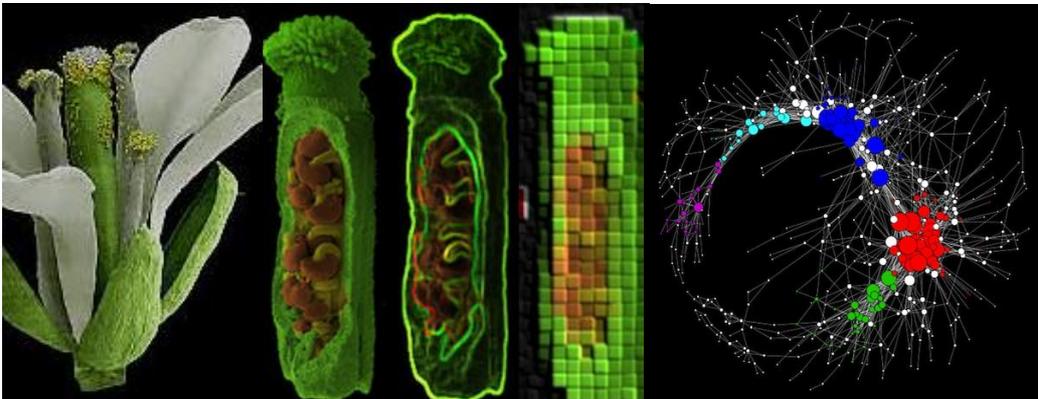




UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# Percepción y señalización de las giberelinas durante la fructificación en *Arabidopsis thaliana*



**Carolina Gallego Giraldo**

**Director: Miguel Ángel Pérez Amador**

**Valencia, Abril 2015**





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**Departamento de Biotecnología**



# **Percepción y señalización de las giberelinas durante la fructificación en *Arabidopsis thaliana***

Trabajo presentado por Carolina Gallego Giraldo para optar al grado de  
Doctora en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia

Dirigido por Miguel Ángel Pérez Amador

Valencia, Abril 2015



El Dr. Miguel Ángel Pérez Amador, Científico Titular del CSIC, perteneciente al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC) de Valencia

CERTIFICA que la Ingeniera Agrónoma - Máster en Mejora Genética Vegetal - CAROLINA GALLEGO GIRALDO, ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título "Percepción y señalización de las giberelinas durante la fructificación en *Arabidopsis thaliana*", y autoriza su presentación para optar al grado de Doctora en Biotecnología.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Valencia, Abril 2015.

Dr. Miguel Ángel Pérez Amador



## Agradecimientos

Que alegría y satisfacción finalmente haber concluido con esta etapa, un trabajo que me propuse hacer hace unos años atrás y que culmina en parte con la producción de este escrito. Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas que han contribuido en este proceso, algunos en diferentes etapas, otros desde el principio hasta el día de hoy. Todos ellos muy valiosos para que este trabajo adquiriera la forma que tiene.

En primer lugar agradecer al director de mi tesis, a Miguel, por guiarme durante todos estos años. Gracias por darme la oportunidad de realizar la tesis en tu laboratorio, por la paciencia que has tenido conmigo y por las correcciones que has realizado a este escrito, en estos años he aprendido muchas cosas valiosas de ti, en especial en esta última fase.

Quiero agradecer especialmente a Juan Carbonell y a Francisco Vera "Paco" por su ayuda siempre tan oportuna, los dos han sido muy importantes en la realización de esta tesis. Gracias Juan por creer en mí, por apoyarme desde el principio, por tu ayuda incalculable cuando me vi en dificultades con la renovación de mi permiso de estancia, también quiero agradecerte por las correcciones que has realizado a este escrito, muchas gracias por tu constante apoyo!! A Paco, tengo mucho que agradecerte, he aprendido un montón de ti, te admiro mucho y en verdad ha sido un gusto el tener la oportunidad de haber trabajado contigo. En la segunda parte de esta tesis tu colaboración y guía ha sido muy valiosa, este segundo capítulo es nuestro, ojala y podamos publicarlo muy pronto para que tú también coseches todo el esfuerzo realizado.

A María Dolores, quiero agradecerle su ayuda desde el principio. Gracias por estar ahí siempre receptiva cuando tenía cualquier duda, eres muy buena maestra, gracias por enseñarme a hacer las *in situs* y todo lo relacionado con microscopía, técnicas que abarcan buena parte de esta tesis. Gracias por tu colaboración en la toma de las imágenes SEM que aparecen en este escrito. A Clarita, gracias por toda tu ayuda con las siembras, preparación de medios, genotipados, por reconocer el fenotipo de *rbe-2*, en fin tantas cosas, en general ha sido un placer ser compis de poyata, y más importante aún gracias por nuestros cafés. También quiero agradecer a Raquel por compartir el día a día de este proceso.

A Cristina Urbez, quiero agradecerte por enseñarme todo lo relacionado con la técnica de qPCR y por estar siempre apoyándome, eres una persona encantadora, con un grado de empatía muy alto, es un gusto ver personas como tú haciendo ciencia sin perder esa

calidez. A María ángeles, eres otra de esas personas que todo el mundo estima, siempre pendiente de las necesidades de todos, muy importante para el funcionamiento de 4 labos, muchas gracias por hacerme sentir acogida desde el principio. Por ser como sois es que he terminado escribiendo mi tesis en vuestro labo!!.

Agradezco a Tai-ping Sun por recibirme en su laboratorio ha sido una experiencia muy enriquecedora para mí.

También quiero agradecer a todos los integrantes del grupo de 4 labos por compartir conocimiento, experiencia, por los seminarios, por las preguntas que me realizaron muchas de las cuales fueron bastante útiles para direccionar algunos experimentos.

Agradecer a todos mis compañeros del "insti" por las comidas y cenas compartidas y por vuestra amistad, Miriam, Liliam, Pilar, Gerardo, Ester, Camilo, Sandra, Rim. A mi pequeña familia española Patry, Olga, Carlos, Carmen, Patricia, Juan Pablo, Belén, Ester y a Pablo y Sara por tolerar esta última fase y a tramus por pasarse días enteros acostado a mis pies siendo mi compi en los días de escritura intensiva en casa.

Agradecer a mi familia, mis tíos en especial Olga y Pablo por apoyarme siempre, primos, cuñado, sobrinos, mis amigos de vida, desde la distancia siempre me han hecho llegar todo su cariño y apoyo.

Finalmente, quiero hacer una mención especial a mis seres más queridos. Mis padres, gracias por todo el apoyo, la comprensión y el amor que constantemente me brindan, por todos los consejos que me dieron mucha fuerza en los malos momentos, han sido parte vital de este trabajo, a ustedes va especialmente dedicada esta tesis. A mi hermana, por estar siempre ahí, por su apoyo incondicional, por leer la tesis y por sus valiosos consejos, te admiro mucho y es genial poder compartir contigo tantas cosas a tantos niveles!!. A German, soy muy afortunada de contar contigo, tu apoyo ha sido muy importante, en especial en esta última fase, has estado ahí escuchando, dando consejo, ánimo y siendo mi *pepe grillo* cuando me rebelaba y no me apetecía escribir.

***Una vez más... Muchas gracias a todos!!!***

Esta Tesis fue realizada gracias a la beca del extinto programa JAE-Predoc del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Ojala en un futuro muy próximo se retome este programa de becas y nuevos doctorandos puedan verse beneficiados.

# Resumen

Las giberelinas (GAs) son reguladores del crecimiento que controlan la formación y desarrollo del fruto. Las GAs son percibidas por los receptores nucleares GID1 (GA INSENSITIVE DWARF1) (GID1A, GID1B y GID1C), mediando así la degradación de las proteínas DELLA que actúan como reguladores negativos de la respuesta a GAs. Nuestro objetivo es conocer cuáles son los mecanismos moleculares por los cuales las GAs median la formación y desarrollo del fruto. Para comprender qué receptores GID1 y qué proteínas DELLA (GAI, RGA, RGL1 y RGL2) participan en la formación del fruto hemos analizado su expresión espacial y temporal, identificando las posibles interacciones específicas de tejido entre los GID1 y DELLA. GID1A puede interactuar con RGA y GAI en todos los tejidos del pistilo, mientras que las interacciones entre GID1C-RGL1 y GID1B-RGL2 solamente ocurren en valvas y óvulos, respectivamente. El análisis de alelos mutantes *gid1* indica que GID1A tiene una función principal en el crecimiento del fruto, mientras que GID1B y GID1C tienen funciones específicas en desarrollo de la semilla y elongación de la vaina, respectivamente. Por tanto la percepción de GAs en óvulos es mediada por GID1A y GID1B, mientras que en la valva lo es por GID1A y GID1C. Por otro lado, para identificar cuáles son los genes regulados por GAs que participan en la formación del fruto, hemos realizado un análisis transcriptómico en el mutante *4xdella* y en frutos partenocárpicos inducidos por GAs y polinizados, identificando más de 10,000 genes diferenciales, lo que sugiere la complejidad del proceso. De éstos se han reconocido varios factores transcripcionales que potencialmente pueden mediar la respuesta a GAs en el fruto, y hemos determinado cuáles de ellos son dianas directas de DELLA. Hemos analizado con más detalle la función de dos de ellos, RBE y PIL2, mediante el análisis de los fenotipos mutantes e interacciones *in vitro* proteína-proteína.

# Summary

The hormones Gibberellins (GAs) are growing regulators that control fruit set and fruit growth. GAs are perceived by its nuclear receptors GID1 (GA INSENSITIVE DWARF1) (GID1A, GID1B y GID1C), which then trigger degradation of downstream repressors DELLA which are negative regulators of GA response. Our general goal is to know the molecular mechanisms by which GA-mediated fruit set. To understand which of the three GA receptor genes and four DELLA proteins are involved during fruit initiation in *Arabidopsis*, we have examined their temporal and spatial localization and expression, respectively and identify tissue-specific interactions between GID1 and DELLA. Our data suggest that GID1A can interact with RGA and GAI in all tissues, whereas GID1C-RGL1 and GID1B-RGL2 interactions only occur in valves and ovules, respectively. Functional study of *gid1* mutant combinations confirms that GID1A plays a major role during fruit-set and growth, whereas GID1B and GID1C have specific roles in seed development and pod elongation, respectively. Therefore, in ovules, GA perception is mediated by GID1A and GID1B, while GID1A and GID1C are involved in GA perception in valves. On the other hand, to identify which are the genes that may participate in fruit set mediated by GAs, we have used transcriptomic analysis to detect genes regulated in the *4xdella* mutant, fruits induced by GAs and pollinated fruits. As many as 10,000 genes appear to be differentially regulated, which suggest the complexity of this process. Among the differential genes, many of them encode for transcription factors that may regulated the GA response in fruit and some of them were tested as early targets of DELLA. The implication in the GA pathway of early target genes, *RBE* and *PIL2*, was studied by mutant phenotype analysis and in vitro assays for protein-protein interaction.

# Resum

Les gibberel·lines (GAs) són reguladors del creixement que controlen la formació i desenvolupament del fruit. Les GAs són percebudes pels receptors nuclears *GID1* (*GA INSENSITIVE DWARF1*) (*GID1A*, *GID1B* y *GID1C*), intervenint així la degradació de les proteïnes *DELLA* que actuen com reguladors negatius de la resposta a GAs. El nostre objectiu és conèixer quins són els mecanismes moleculars pels quals les GAs mitjancen la formació i desenvolupament del fruit. Per a comprendre que receptors *GID1* i que proteïnes *DELLA* participen en la formació del fruit hem analitzat la seua expressió espacial i temporal, identificant les possibles interaccions específiques de teixit entre els *GID1s* i *DELLAs*. *GID1A* pot interactuar amb *RGA* i *GAI* en tots els teixits, mentre que les interaccions entre *GID1C-RGL1* i *GID1B-RGL2* solament ocorren en valves i òvuls, respectivament. L'anàlisi d'al·lels mutants *gid1* indica que *GID1A* té una funció principal en el creixement del fruit, mentre que *GID1B* i *GID1C* té funcions específiques en desenvolupament de la llavor i elongació de la beina, respectivament. Per tant la percepció de GAs en òvuls és mitjançada per *GID1A* i *GID1B*, mentre que en la valva ho és per *GID1A* i *GID1C*. Per altra banda, per a identificar quins són els gens regulats per GAs que participen en la formació del fruit, hem realitzat una anàlisi transcriptòmic en el mutant *4xdella* i en fruits induïts per GAs i pol·linitzats, identificant més de 10,000 gens diferencials, la qual cosa sugereix la complexitat del procés. D' aquests s'han identificat diversos factors transcripcionals que potencialment poden intervenir en la resposta a GAs en el fruit, i hem determinat quins d'ells són dianes directes de *DELLAs*. Hem analitzat amb més detall la funció de dos d'ells, *RBE* i *PIL2*, mitjançant l'anàlisi dels fenotips mutants i interaccions *in vitro* proteïna-proteïna.



