aaatagattt attactttac ttttgtttat tcttgttcaa  
2341 cgagtaactg aaataacttg atgaagattc atataaaaat tggataaaga tgatatgtag  
2401 aatagagtct attttttatg ataattcaaa aggtagcggg ttctggatc atctagaata  
2461 gaagtaatgt atagtttata cacttatgtt tggttactct ctagacaagt tagtccatgt  
2521 ctgcttttgt agtgagtatg gatatggatg aatgaatcac ggtgcaatga ttttgcaaaa  
2581 attatactta tagaacttca ataaataatg tcactttgat tttgtcaaag ccaacttaat  
2641 accaaatatt tctttgggtca atcgcacggg gccatcacta gttttcaaac tcgggctatc  
2701 acgaatthag tgtacatgtg attttatgct aacctttaca ttaaacttgt tttcaaatag  
2761 aaatatatgg atataaatta cttcacttta aactcaattt tacgaaatca aatttcttca  
2821 aatatatatt tactaaacac caaacacaca ctacttaca catgagttgg cacaacatta  
2881 tgattccaac ctttctcttt ctcaaatca aacatttga aatgagcctt ccaatgggat  
2941 gggtatatgg agaatgagtg tactgatatc atgtatgtga tgtgatattg gctatatata  
3001 gtttgttctt gttgactgac taatgcccaa ttaaatttca aattaaatgg attgaattat  
3061 agattttatt aatttgtggc caggaatggg acaatcattg tttttggta gtaattgata  
3121 gtatttcatg atatgatgat aattaagaat tcagaaattt ccccttcttt attattatat  
3181 gccattgtca aacaacatct agcataattg atgaaaatga tatataccac ttttagTGT  
3241 CAAAGCATCA ATTGAGAGGT ACAAGAAAGC ATGTTTCAGAT TCTTCTGGTG CTAAATCAGC  
3301 TTCTGAGTCT AATGTTTCAG tattcattat ttattcacta caattacaca gcctcaaca  
3361 caagcacaag cacaagcaaa atgaatatct aacgataact acaacaaaaa gtaaatgaa  
3421 tataaaataa tgtaataaat aaactaacc ctttaaacad gattgcttaa ttttagTATT  
3481 ACCAGCAAGA AGCTGCCAAA CTGCGTGTGC AAATCAGTAA CTTGCAGAAT CATAACAGgt  
3541 aagttgaaca agtgtcttat actttcatat attaggacaa gcaaagagat attgagcatt

```

3601 ttaatggttt ctaaatagtg atgaaaatat ttttaattatg cagGCAAATG ATGGGTGAAT
3661 CTTTGAGCAA TATGAATGGT AAGGATCTCA GAAACCTTGA GAGTAAATTA GAAAAAGGAA
3721 TTAGCAGAAT TCGTTCCAAG AAGgtactta taatcacaag attcttaatt tctgtatcaa
3781 ttaattaaat gaatagatat gatgcaatat tctgctgata aataactaatg tcttccttct
3841 aactttggtt gtgctacatc agAATGAAAT GCTGTTTGCA GAACTTGAGT ACATGCAGAA
3901 GAGGgtaaat gttttctttg tattcacttt tcaataaaaaa tttcaactta tattttcctt
3961 tgtctttgtc aacattaatt ggtagtcat tggttcaaaa aggcgataat acaaaatatt
4021 cacaacaaga tctattgatt atattcaagt tatatttttc aacttatcta ttgattatac
4081 attagtcgtc accaaaataa atttgtttca taatgaaata acctccatat ttgaagacat
4141 gtattgtatg ataacaaaca agattttata taataacgtt tttcaaagta tgataactaa
4201 aatgtacata tatattacat acagGAGGTA GAGTTGCATA ATAGTAACCA AGTTCCTAGA
4261 GCAAAGgttt gttgttgtct ctctgtcctg tatatgtaat gtttgaaatc atcatatcaa
4321 ttactaatta tggcatttta tttttattta ttgctttgta gATATCAGAA AGTGAGCAGA
4381 GGAGCAACCA TAATGTTAAT GTGTTGCCTG GGGGCACAAG CTTTGAATGC ATGCAACCTC
4441 AGCAGCAGTT CGACTCTCGT GGCTACTTCC AAGTGAACGA ATTACAACCC AATGATCAGT
4501 ATGCCAGGCA AGATCAGATG TCTCTTCAAT TTGTGTAA

```

**Anexo 2.** Como nucleótido 1 se tomó el primero de la región codificante. Los exones se representan en negrita y mayúscula, en minúscula se señalan los intrones; el codón de inicio de la traducción (ATG) y el codón de parada (TAA) se muestran subrayados. Se encierran en cuadros los extremos esenciales típicos de los intrones (GT-AG). Dentro del intrón I se detallan: resaltadas en gris las secuencias consenso de unión a *LFY* (CCANTG[T/G]) y con subrayado discontinuo los posibles sitios de unión a *LFY* según el programa MORPHEUS. Se resaltan en rosa las posibles cajas CArG (consenso CC[A/T]<sub>6</sub>GG) y en azul la secuencia consenso de la caja aAGAAT. El fragmento de 70 pb conservado en varios genes ortólogos de *AGAMOUS* se indica con doble subrayado y se resaltan en amarillo las repeticiones CCAATCA. Las posiciones de los elementos reguladores de este intrón se han numerado considerando como inicio el primer nucleótido del mismo.