# **Tabla de Contenido**



# Tabla de Contenido

<b>1- Introducción</b> .....	1
1.1. La estructura del fruto de <i>Arabidopsis</i> .....	3
1.2. La formación y desarrollo del fruto es un proceso coordinado y regulado por hormonas.....	5
1.3. Las GAs, biosíntesis y señalización durante el desarrollo.....	9
1.3.1. GID1 es el receptor de GAs.....	11
1.3.2. DELLA es el regulador negativo en la señalización por GAs.....	13
1.3.3. SLY es el regulador positivo la ruta de señalización por GAs.....	13
1.3.4. Formación del complejo GA-GID1-DELLA.....	14
1.4. La señalización por GAs en procesos de desarrollo .....	15
1.4.1. Los receptores GID1.....	15
1.4.2. Reguladores transcripcionales DELLA.....	16
1.5. Mecanismo molecular por el cual DELLA regula el crecimiento .....	18
1.5.1. Interacción proteína-proteína de las proteínas DELLA con FTs.....	18
1.5.2. DELLA regula la expresión de genes diana.....	20
<b>2- Objetivos</b> .....	25
<b>3- Resultados y Discusión Capítulo 1</b> .....	27
<i>Los receptores GID1 y las proteínas DELLA en el desarrollo temprano del fruto</i>	
3.1. Los transcritos de los receptores <i>GID1</i> están diferencialmente expresados en pistilos y frutos.....	29
3.2. Las proteínas GID1 se localizan de forma específica en los tejidos del pistilo y fruto .....	33
3.3. Los receptores GID1 se co-localizan con las enzimas GA20ox1 y GA20ox2 y con la expresión de los genes de biosíntesis <i>GA30ox1</i> , <i>GA3ox2</i> y <i>GA3ox4</i> en las semillas .....	36

3.4. Los genes de las proteínas DELLA se co-localizan con los receptores GID1 en óvulos y semillas en desarrollo .....	40
3.5. Mutaciones de los genes <i>GID1</i> provocan defectos de fertilidad y desarrollo del fruto .....	44
3.6. Las mutaciones en los genes <i>GID1</i> y <i>DELLA</i> provocan alteraciones en el desarrollo del endocarpo .....	51
3.7. Discusión Capítulo 1 .....	54
3.7.1. La expresión de los GID1 en los óvulos y las valvas es diferencial.....	54
3.7.2. Los GID1 y las DELLA se co-expresan en el pistilo durante la formación del fruto.....	56
3.7.3. Los receptores GID1 tienen redundancia parcial en la fertilidad y el crecimiento del fruto.....	58
<b>4- Resultados y Discusión Capítulo 2.....</b>	<b>63</b>
<i>Análisis transcriptómico del fruto e identificación de dianas directas de DELLA en fructificación</i>	
4.1. Análisis transcriptómico de los eventos tempranos en la formación del fruto.....	65
4.1.1. Diseño experimental del análisis transcriptómico.....	68
4.1.2. Análisis estadístico e identificación de los genes diferencialmente expresados durante el desarrollo temprano del fruto.....	70
4.1.3. Análisis de enriquecimiento de términos de Ontología Génica (GO).....	73
4.1.4. Búsqueda de FTs regulados por GAs e implicados en la formación del fruto .....	79
Meta-análisis de co-expresión de factores transcripcionales	
4.2. Análisis de los perfiles de expresión de los factores de transcripción con expresión diferencial a 0 hpa en el <i>4xdella</i> .....	87
4.3. Identificación de dianas directas de DELLA en fructificación .....	97

4.4. Primera aproximación experimental para conocer el rol biológico en fructificación de las dianas directas de GAI.....	103
4.4.1. Estudio de la implicación en germinación y fructificación de la diana PIL2- Phytochrome interacting factor 3- Like 2.....	105
4.4.2. Estudio de la implicación en germinación y fructificación de la diana RBE.....	109
4.5. Discusión Capítulo 2.....	114
<b>5- Conclusiones.....</b>	<b>117</b>
<b>6- Materiales y Métodos.....</b>	<b>121</b>
6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	123
6.2. Generación de líneas transgénicas DELLA-GUS.....	125
6.3. Ensayos de fructificación.....	126
6.4. Inducción de partenocarpia.....	127
6.5. Análisis de expresión génica por qPCR.....	127
6.6. Análisis Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	131
6.7. Ensayos histoquímicos con $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	131
6.8. Procedimientos histológicos en resina y parafina .....	132
6.9. Hibridaciones <i>in situ</i> de ARN.....	132
6.9.1. Imbibición y montaje de bloques.....	133
6.9.2. Preparación de la sonda.....	133
6.9.3. Cuantificación de la sonda mediante 'dot blot'.....	134
6.9.4. Pre-hibridación.....	134
6.9.5. Hibridación y lavados.....	135
6.9.6. Inmunodetección.....	136
6.9.7. Observación de los resultados.....	136
6.10. Análisis transcriptómico mediante micromatrices.....	137

6.11. Ensayos con Dex de los pistilos de la línea <i>cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR</i> .....	139
6.12. Ensayos de germinación y tratamientos con Dex y Chx en plántula.....	140
6.13. Ensayo de doble híbrido de levadura.....	141
<b>7- Bibliografía.....</b>	<b>143</b>
<b>8. Anexos y Tabla Suplementarias.....</b>	<b>157</b>

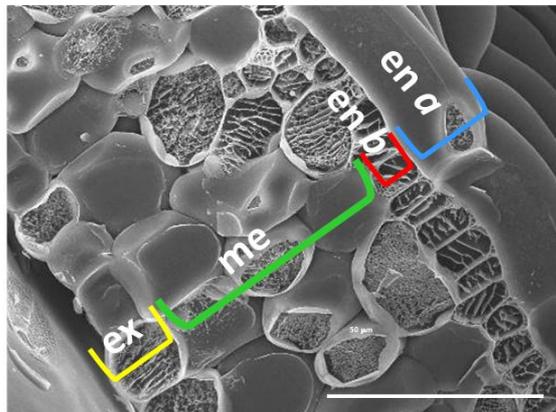
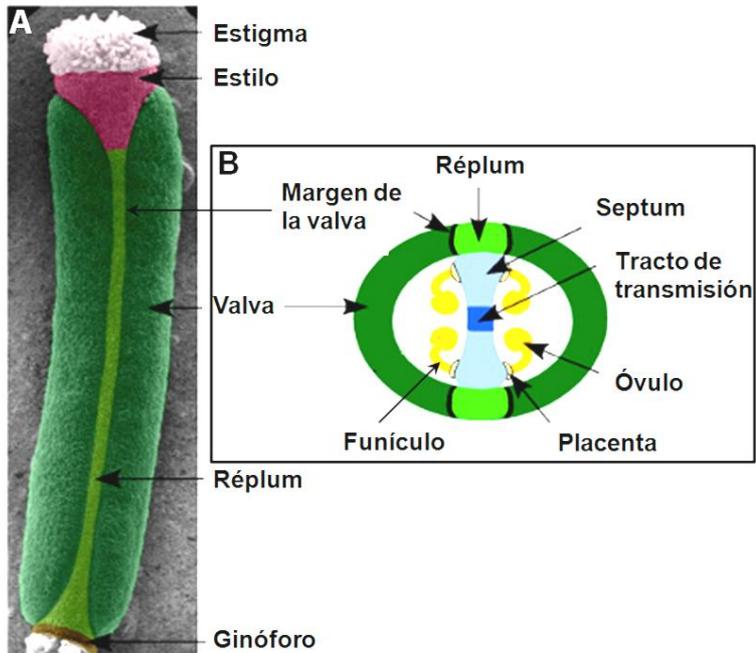
# **1-Introducción**



### 1.1. La estructura del fruto de *Arabidopsis*

El fruto es una estructura especializada designada para proteger las semillas mientras se desarrollan y posteriormente diseminarlas cuando están maduras (Roeder y Yanofsky, 2006; Ostergaard, 2009). Por lo general, el fruto se forma a partir del pistilo o gineceo de la flor tras la polinización y fecundación de los óvulos. El gineceo de *Arabidopsis* está formado por dos carpelos fusionados en un canal central denominado replum, y está coronado por un único estilo y estigma (Cox *et al.*, 2006; Balanza *et al.*, 2006; Ostergaard, 2009; Arnaud *et al.*, 2010). El estigma, ubicado en la parte superior del pistilo está compuesto por una capa de células papilares especializadas que permiten la germinación del polen. El estilo forma un cilindro alrededor de las células del tracto de transmisión encargado de guiar el tubo polínico desde el estigma hacia el ovario. En la parte inferior del pistilo y abarcando casi su totalidad se sitúa el ovario, que contiene los óvulos, y que se une por su base al pedúnculo de la flor a través del ginóforo (Figura 1.1A)

En una sección transversal se observa que el ovario de *Arabidopsis* se compone de dos compartimentos divididos por el septum y la placenta que une cada óvulo por medio del funículo (Roeder y Yanofsky, 2006). Las valvas corresponden a la pared de los carpelos, delimitado por una fila de células longitudinales muy pequeñas denominadas el margen de valva, que une las valvas al replum (Figura 1.1B) (Seymour *et al.*, 2013). La valva está constituida por 6 capas celulares. La más externa o exocarpo está formada por células alargadas con estomas. En el interior se encuentra el mesocarpo, constituido por 3 capas celulares de tejido fotosintético con cloroplastos. Finalmente, en el interior de la valva se diferencia el endocarpo, conformado por dos capas celulares, el endocarpo *a*, constituido por células engrosadas que tras la maduración del fruto colapsan, y el endocarpo *b*, una capa de células que se lignifican en las fases finales del desarrollo del fruto (Figura 1.2.). Generalmente el ovario contiene alrededor de 50-70 óvulos en cuatro filas a lo largo del pistilo (Seymour *et al.*, 2013).



**Figura 1.2. Estructura de la valva.** Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las 6 capas celulares que constituyen la valva o pared del ovario. La epidermis externa o exocarpo (ex), tres capas celulares, el mesocarpo (me), y dos capas internas, el endocarpo *b* (en *b*) y el endocarpo *a* (en *a*). Adaptado de Dorcey *et al.* (2009).

La germinación del grano del polen ocurre en las papilas estigmáticas situadas en la parte superior del ovario. Después de la germinación, el tubo polínico crece a través del tracto de transmisión y entra en los óvulos a través del micrópilo.

Dada la posición del estigma y la orientación vertical de las 4 filas de óvulos, se requiere un progresivo crecimiento del tubo polínico para recorrer todo el ovario desde el estigma a la base y poder así fecundar todos los óvulos. Tras la fecundación, las células del ovario se dividen y se expanden. El tamaño final que adquiere el fruto está determinado por el número total de semillas (Smith y Koltunow, 1999; Ozga *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2006).

La diferenciación de tejidos requerida para la dehiscencia del fruto es uno de los principales procesos de desarrollo que ocurre en el fruto, y ha sido ampliamente estudiado (Ferrandiz, 2002; Roeder y Yanofsky, 2006; Ostergaard, 2009). Al alcanzar la madurez los márgenes de la valva se convierten en zonas de dehiscencia conformados por dos tipos celulares, la capa de separación, en la que se secretan enzimas hidrolíticas para romper la unión entre células, y la capa lignificada, que en conjunto con el endocarpo *b* cuando se lignifica, crean las tensiones mecánicas que facilitan la apertura de las silicuas.

## **1.2. La formación y desarrollo del fruto es un proceso coordinado y regulado por hormonas**

La fructificación puede ser definida como la activación de un programa coordinado de desarrollo, en el que un pistilo cambia su patrón de desarrollo que finaliza en su senescencia, por el programa de desarrollo de un fruto (Gillaspy *et al.*, 1993; Dorsey *et al.*, 2009; Alabadí *et al.*, 2009). La señal de activación del programa de desarrollo del fruto se origina por la fecundación de los óvulos (Vercher y Carbonell, 1991; Granell *et al.*, 1992; Smith y Koltunow, 1999; Seymour *et al.*, 2013). Es en las semillas en desarrollo donde se sintetizan las hormonas que promueven el crecimiento y desarrollo del fruto (Eeuwens y Schwabe, 1975; Sponsel, 1983; Talón *et al.*, 1990a; García-Martínez *et al.*, 1991a; Ben-Cheikh *et al.*, 1997; Rodrigo *et al.*, 1997; Smith y Koltunow, 1999). Sin embargo, la existencia de frutos partenocárpicos indica que la fecundación de los óvulos no es un requerimiento estrictamente necesario para el desarrollo del fruto, siendo posible desacoplar la formación del fruto con la formación de semillas (Alabadí *et al.*, 2009). De hecho, tratamientos exógenos con auxinas o giberelinas (GAs) en pistilos no polinizados promueven la iniciación del fruto,

probablemente porque simulan los niveles hormonales producidos en el óvulo tras la fecundación (Gillaspy *et al.*, 1993).

Se considera que las auxinas y GAs son las hormonas principales en conformar la señal instructiva que promueve el programa de fructificación (García-Martínez y Carbonell, 1980; Gillaspy *et al.*, 1993; Ozga y Reinecke, 1999; Smith y Koltunow, 1999; Alabadí *et al.*, 2009; Seymour *et al.*, 2013). Numerosos datos apoyan la función clave de estas hormonas en la fructificación, entre los que destacan:

*1) La partenocarpia inducida por tratamientos exógenos con auxinas y GAs.*

Tratamientos exógenos con GAs y auxinas promueven la fructificación en una amplia variedad de especies tales como, tomate, guisante, *Arabidopsis*, pera y uva, probablemente por la simulación del efecto de las GAs que son producidas en condiciones normales tras la polinización y fecundación de los óvulos (Gustafson *et al.*, 1936; García-Martínez *et al.*, 1980; Jung *et al.*, 2014).

*2) La presencia de altos niveles de GAs y expresión de genes de su síntesis en especies naturalmente partenocárpicas.*

El contenido de GAs en especies consideradas naturalmente partenocárpicas es elevado. En cítricos, la variedad partenocárpica *Satsuma* presenta niveles de GAs muy elevados comparada con la variedad no partenocárpica *Clementine*, sugiriendo que los niveles endógenos de GAs en ovarios en desarrollo es el factor limitante controlando el desarrollo partenocárpico (Talón *et al.*, 1992). En tomate los mutantes partenocárpicos *pat2* y *pat3/pat4* exhiben un aumento en la expresión de genes de biosíntesis de GAs y un elevado nivel de GAs activas (Fos *et al.*, 2000, Fos *et al.*, 2001).

*3) La partenocarpia inducida debido a la biosíntesis específica de auxinas en el ovario.*

La inhibición del transporte polar de auxinas en pepino con la aplicación de cloroflurenol o NPA (N-1-naphthylphthalamic acid) induce partenocarpia, debido probablemente a que se bloquea la movilidad de la auxina fuera del ovario, generando una acumulación suficiente para establecer la iniciación del fruto y

activar la división celular en ausencia de polinización (Robinson *et al.*, 1971; Gillaspay *et al.*, 1993; Dorcey *et al.*, 2009).

*4) La correlación existente entre los niveles de auxinas y GAs y el inicio de la fructificación.*

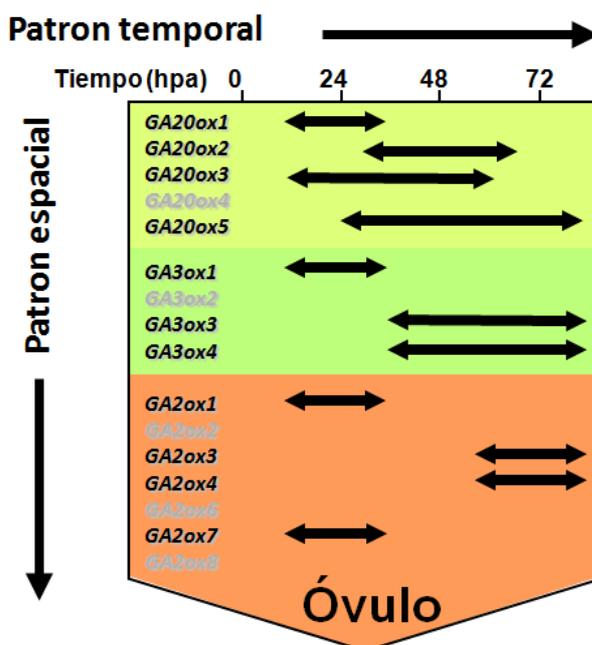
En *Arabidopsis* no se observa acumulación de auxinas en los óvulos antes o después de la antesis si no ocurre polinización, mientras que inmediatamente después de la polinización se observa una elevada acumulación de auxinas, así como aumento de la respuesta (Aloni *et al.*, 2006; Dorcey *et al.*, 2009). De igual forma las concentraciones de GAs bioactivas GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> en frutos con semillas en cítricos incrementan sustancialmente tras la polinización (Ben-Cheikh *et al.*, 1997). En guisante, la expresión de un gen de biosíntesis de GAs *GA20ox* se incrementa después de la polinización en las vainas y en los óvulos que han sido fecundados (García-Martínez *et al.*, 1997). Por otra parte se ha observado que la extracción mecánica de los óvulos tan pronto ocurre la polinización en guisante inhibe la diferenciación del fruto (García-Martínez *et al.*, 1991b), probablemente al impedir la síntesis de GAs en las semillas (García-Martínez *et al.*, 1997, García-Martínez *et al.*, 1991a).

*5) La partenocarpia inducida por la desregulación de la señalización hormonal.*

En tomate, el silenciamiento o la pérdida de función del gen *SIGA1*, que codifica la proteína DELLA de señalización de GAs, provoca partenocarpia facultativa (Martí *et al.*, 2007; Carrera *et al.*, 2012). De igual forma, la pérdida de función de 4 de las 5 proteínas DELLA en *Arabidopsis* genera frutos partenocárpicos (Dorcey *et al.*, 2009; Fuentes *et al.*, 2012). Por otra parte, el silenciamiento del gen *IAA9* un regulador negativo de la ruta de señalización de auxinas, o la pérdida de función del gen *ARF8*, un regulador de los genes de respuesta a auxinas, genera frutos partenocárpicos en tomate (Wang *et al.*, 2005; Goetz *et al.*, 2006).

Todos estos resultados ponen en evidencia que tanto las GAs como las auxinas regulan la formación del fruto y que la interacción entre sus rutas de señalización determina la fructificación. Uno de los antecedentes más relevantes para esta tesis ha sido el estudio de la interacción entre auxinas y GAs durante la

fructificación realizado por Dorcey *et al.* (2009). En este trabajo se observó que la respuesta a las auxinas aumenta en el óvulo tan pronto sucede la polinización, así como en respuesta a tratamientos con auxinas o NPA, pero no tras tratamientos con GAs. Esto indica que la activación de la diferenciación del pistilo es el resultado de una interacción jerarquizada entre auxinas y GAs, estando las GAs probablemente aguas abajo de las auxinas. También se observó que, posterior al tratamiento con auxinas o tras la polinización, se produce un aumento de la expresión de genes de biosíntesis de GAs específicamente en el óvulo y no en la valva (Figura 1.3) y una degradación de la proteína DELLA RGA tanto en óvulos como en valvas, lo que sugiere que las GAs sintetizadas en el óvulo han de transportarse a la valva para ejercer su función. Por último otros trabajos del grupo (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2010) sugerían que un óvulo funcional es esencial en la señalización de GAs durante la fructificación, confirmando el rol instructivo específico de las GAs en el óvulo.



**Figura 1.3. Patrón temporal de expresión de los genes de biosíntesis y catabolismo de GAs en semillas de *Arabidopsis* tras la fecundación.** Se representa los perfiles de expresión de los genes de biosíntesis (amarillo y verde) y catabolismo (naranja) de GAs durante las primeras 72 hpa. En negrita y gris se indican los genes que se expresan y los genes que no se expresan, respectivamente, mientras que las flechas indican el tiempo durante el cual cada gen aumenta temporalmente su expresión. hpa, horas post antesis. Adaptado de Dorcey *et al.* (2009).

### 1.3. Las GAs, biosíntesis y señalización durante el desarrollo

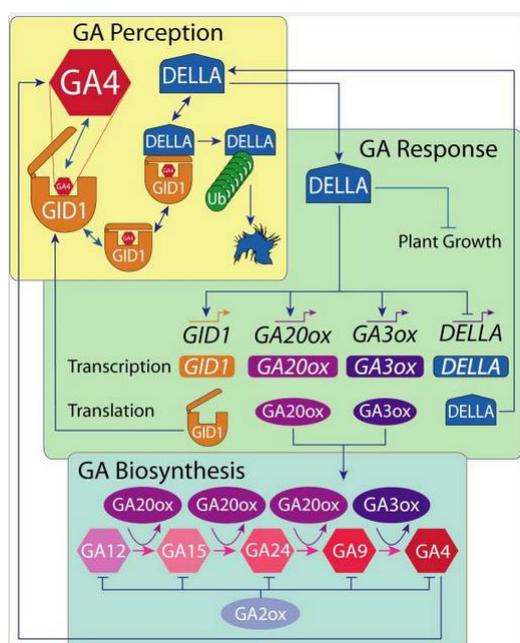
Las GAs son reguladores de crecimiento que controlan un amplio rango de procesos a través de todo el ciclo de desarrollo de la planta, incluyendo la germinación, la expansión de las hojas, y la elongación de los tallos y las raíces. En fases reproductivas esta hormona está involucrada en el tiempo de floración y en el desarrollo floral y del fruto (Fleet y Sun, 2005; Achard *et al.*, 2009).

La GAs bioactivas incluyen a la GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> (Yamaguchi, 2008). La biosíntesis de GAs puede ser resumida en tres etapas: 1) la biosíntesis de ent-kaureno en los protoplastos; 2) la conversión de ent-kaureno a GA<sub>12</sub> via citocromo P450 monoxigenasa; y 3) la formación de GAs intermediarias (GA<sub>19</sub> y GA<sub>20</sub>) y bioactivas (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>) a partir de GA<sub>12</sub> en el citoplasma, a través de una serie de pasos de oxidación catalizados por las enzimas GA20-oxidasa (GA20ox) y GA3-oxidasa (GA3ox) (Olszewski *et al.*, 2002). La mayor parte de los estudios para inferir los niveles de GAs en un tejido se han basado en el análisis de los perfiles de expresión de los genes que codifican las enzimas de su biosíntesis. Ello es debido a la complejidad de hacer medidas directas de GAs, especialmente en muestras diseccionadas para conocer cambios en tejidos u órganos concretos. La expresión de estos genes se asocia con tejidos en crecimiento. Por tanto, conocer los sitios de expresión es relevante para conocer dónde tiene lugar la biosíntesis y cómo esta se regula por señales endógenas y externas (Olszewski *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2008).

En la última década, estudios genéticos y moleculares han identificado los componentes negativos y positivos que participan en la ruta de señalización por GAs (Sun y Gubler, 2004; Hartweck y Olszewski, 2006; Daviere y Achard, 2013). En general, los tres mayores componentes en la señalización por GAs son los receptores GID1, las proteínas represoras DELLA y las proteínas F-box que controlan la degradación de las proteínas DELLA. Varios estudios indican que la ruta de señalización por GAs canaliza cambios en la actividad transcripcional de la célula en respuesta a las GAs (Locascio *et al.*, 2013) mediante un modelo que actúa como "inhibidor de un inhibidor" (Harberd *et al.*, 2009; Daviere y Achard, 2013). Así, las GAs participarían en el control de los procesos de desarrollo

modulando la estabilidad de las proteínas DELLA, que regulan la actividad de un grupo de factores transcripcionales (FTs), ocasionando rápidos cambios en la expresión génica (Locascio *et al.*, 2013). Los análisis genéticos de mutantes deficientes, insensibles a GAs y con actividad constitutiva a la hormona apoyan este modelo (Daviere y Achard, 2013).

De modo resumido, el modelo de señalización por GAs y el mecanismo de retroalimentación de la cadena de señalización, se puede acotar en tres grandes módulos (Middleton *et al.*, 2012) (Figura 1.4).



**Figura 1.4. La cadena de señalización por GAs y su mecanismo de retroalimentación.** Esquema que representa los tres grandes módulos de la cadena de señalización por GAs: Biosíntesis, Percepción y Respuesta. Adaptado de Middleton *et al.* (2012).

**1) Biosíntesis:** La conversión de formas inactivas o precursoras de GAs a formas bioactivas a través de las enzimas GA20ox y GA3ox en sitios y momentos en los que la hormona es necesaria para regular los procesos de crecimiento y desarrollo.

**2) Percepción:** Unión del receptor GID1 a la hormona, que genera un cambio conformacional en GID1 que posibilita que se una a las proteínas DELLA, desencadenando la señalización.

**3) Respuesta:** Las proteínas DELLA son represores de la respuesta a GAs y median la transcripción de genes diana (responsables en último lugar de los cambios promovidos por las GAs) a través de la interacción con diferentes proteínas, principalmente FTs. Las proteínas DELLA, tras la unión de la GA al receptor GID1, son etiquetadas con ubiquitina y degradadas por el proteosoma 26S, desbloqueándose la respuesta.

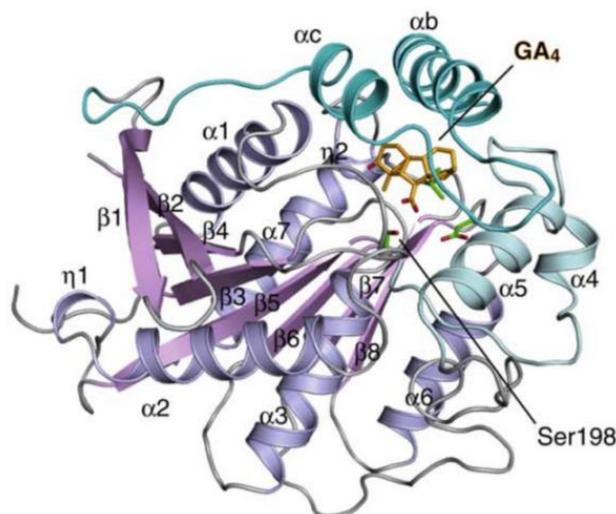
Además, se conoce un sistema altamente complejo de retroalimentación de la señalización por GAs, mediado por las proteínas DELLA, que regulan no solo su propia transcripción, sino la de genes de biosíntesis y receptores GID1.

A continuación se describe con mayor detalle las características de los principales componentes de la ruta de señalización por GAs.

### 1.3.1. GID1 es el receptor de GAs

La GA es percibida por el receptor soluble GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1), identificado inicialmente en arroz (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). El receptor se localiza en citoplasma y preferencialmente en núcleo (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Sun, 2011). En *Arabidopsis* hay tres genes *GID1s* (*GID1A*, *GID1B*, *GID1C*) (Nakajima *et al.*, 2006). El mutante nulo de *gid1* en arroz y el mutante de pérdida de función de los 3 genes en *Arabidopsis* muestran fenotipos enanos y extremadamente insensibles a GAs (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2006; Willige *et al.*, 2007). Se ha observado en ensayos *in vitro* que los GID1 se unen con alta afinidad solamente a las GAs bioactivas (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005).

Estructuralmente, GID1 es una proteína monomérica que contiene una cubierta N-terminal extendida que es flexible que consiste en dominio carboxi terminal  $\alpha/\beta$ . La cavidad que se extiende bajo la cubierta corresponde con el sitio de sustrato de unión HSL (Hormone Sensitive Lipasa), en la que es retenida la GA bioactiva (Murase *et al.*, 2008; Shimada *et al.*, 2008) (Figura 1.5). La GA se mantiene en esta cavidad por encima de la Ser198 conformando fuertes enlaces de hidrógeno con el grupo carboxilo de la posición C6 de unión de la hormona, indicando que esta serina es esencial para la unión a GA (Shimada *et al.*, 2008).



**Figura 1.5. Arquitectura del complejo GA-GID1.** Se representa en color lila la zona HSL (Hormone Sensitive Lipasa) en la que la GA se une a GID1 y las 4 hélices en la región N-terminal en azul. Adaptado de Ueguchi-Tanaka y Matsuoka (2010).

Los análisis indican que *GID1A* y *GID1C* son filogenéticamente cercanos, mientras que *GID1B* es el más divergente (Voegelé *et al.*, 2011). Además se ha observado en ensayos de doble híbrido que, al contrario de *GID1A* y *GID1C*, la proteína *GID1B* puede interactuar con las proteínas DELLA de forma independiente de GAs (Nakajima *et al.*, 2006). Esto es debido a que *GID1B* carece de un residuo de prolina en la región N-Ex (Sun, 2011), lo que provoca un cambio en la conformación de dicha región que causa el plegamiento del extremo flexible produciendo el cierre parcial de la cavidad sin necesidad de la presencia de GAs (Yamamoto *et al.*, 2010), quedando expuesta la superficie de contacto para interactuar con el dominio DELLA. Ensayos *in vitro* han demostrado que *GID1B* presenta también una afinidad superior a GAs que la exhibida por las otras formas *GID1* (Nakajima *et al.*, 2006).

En definitiva, los receptores *GID1* activan la ruta de señalización de GAs mediante la formación del complejo GA-*GID1* que media la rápida degradación del represor de crecimiento, las proteínas DELLA (Sun, 2011).

### 1.3.2. DELLA es el regulador negativo en la señalización por GAs

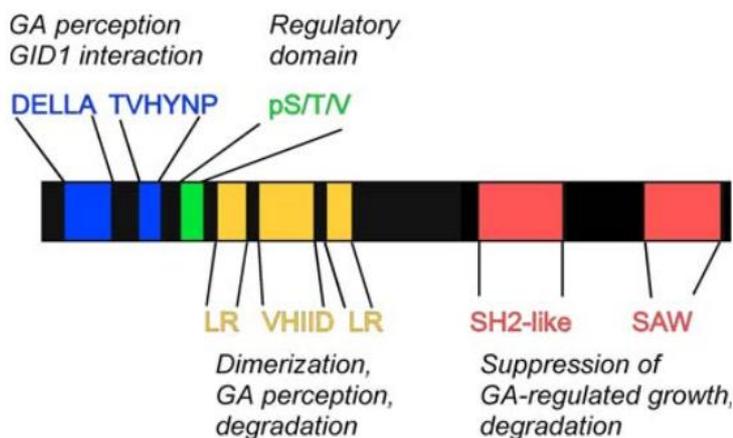
Las proteínas DELLA son reguladores transcripcionales ubicados en el núcleo donde actúan como represores de la ruta de señalización por GAs. A nivel molecular regulan transcripcionalmente los genes dianas de las GAs que son, en último término los responsables de promover el crecimiento y el desarrollo en plantas (Thomas y Sun, 2004; Griffiths *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2006; Sun, 2011). En *Arabidopsis* hay cinco miembros en la familia génica DELLA: REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA), GA-INSENSITIVE (GAI), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 y RGL3.

Las proteínas DELLA pertenecen a un subgrupo de la familia GRAS específicas de plantas (Sun, 2011). En la región N-terminal se encuentran los dominios DELLA y TVHYNP requeridos para la interacción con el complejo GA-GID1 (Hartweck, 2008; Sun, 2010; Daviere y Achard, 2013). El dominio N-terminal de la proteína DELLA juega un papel regulatorio en la función de la estabilidad de la proteína (Sun y Gubler, 2004; Locascio *et al.*, 2013), conteniendo regiones Ser/Thr/Val que pueden ser modificadas por fosforilación o glucosilación (Figura 1.6). Deleciones o sustituciones de aminoácidos dentro de este dominio conservado de DELLA (por ejemplo en los mutantes *gai-1* y *rgaΔ17*) dan lugar a proteínas mutantes resistentes a la degradación, confiriendo insensibilidad a GAs. La región rica en leucina (LR) y el dominio VHIID son importantes tanto para la percepción como para la degradación (Itoh *et al.*, 2002; Sun, 2010). El dominio C-terminal se denomina GRAS, el cual tiene dos subunidades SH2-like y SAW que le confiere a la proteína su función como regulador transcripcional (Hartweck, 2008) (Figura 1.6).

### 1.3.3. SLY es el regulador positivo la ruta de señalización por GAs

Estudios genéticos han determinado que la proteína F-box SLEEPY (SLY1) en *Arabidopsis* y GID2 en arroz, son los reguladores positivos en la señalización por GAs. Estas proteínas forman parte del complejo SCF<sup>SLY1/GID2</sup> E3 ubiquitina ligasa, responsables de la poliubiquitinación y posterior degradación mediada por GAs de las proteínas DELLA. Los mutantes *sly1* y *gid2* muestran un fenotipo

extremo de no respuesta a GAs y acumulan grandes niveles de las proteínas RGA Y SLR1 (McGinnis *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004). SLY1 interactúa físicamente con las proteínas DELLA y promueve la degradación de éstas por el proteosoma 26S.

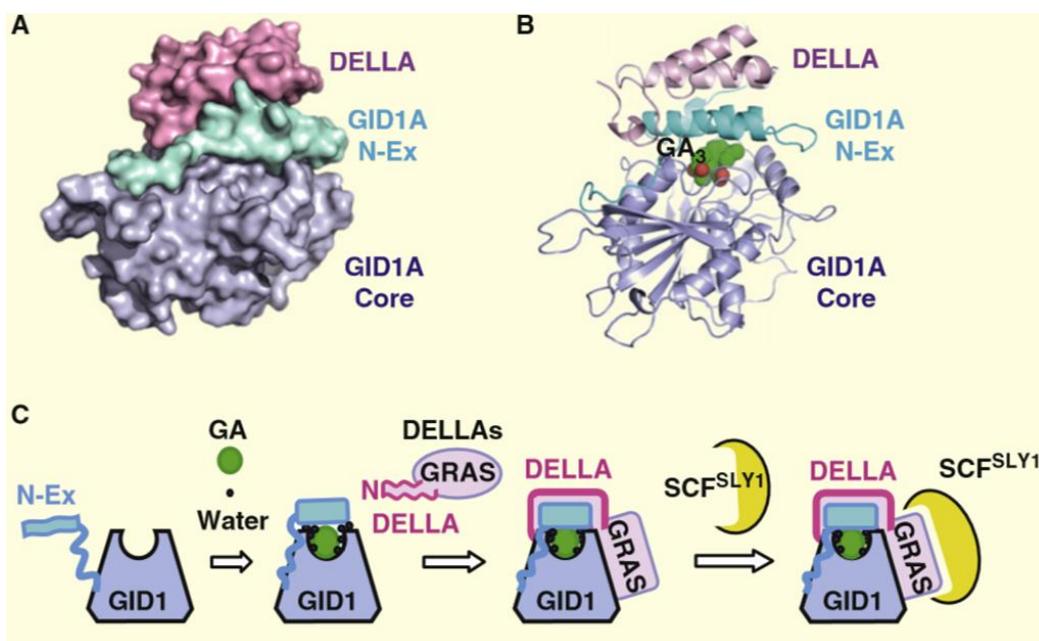


**Figura 1.6. Estructura de DELLA.** La función de cada dominio está escrita en cursiva. DELLA, TVHYNP, poli serina/treonina/valina (pS/T/V), repeticiones de leucina (LR), y VHIID. SH2 y SAW son los subdominios del dominio GRAS. Adaptado de Hartweck (2008).

### 1.3.4. Formación del complejo GA-GID1-DELLA

Numerosos estudios genéticos, bioquímicos y estructurales han permitido conocer en detalle el mecanismo molecular de la señalización de GAs (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007; Sun, 2010; Ariizumi *et al.*, 2011). La determinación de la estructura del complejo GA-GID1-DELLA por cristalografía de rayos X (Murase *et al.*, 2008; Shimada *et al.*, 2008) ha revelado que GID1 se une a la hormona mediante el grupo C6 carboxilo y C3 hidroxilo de la molécula de GA, induciendo un cambio conformacional en la extensión flexible N-terminal del receptor, lo que provoca un plegamiento de la extensión cubriendo así la cavidad en la que se encuentra contenida la GA. Una vez encapsulada la hormona, la superficie hidrofóbica de la extensión N-terminal queda expuesta siendo posible la unión del complejo GA-GID1 a la DELLA. Si bien no hay un contacto directo entre las GAs y DELLA, la unión a DELLA estabiliza el complejo GA-GID1-DELLA. El dominio N-terminal DELLA es esencial para su degradación, aunque este dominio no interactúa con la proteína F-box. Por el contrario, GID1 interactúa directamente con el dominio conservado DELLA y la región TVHYNP

dentro del dominio N-terminal, de un modo dependiente de GAs. La interacción entre DELLA-GID1 genera un cambio conformacional en la proteína DELLA que mejora el reconocimiento por parte de la proteína F-box al dominio GRAS (Daviere y Achard, 2013). Al formarse el complejo GA-GID1-DELLA, la DELLA es reclutada por el complejo  $SCF^{SLY1/GID2}$  ubiquitina E3 ligasa para su poliubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S (Sun, 2011) (Figura 1.7).



**Figura 1.7. Estructura y formación del complejo GA-GID1-DELLA.** A-B. Diagrama de cristalografía de rayos X de la arquitectura del complejo GA-GID1-DELLA. C. Esquema secuencial de la formación del complejo. El receptor GID1 percibe la hormona y se une a ella, lo que provoca un cambio conformacional en el extremo N-terminal que se pliega sobre sí mismo encapsulando la hormona. El dominio DELLA se une a la superficie del extremo flexible (N-Ex) produciendo un cambio conformacional en la proteína, incrementado el reconocimiento del complejo  $SCF^{SLY1}$ , promoviendo así su poliubiquitinación y degradación. Adaptado de Sun (2011).

## 1.4. La señalización por GAs en procesos de desarrollo

### 1.4.1. Los receptores GID1

La presencia de 3 receptores GID1 en *Arabidopsis* sugiere que cada receptor cumple con una función distinta durante el desarrollo de la planta. Sin embargo, los mutantes nulos de cada receptor no exhiben fenotipos significativos y solamente los mutantes dobles muestran una deficiencia parcial a

GAs; el mutante *gid1a-1 gid1c-1* es parcialmente enano y el mutante *gid1a-1 gid1b-1* muestra acortamiento en los filamentos de la anteras y fertilidad reducida (Nakajima *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2006; Iuchi *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009). Por su parte el mutante nulo de los tres genes deriva en un fenotipo muy enano, infértil y altamente insensible a GAs, defectos más extremos que los mostrados en el mutante deficiente en GAs *ga1-3* (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2006; Iuchi *et al.*, 2007).

Estos fenotipos alterados sugieren que, a pesar de existir cierta redundancia funcional, los receptores GID1 podrían tener funciones específicas en el crecimiento y desarrollo (Griffiths *et al.*, 2006), ya que existen distintos niveles de expresión de los transcritos *GID1* en diversos tejidos y etapas de desarrollo (Griffiths *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2006). Además se han descrito distintos grados de afinidad entre las proteínas GID1 y DELLA en ensayos *in vitro* (Suzuki *et al.*, 2009). Por tanto, los fenotipos de los dobles mutantes *gid1* serían el resultado tanto de la abundancia de cada receptor en el tejido como de su preferencia por las diferentes proteínas DELLA presentes (Griffiths *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2009).

La función de los receptores GID1 ha sido estudiada en la germinación (Iuchi *et al.*, 2007; Voegelé *et al.*, 2011) y elongación del tallo (Suzuki *et al.*, 2009). En ambos procesos GID1A y GID1C juegan un rol predominante, mientras que GID1B parece no estar involucrado o tener una función menor. De esta forma, se desconoce cuál es la función específica de cada uno de los receptores en el desarrollo del fruto en *Arabidopsis*, en función de su distribución espacio-temporal.

#### **1.4.2. Reguladores transcripcionales DELLA**

El análisis de los mutantes nullos simples o combinados de cada uno de los genes de la familia DELLA revela que existe tanto funciones específicas de estos genes como redundancia o solapamiento en diferentes procesos del desarrollo de la planta.

GAI y RGA son las proteínas DELLA que controlan mayoritariamente la expansión celular, el crecimiento vegetativo, y el desarrollo del hipocotilo, el tallo y la raíz (Tyler *et al.*, 2004). Por su parte, se ha observado que RGL2 regula la germinación bajo ciertas condiciones (Stamm *et al.*, 2012). Recientemente ha sido reportado que RGL3 actúa como regulador positivo en las respuestas de defensa modulado por ácido jasmónico (Wild y Achard, 2013).

Algunos estudios han sugerido que RGA, RGL1 y RGL2 son las proteínas DELLA involucradas en floración y desarrollo del fruto, pero estas conclusiones pueden no ser del todo acertadas debido a la doble función que desempeñan las GAs en la fertilidad por factores paternos. Se sabe que existe un efecto aditivo de los mutantes *rga*, *rgl1* y *rgl2* en restaurar el desarrollo del estambre en un fondo mutante *gai-3*. Sin embargo no existen experimentos que lleguen a distinguir la función específica de estos genes en la fertilidad materna (Cheng *et al.*, 2004; Tyler *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004).

Experimentos como el de Dorcey *et al.* (2009) o Fuentes *et al.* (2012) indican que en los mutantes simples nulos de DELLA (*gaiT6*, *rga24*, *rgl1-1*, *rgl2-1*) o en los mutantes dobles nulos de DELLA (*gaiT6 rga24*, *gaiT6 rgl1-1*, ó *rga24 rgl2-1*) no se exhibe ninguna anomalía en el fenotipo del pistilo ni en el crecimiento del fruto, sin embargo el cuádruple mutante nulo de DELLA (*4xdella*) (*gaiT6 rga24 rgl1-1 rgl2-1*) muestra una partenocarpia constitutiva. Por su parte RGL3 no presenta ningún rol evidente en el desarrollo del fruto. Esto indica que las proteínas DELLA, con excepción de RGL3, presentan redundancia funcional en el control del desarrollo del fruto en *Arabidopsis*, pero no se conoce su función específica en cada tejido que compone el fruto. Es de esperar que cada gen tenga una expresión específica en el pistilo y fruto que probablemente reflejen funciones específicas en la regulación por GAs de la diferenciación y desarrollo de óvulos y valvas. Dependiendo de su contexto molecular, determinado por el tipo celular y el tejido donde se expresan, las proteínas DELLA podrán regular la actividad de diferentes interactores que dan especificidad a la función en cada tejido. Por otro lado, las diferentes proteínas DELLA podrían interactuar con elementos comunes, así como expresarse en el mismo tejido, confirmando todas estas posibilidades una fuerte plasticidad a la señalización por GAs,

multiplicando los puntos de regulación y la integración con otros procesos de desarrollo o diversos estímulos bióticos o abióticos.

## **1.5. Mecanismo molecular por el cual DELLA regula el crecimiento**

### **1.5.1. Interacción proteína-proteína de las proteínas DELLA con FTs**

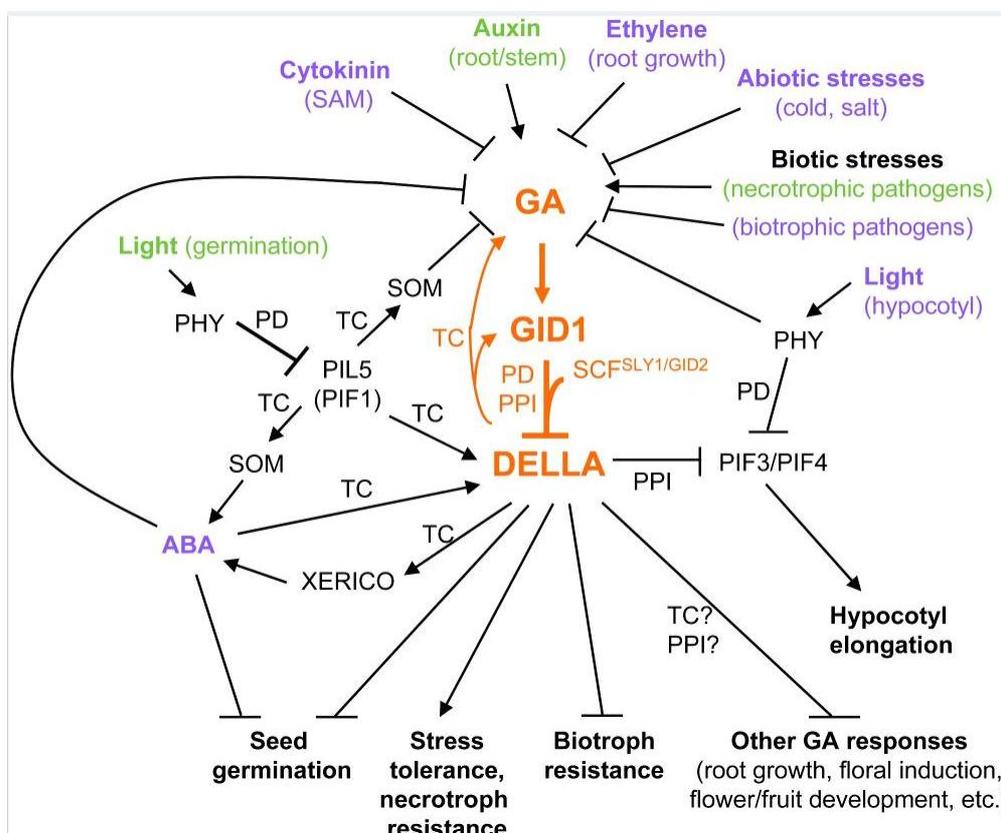
Las DELLA son proteínas nucleares que carecen de la capacidad para acoplarse directamente con el DNA y regular la transcripción. La regulación de la expresión de los genes diana de GAs se produce a través de la interacción de la DELLA con otros FTs (Sun, 201; Vera-Sirera *et al.*, 2014). Se sabe que las proteínas DELLA se unen a otras proteínas como PIF4, BZR1 o JAZ1 por medio del dominio GRAS (Arnaud *et al.*, 2010; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2012; Hauvermale *et al.*, 2012).

Los mecanismos que permiten a la DELLA controlar la expresión de genes se pueden diferenciar en función del tipo de interacción que se produce con su pareja, diferenciándose en dos grupos principales: 1) Las proteínas DELLA actúan como un secuestrador de FTs interfiriendo con su actividad, o 2) cooperan con los FTs para trabajar como un trans-activador y modular la unión a los promotores de los genes diana (Daviere y Achard, 2013). Aunque se han realizado avances significativos para conocer los componentes en la red genética reguladora que está directamente aguas abajo de las proteínas DELLA (Figura 1.8), aún continua siendo un área inexplorada para muchos procesos fisiológicos, entre ellos la fructificación.

Uno de los avances más relevantes que han permitido conocer cómo las GAs y las proteínas DELLA regulan el crecimiento y desarrollo ha sido la caracterización de la interacción entre las rutas de señalización por GAs y luz para mediar el crecimiento en plántulas de *Arabidopsis*. Es así como se identificaron los FTs de la familia PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) como proteínas que interactúan físicamente con DELLA para modular la transcripción de genes asociados a GAs en respuesta al estímulo de la luz (Achard *et al.*, 2009). Los PIFs son FTs de tipo Helix-Loop-Helix (bHLH) implicados en reprimir la germinación y

promover el crecimiento de las plántulas en oscuridad. Es así como durante la desetiología el fitocromo inhibe la elongación del hipocotilo a través de la degradación de los PIF y una inhibición en la acumulación de GAs y el consiguiente incremento en los niveles de las proteínas DELLA (Achard *et al.*, 2009; Leivar y Quail, 2010).

Las proteínas DELLA inhiben la elongación del hipocotilo por su interacción directa con PIF3 y PIF4 previniendo la expresión de los genes diana de PIF3/PIF4. Según el modelo actual, a bajas concentraciones de GAs la interacción física con DELLA es estable para algunos miembros de la familia PIF (PIF1/PIL5, PIF3, y PIF4), interfiriendo en su actividad transcripcional (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). Por el contrario la presencia de GAs causa la degradación de las proteínas DELLA liberando las proteínas PIF y promoviendo su actividad.



**Figura 1.8. Interacción de las proteínas DELLA con diferentes interactores para regular diversas respuestas a GAs.** Se presentan vías de activación o inhibición a través de diferentes modos de acción. Las señales que promueven la acumulación y que reducen los niveles de GAs se muestran en verde y en púrpura, respectivamente. PPI (Interacción proteína-proteína), TC (Transcripción), SAM (Meristemo apical del tallo), PHY (Fitocromo). Adaptado de Sun (2010).

Otros ejemplos de la regulación en el crecimiento promovido por las proteínas DELLA en diferentes procesos de desarrollo han sido recientemente descritos. Durante la ontogenia del pistilo, GAI y RGA interactúan directamente con ALC, un factor transcripcional del tipo bHLH, bloqueando su función en la especificación del tejido necesario para la dehiscencia de la vaina y la dispersión de las semillas (Arnaud *et al.*, 2010). En presencia de GAs, la degradación de las proteínas DELLA mitiga dicha interacción permitiendo que ALC defina la zona de dehiscencia generando la capa de separación del margen de valva.

Experimentos de doble híbrido en levadura, empleando DELLA como cebo, han permitido conocer el solapamiento entre las rutas metabólicas de GAs y ácido jasmónico (JA) (Hou *et al.*, 2010). La proteína JAZ1, un represor de la señalización por JA, interactúa *in vivo* con GAI, RGA, RGL1 y RGL2. Esto previene la interacción inhibitoria entre JAZ1 con MYC2, un activador transcripcional clave en la respuesta a JA lo que permite a MYC2 regular la expresión de sus genes diana. A la inversa, las GAs promueven la degradación de las proteínas DELLA lo cual permite que JAZ1 se una a MYC2 y suprima su actividad (Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Daviere y Arnaud, 2013).

Se ha visto que los brasinoesteroides (BR) y las GAs promueven respuestas similares de desarrollo en plantas (Li *et al.*, 2012). Existe una interacción entre BZR1 y DELLA, uniéndose a BZR1/BES y bloqueando su habilidad para regular los genes diana de BR (Bai *et al.*, 2012; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Vera-Sirera *et al.*, 2014). Por otra parte BZR1 se une a PIF4 para promover la actividad de PIF (Oh *et al.*, 2007; Bernardo-García *et al.*, 2014), sugiriendo que los BRs y las GAs cumplen funciones similares en el control del crecimiento en respuesta a la luz.

### **1.5.2. DELLA regula la expresión de genes diana**

Las GAs integran muchos procesos de desarrollo y respuesta a estrés probablemente por la regulación de los procesos celulares básicos como la división celular y la expansión. Los genes que median las funciones de las GAs en el crecimiento celular y desarrollo han sido progresivamente determinados al

identificar las dianas de DELLA, principalmente mediante análisis transcriptómicos (Locascio *et al.*, 2013; Claeys *et al.*, 2014; Vera-Sirera *et al.*, 2014).

Se han identificado algunos genes de respuesta a GAs en germinación, en plántulas y durante la floración que son dianas de DELLA en *Arabidopsis*. En algunos de estos estudios se ha usado el mutante nulo *ga1-3* con un defecto en la ruta de biosíntesis de GAs y que por tanto acumula altos niveles de proteínas DELLA (Ogawa *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2006; Nemhauser *et al.*, 2006). Otros análisis utilizando el quintuple mutante nulo (*ga1-3 rga24 gaiT6 rgl1-1 rgl2-1*) han mostrado un amplio número de genes regulados por GAs que también eran dependientes de DELLA.

Estas aproximaciones han contribuido a identificar muchos genes que son regulados por GAs o por las proteínas DELLA, sin embargo en la mayor parte de estos estudios no se ha logrado distinguir entre dianas primarias y secundarias de DELLA (Locascio *et al.*, 2013). Los estudios que sí han logrado distinguir dianas primarias han sido los de Zentella *et al.* (2007) y Gallego-Bartolomé *et al.* (2011), al prestar especial atención a aquellos cambios que ocurren a tiempos cortos tras la inducción de la DELLA (Vera-Sirera *et al.*, 2014).

En el trabajo realizado por Zentella *et al.* (2007) utilizando un sistema que expresa *rgaΔ17* de forma inducible por dexametasona (Dex) se mostró que las proteínas DELLA ayudan al establecimiento de la homeostasis de GAs a través del mecanismo de retroalimentación regulando la expresión de los genes de biosíntesis de GAs y de los receptores GID1. DELLA también induce genes diana que codifican factores transcripcionales, tal es el caso de XERICO un factor transcripcional del tipo E3 ubiquitina ligasa importante en la acumulación del ácido abscísico (ABA). Estos datos ponen de manifiesto una interacción entre las rutas de señalización de GAs y el ABA, de tal forma que DELLA inhibe la respuesta en germinación en parte por una sobre-regulación en los niveles de ABA mediada por XERICO (Zentella *et al.*, 2007; Sun, 2010).

De igual forma, para la identificación de genes diana directa regulados por DELLA Gallego-Bartolomé *et al.* (2011) utilizó una línea transgénica que porta

una versión dominante de GAI (*gai-1*) que se induce por tratamientos con calor. En plántulas etioladas se identificaron varios genes que son dianas directas de GAI. La mitad de ellos son regulados por DELLA en parte a través de los PIF y HY5, que en gran medida son reguladores del proceso de escotomorfogénesis.

La identificación de dianas directas e interactores de las proteínas DELLA ha comenzado a revelar los mecanismos moleculares por los cuales las GAs modulan diferentes procesos de desarrollo y cómo las rutas de señalización de GAs se integran con otras rutas hormonales y endógenas para coordinar la plasticidad de la respuesta de la planta a diferentes estímulos.

## 2- Objetivos



El objetivo central de esta tesis es conocer los eventos moleculares por los cuales un pistilo se convierte en un fruto en desarrollo. Considerando la importancia que tienen las GAs en la formación y desarrollo del fruto, es necesario describir el mecanismo molecular por el cual las GAs median esta transición. Para ello, en primer lugar, es preciso conocer qué receptores GID1 y qué proteínas DELLA participan en la fructificación. En segundo lugar, es necesario analizar los cambios de expresión de los genes asociados a la actividad de las proteínas DELLA e identificar dianas de DELLA en las fases tempranas de desarrollo del fruto en *Arabidopsis*.

En base a estas premisas nuestros objetivos específicos son:

- 2.1. Saber qué receptores GID1 y proteínas DELLA están presentes en cada uno de los tejidos de los pistilos y frutos en desarrollo.
- 2.2. Establecer si la expresión de los GID1s está coordinada con la expresión de los genes de biosíntesis de GAs y de las proteínas DELLA para regular diferentes procesos de desarrollo durante las fases tempranas del fruto.
- 2.3. Determinar si los receptores GID1 tiene una función específica en los procesos de formación y desarrollo del fruto.
- 2.4. Definir los eventos transcriptómicos en las fases tempranas de formación del fruto.
- 2.5. Identificar dianas directas e indirectas de DELLA involucradas en la formación del fruto.



# **3- Resultados y Discusión**

## **Capítulo 1**

*Los receptores GID1 y las  
proteínas DELLA en el desarrollo  
temprano del fruto*



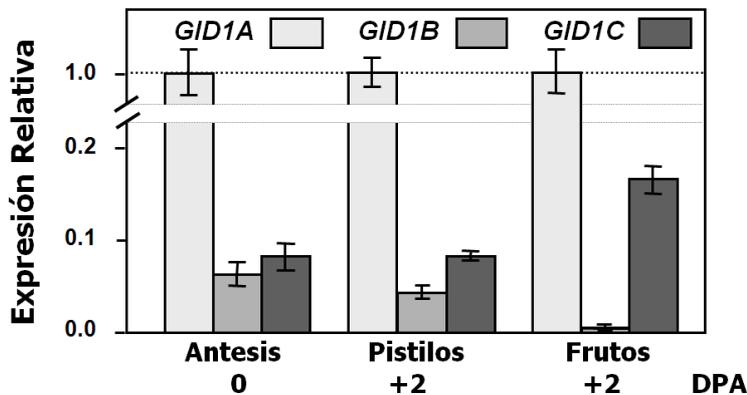
### 3.1. Los transcritos de los receptores *GID1* están diferencialmente expresados en pistilos y frutos

Las GAs promueven el correcto desarrollo del fruto y las semillas; sin embargo su función a nivel molecular en el desarrollo del ovario y semillas tras la fecundación es aún incierta (Gillaspy *et al.*, 1993; Alabadí *et al.*, 2009). La caracterización de los receptores *GID1* en los pistilos y frutos es un paso clave para comprender la ruta de señalización de GAs en un determinado proceso de desarrollo (Hatweck, 2008; Sun, 2011). En *Arabidopsis* se han descrito 3 proteínas *GID1*, designadas como *GID1A*, *GID1B* y *GID1C*, las cuales actúan aparentemente de manera redundante (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007). Conocer la implicación que tienen cada uno de los receptores *GID1* en el pistilo es crucial para comprender cómo las GAs regulan la formación y desarrollo del fruto en *Arabidopsis*. Para ello hemos realizado estudios de expresión génica de los *GID1* en el pistilo, mediante PCR a tiempo real (qPCR) e hibridación *in situ* de ARN mensajero (ARNm).

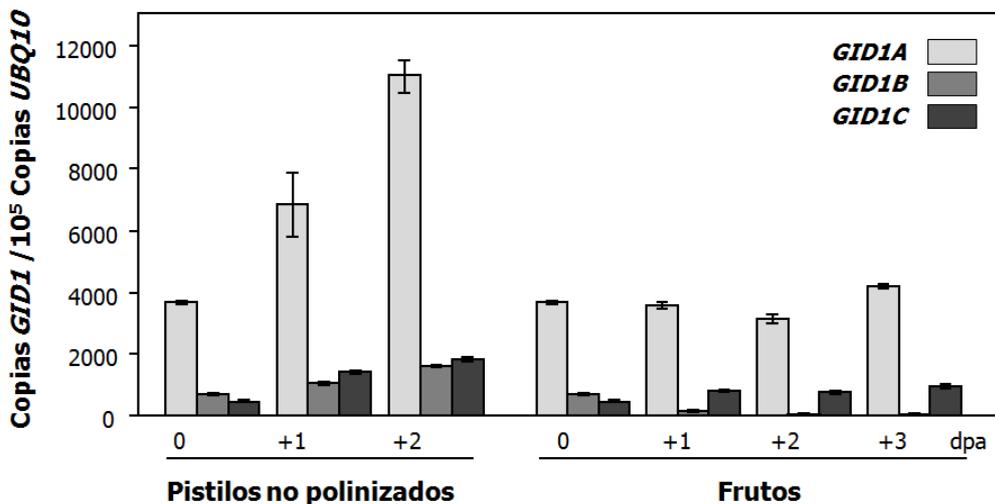
Para conocer qué genes *GID1* se expresan en pistilos y cuál es su expresión relativa se cuantificó el nivel relativo de expresión mediante qPCR, analizando la expresión en antesis, en frutos de 2 días post antesis (dpa), así como en pistilos no polinizados a 2 dpa como una vía de desarrollo alternativa del pistilo (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2010). Los ARNm de los tres genes *GID1* se detectaron tanto en pistilos no polinizados como en frutos, siendo *GID1A* el que se expresó a niveles más elevados, mientras *GID1B* y *GID1C* presentaron niveles de expresión más bajos pero similares (Figura 3.1). En cualquiera de las fases de desarrollo evaluadas la expresión conjunta de *GID1B* y *GID1C* correspondió con un 20% aproximadamente de la expresión total de los receptores.

Posteriormente se estudió la evolución temporal de la expresión de los tres genes durante el desarrollo de frutos y pistilos tras la antesis. En este caso la expresión se cuantificó como el número de copias de cada transcrito con respecto al número de copias del gen constitutivo *UBQ10* (Figura 3.2). Tras la polinización, la expresión de *GID1A* y *GID1C* en los frutos no muestra grandes cambios, mientras que la expresión de *GID1B* se reduce drásticamente. En

contraste, en ausencia de polinización la expresión de los tres genes aumenta significativamente. El aumento de la expresión de los *GID1* en pistilos no polinizadas puede ser debido al mecanismo de retroalimentación de la expresión causado por niveles bajos de GAs en ausencia de fecundación y desarrollo de semillas.



**Figura 3.1. Los tres receptores *GID1* se expresan en pistilos y frutos, siendo *GID1A* el gen con mayor expresión.** Expresión relativa de los tres receptores *GID1* en pistilos en antesis, en pistilos no polinizados de 2 dpa y en frutos de desarrollo temprano de 2 dpa. La expresión de *GID1B* y *GID1C* se ha normalizado con respecto a *GID1A* en las tres fases de desarrollo estudiadas. Este experimento es la media de tres réplicas biológicas realizadas. dpa, días post antesis.

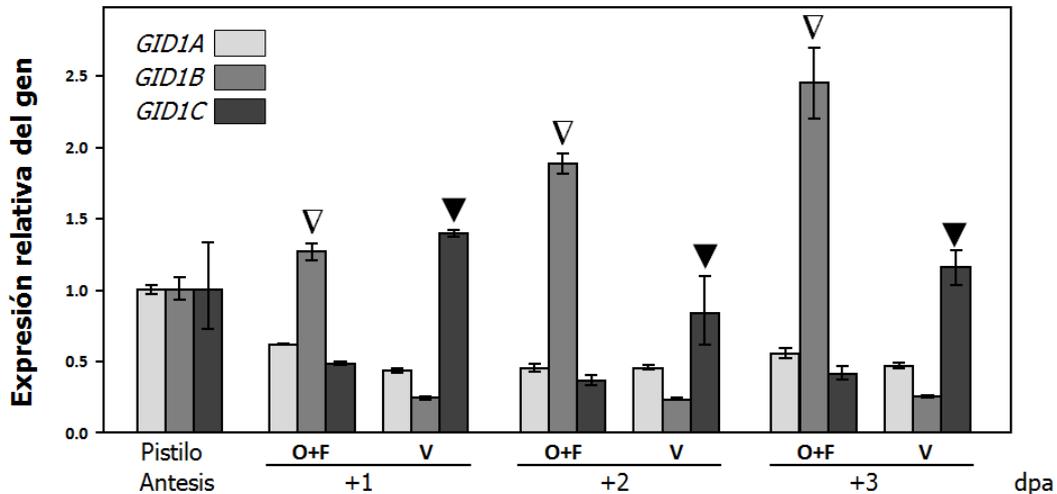


**Figura 3.2. Los genes *GID1* son diferencialmente expresados en pistilos y en frutos.** Expresión temporal de *GID1* en pistilos no polinizados y en frutos de desarrollo temprano. La expresión de cada gen se representa como el número de copias de cDNA por  $10^5$  copias de *UBQ10*. Cada experimento fue realizado con tres réplicas técnicas y se repitió tres veces siendo los resultados similares en todas las repeticiones. Los datos son la media  $\pm$  SD de un experimento representativo. dpa, días post antesis.

La síntesis de GAs y su señalización está bloqueada en el pistilo en ausencia de la señal para la formación del fruto derivada de la fecundación de los óvulos o de tratamientos hormonales. En los pistilos de flores emasculadas, los niveles de GAs no son lo suficientemente altos como para provocar el cuajado del fruto (Dorcey *et al.*, 2009). Esos bajos niveles de GAs en pistilos resultarían en una acumulación de las proteínas *DELLA*. Se ha descrito que las proteínas *DELLA* promueven la transcripción de los genes *GID1*, especialmente *GID1A* y *GID1B* (Griffiths *et al.*, 2006; Hartweck, 2008); por lo tanto el incremento en expresión de los genes *GID1* en pistilos puede responder a este mecanismo de regulación. Por otro lado, el incremento en la expresión de *GID1* en pistilos no polinizados podría resultar en un incremento de la sensibilidad del pistilo a las GAs. De ser esto cierto, los pistilos no polinizados de 2 dpa deberían ser más sensibles a GAs al tener mayor expresión de los *GID1*. Para comprobar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos donde se trataron pistilos no polinizados con GAs a diferentes concentraciones para determinar el efecto en la elongación del pistilo. Sin embargo los resultados no fueron concluyentes (datos no mostrados).

El fruto de *Arabidopsis* es una estructura compleja y especializada con diferentes órganos y tejidos, lo que hace necesario determinar si los transcritos *GID1* se expresan en zonas específicas del pistilo y de los frutos en la fase temprana de desarrollo. Para ello se realizó un análisis de qPCR de la expresión de los genes *GID1* en óvulo+funículo y valva por separado, mediante la disección manual de pistilos no polinizados de 1, 2 y 3 dpa, así como de pistilos enteros en antesis (Figura 3.3). Además se realizó un estudio del patrón de expresión espacial de *GID1A* y *GID1C* mediante hibridación *in situ*, en pistilos en antesis (Figura 3.4). Los resultados de los análisis de qPCR mostraron que *GID1A* se expresaba en todos los tejidos del pistilo aproximadamente a la misma proporción; sin embargo los transcritos de *GID1B* y *GID1C* se expresaban principalmente en el óvulo+funículo y en la valva, respectivamente (Figura 3.3). Es de destacar que la expresión de *GID1B* en óvulos se incrementaba significativamente tras la antesis. En las semillas en desarrollo se sintetizan altos niveles de GAs, lo que no ocurre en los óvulos de los pistilos no polinizados, lo que impide el desarrollo de fruto en ausencia de polinización (Smith y Koltunow, 1999; Cox y Swain, 2006; Dorcey

*et al.*, 2009; Arnaud *et al.*, 2010). Por ello, la alta transcripción del gen *GID1B* bajo estas condiciones, no solo sugiere la regulación que ejerce el mecanismo de retroalimentación negativa de GAs sobre *GID1B*, sino también la alta eficiencia que este receptor presenta al percibir las GAs bioactivas (Nakajima *et al.*, 2006) en el óvulo en el momento de la antesis, cuando debe producirse la fecundación y consiguiente síntesis de GAs (Dorcey *et al.*, 2009).



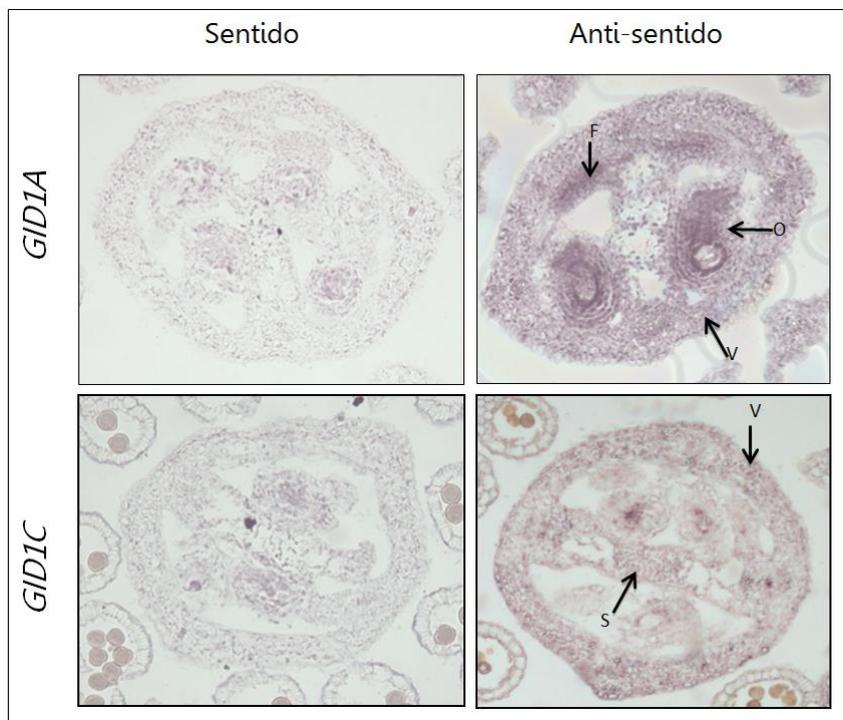
**Figura 3.3. Los genes *GID1* se expresan diferencialmente en los tejidos de los pistilos y frutos.** Expresión de *GID1* en óvulos + funículos (O+F) y en valvas (V) en pistilos no polinizados a 1, 2 y 3 dpa diseccionados manualmente. La expresión de cada gen fue normalizada a la expresión de la *UBQ10* y a la expresión en todo el pistilo en antesis. Los triángulos vacíos y llenos indican la expresión preferencial de *GID1B* en los óvulos y de *GID1C* en las valvas, respectivamente. El experimento se repitió tres veces, y cada uno de ellos fue realizado con tres réplicas técnicas, siendo los resultados similares para todas las repeticiones. Los datos son la media  $\pm$  SD de un experimento representativo. dpa, días post antesis.

Para comprobar de forma más precisa el patrón de expresión espacial de los *GID1* en las diferentes estructuras del pistilo se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* de los ARNm en antesis, aunque solo se obtuvieron datos válidos para *GID1A* y *GID1C* (Figura 3.4).

Se diseñaron sondas específicas de cada uno de los ARNm, situadas en zonas de la región codificante donde la similitud de secuencia entre los 3 genes fue baja, de modo que las sondas solo serían capaces de hibridar con cada uno de los genes correspondientes. Los resultados obtenidos indican que *GID1A* se expresa en casi todas las zonas del pistilo, con la excepción del septum, siendo su señal

intensa y homogénea en los funículos y en los óvulos (Figura 3.4). La señal del gen *GID1C*, aunque débil, se detectó en el septum, replum y en la valva, siendo esta última más intensa. En el caso de *GID1B* la señal fue muy débil, por lo que no se obtuvieron datos concluyentes que permitieran inferir zonas específicas de expresión del gen.

Finalmente, la expresión generalizada de *GID1A* en casi la totalidad de tejidos de los pistilos es coherente con su alto nivel de expresión analizado por qPCR.



**Figura 3.4. Expresión espacial de los genes *GID1A* y *GID1C* en pistilo.** Imágenes de hibridación *in situ* de cortes transversales de pistilos en antesis. *GID1A* se expresa intensamente en todas las zonas del pistilo con excepción del septum. La expresión de *GID1C* se detecta en valva y septum. dpa, días post antesis; V, valva; O, óvulo; F, funículo; S, septum. Todas las imágenes tienen la misma amplificación. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

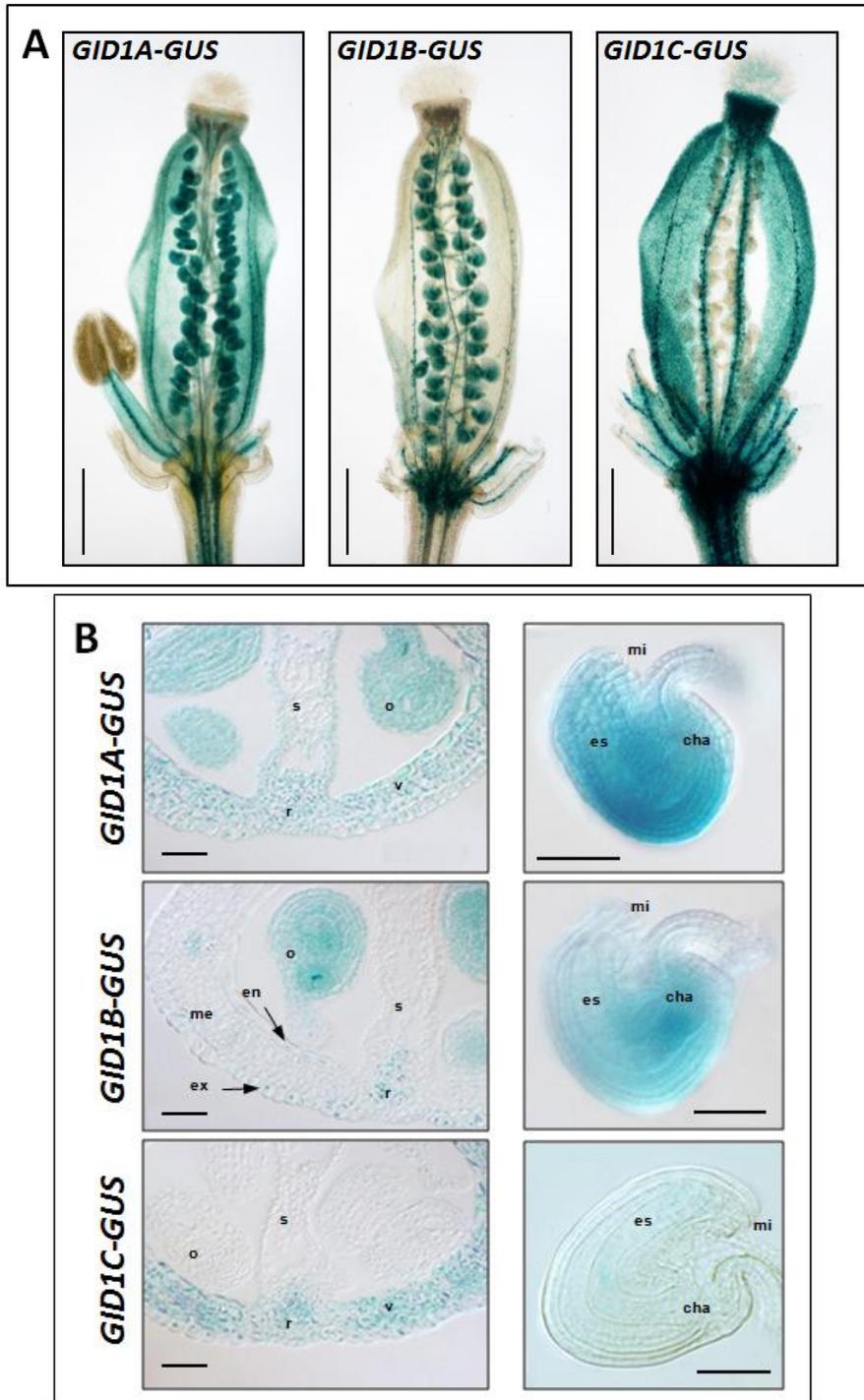
### 3.2. Las proteínas *GID1* se localizan de forma específica en los tejidos del pistilo y fruto

Con la finalidad de estudiar con mayor detalle los cambios en los patrones de localización de las proteínas *GID1* se analizó la actividad *GUS* en pistilos y en frutos, usando líneas *pGID1:GID1-GUS* que expresan la fusión

traduccional bajo el control de los promotores correspondientes, generadas por Suzuki *et al.* (2009).

La actividad GUS muestra claramente que las proteínas GID1 se localizan diferencialmente en los distintos tejidos del pistilo en antesis y en frutos polinizados. No se observaron variaciones en la localización de las proteínas GID1 en pistilos y frutos durante los estadios evaluados (entre 0 y 3 dpa) (Figuras 3.5A y 3.5B). GID1A se localizó en la valva, óvulo y estilo, pero no en el estigma. En el ovario esta proteína se localiza en casi todos los tejidos, con la excepción del área central del septum, el tracto de transmisión (Figura 3.5B). En contraste con la amplia localización de GID1A, GID1B y GID1C se localizaron de forma más restringida y específica. GID1B se localiza en óvulos y funículo, y en menor nivel en las células del exocarpo y del endocarpo *a*, estando ausente en el mesocarpo, estigma y estilo (Figura 3.5B). GID1C se localizó específicamente en la valva y en el estilo, estando completamente ausente en el óvulo y funículo (Figuras 3.5A y 3.5B), siendo el único receptor que se observó en el estigma (Figura 3.5A). Adicionalmente, todos los receptores se detectaron en el tejido vascular medio y lateral del pistilo. La presencia de GID1A y GID1B en óvulos mostró una ligera variación en su localización (Figura 3.5B), ya que mientras GID1A se localizó en la mayor parte de los tejidos con una fuerte señal en la zona que circunda el saco embrionario, GID1B se observó principalmente en la chalaza justo en la base del saco embrionario. No se detectó presencia de GID1C en los óvulos y semillas.

De modo resumido, GID1A y GID1C se localizaron en valvas, mientras que GID1A y GID1B se ubicaron en los óvulos, con un patrón diferencial. Estas variaciones en los perfiles de expresión temporal y espacial de los ARNm y de las proteínas GID1 reflejan posiblemente las diferencias en los procesos mediados por GAs en los que participa cada receptor durante la formación y desarrollo del fruto.



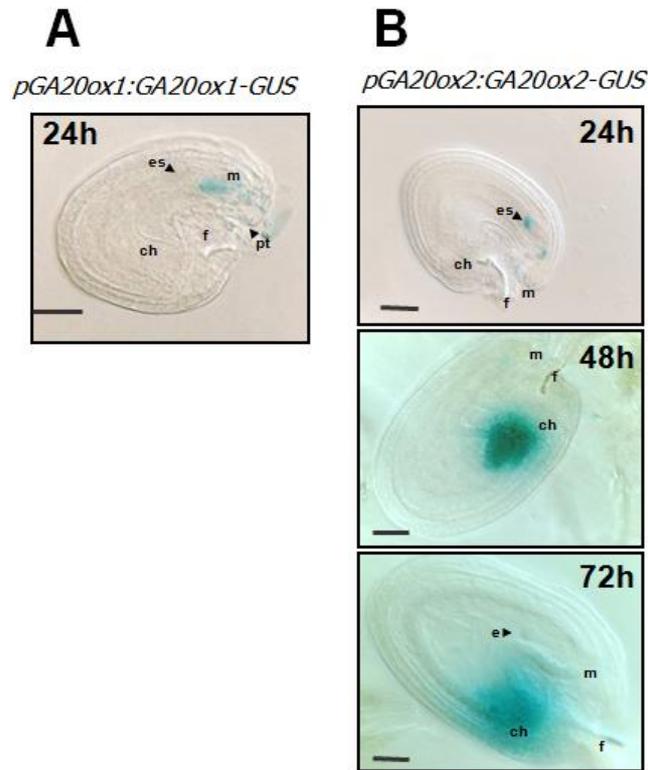
**Figura 3.5. Las proteínas *GID1* se localizan diferencialmente en los tejidos del pistilo y fruto.** La presencia de *GID1* se analizó usando las líneas de fusión traduccional *pGID1:GID1-GUS* (Suzuki *et al.*, 2009). **A.** Imagen de la localización *GID1-GUS* en pistilo entero en antesis. Los pistilos fueron ligeramente aplastados entre el cubre y el portaobjetos para poder apreciar las variaciones de señal en óvulos y valvas. La barra de escala representa 500  $\mu\text{m}$ . **B.** Localización *GID1-GUS* en cortes transversales del pistilo y óvulos en antesis. r, replum; s, septum-tracto de transmisión; v, valva, ex, exocarpo, me, mesocarpo, en, endocarpo. mi, micrópilo; es, saco embrionario; cha, chalaza. La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

### **3.3. Los receptores *GID1* se co-localizan con las enzimas *GA20ox1* y *GA20ox2* y con la expresión de los genes de biosíntesis *GA30ox1*, *GA30ox2* y *GA30ox4* en las semillas**

Los diferentes niveles de expresión de los genes *GID1* y las variaciones en la localización de las proteínas *GID1*, sugieren que cada receptor puede percibir las GAs sintetizadas en tejidos determinados o las GAs transportadas desde diferentes tejidos dentro del pistilo o fruto.

Las familias génicas *GA20ox* y *GA30ox* codifican enzimas que catalizan los pasos en la biosíntesis de GAs. Se ha demostrado que sus patrones de expresión corresponden con los sitios donde las GAs bioactivas son producidas (Itoh *et al.*, 2002; Mitchum *et al.*, 2006; Arnaud *et al.*, 2010; Hedden y Thomas, 2012). Se ha descrito que los genes *GA20ox1*, *GA20ox2*, *GA30ox1*, *GA30ox3* y *GA30ox4* son los más importantes en la síntesis de GAs necesarias para el desarrollo del fruto y la fertilidad (Hu *et al.*, 2008; Rie *et al.*, 2008; Plackett *et al.*, 2012). Los perfiles de expresión de estos genes fueron analizados en fruto (Dorcey *et al.*, 2009) (Figura 1.3) mostrando que la expresión de los genes *GA20ox1* y *GA30ox1* se presenta a las 24 hpa mientras que el gen *GA20ox2* se expresa entre las 24-72 hpa presentando un significativo incremento a las 48 hpa. Por otra parte, los genes *GA30ox3* y *GA30ox4* se expresan principalmente entre las 24-48 hpa.

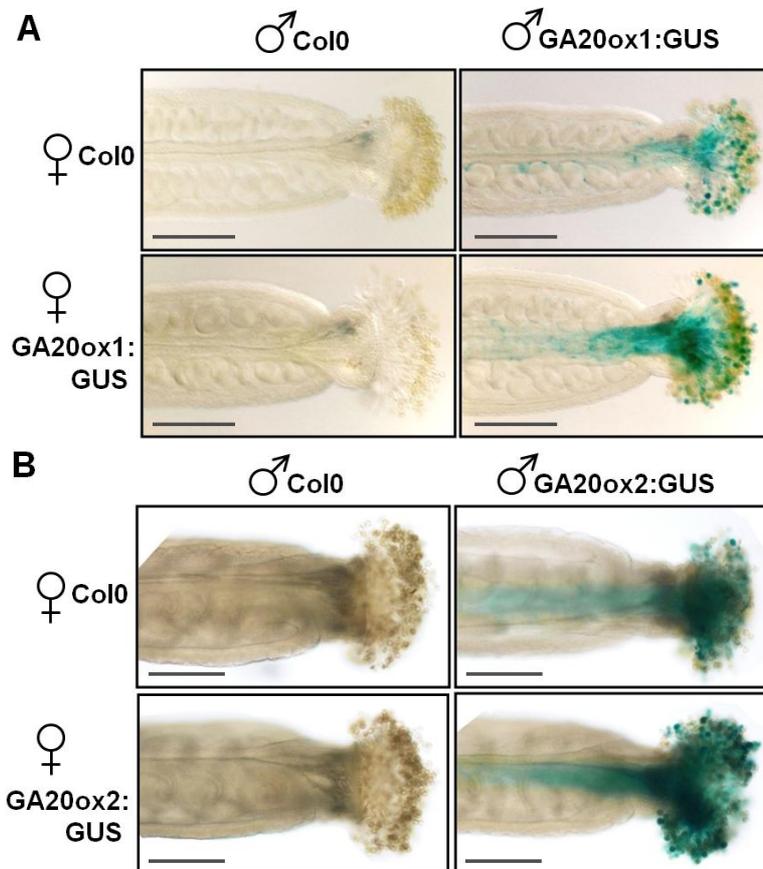
Con la finalidad de conocer con mayor detalle los sitios de metabolismo de GAs en el fruto y comprobar los perfiles de expresión de los genes de biosíntesis de GAs más importantes para el desarrollo del fruto, se estudio la localización de las proteínas *GA20ox1*, *GA20ox2* y se determinó la expresión espacial de los genes *GA30ox1*, *GA30ox3*, *GA30ox4* en pistilos, óvulos y en semillas, utilizando líneas GUS de tipo traduccional y transcripcional, respectivamente. De esta forma, poder inferir los sitios potenciales de síntesis y conocer si estos patrones coinciden con los observados en los estudios de expresión y localización de los receptores *GID1*.



**Figura 3.6. Las proteínas codificadas por los genes de biosíntesis de GAs están localizadas en semillas después de la polinización. A.** Señal de la línea *pGA20ox1:GA20ox1-GUS* (Desgagne-Penix *et al.*, 2005) detectada exclusivamente en semillas de 1 dpa en la zona del micrópilo. **B.** Señal de la línea *pGA20ox2:GA20ox2-GUS* (Frigerio *et al.*, 2006) en semillas a 1, 2 y 3 dpa. La proteína se localiza en semillas de 1 dpa en el saco embrionario y posteriormente se desplaza a la chalaza en las semillas de días 2 y 3 dpa. m, micrópilo; es, saco embrionario; ch, chalaza; e, endospermo; f, funículo. La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

Los resultados muestran que la proteína GA20ox1-GUS (Desgagne-Penix *et al.*, 2005) se localiza en la región del polen, tubo polínico y semillas de 1 dpa (justo después de la polinización) en una región próxima al saco embrionario (Figura 3.6A). Además se observó que la localización de GA20ox1-GUS es dependiente del polen, ya que la actividad GUS puede ser detectada tanto en las líneas transgénicas autopolinizadas como en plantas silvestres del tipo Col0 polinizadas con polen de las líneas transgénicas (Figura 3.7A). La señal GUS no se detectó cuando la línea se polinizó con polen del genotipo silvestre Col0. En definitiva, la localización de la proteína GA20ox1 se detectó solamente en el polen de las líneas transgénicas GA20ox1-GUS. En el caso de línea GA20ox2-GUS (Frigerio *et al.*, 2006) su señal se detectó tanto en el tubo polínico como en las semillas (Figura 3.6B), si bien se localizaba en el saco embrionario 24 horas después de la

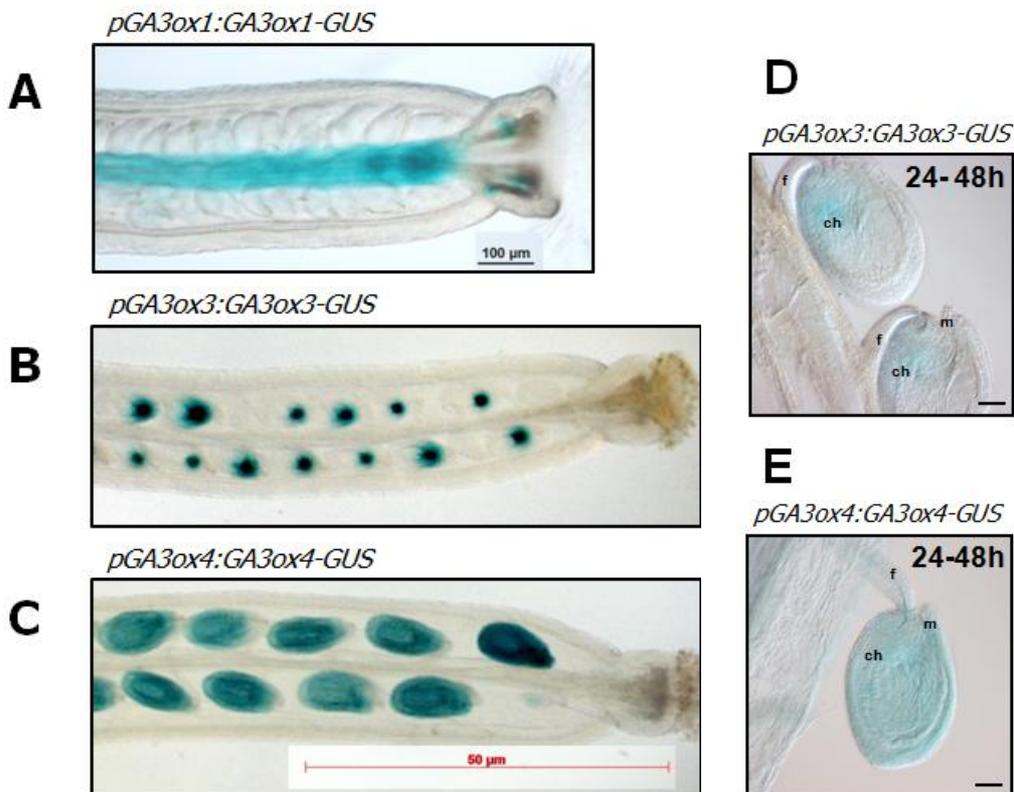
polinización, la señal a las 48-72 horas se localizó en un polo de la chalaza de las semillas en desarrollo. Este cambio en la ubicación de la proteína puede corresponder a una diferencia en la localización en los tejidos materno y paterno tras la polinización. Al igual que lo observado en la línea GA20ox1-GUS, la señal de la línea GA20ox2-GUS durante las primeras horas después de la fecundación en el saco embrionario se correspondía con el polen y tubo polínico (Figura 3.7B).



**Figura 3.7. La actividad de GA20ox1-GUS y GA20ox2-GUS es dependiente del polen.** La localización de GA20ox1-GUS y GA20ox2-GUS a 1 dpa está asociada con el polen y el tubo polínico. Se realizaron cruzamientos recíprocos entre el parental y las líneas transgénicas portando la construcción de fusión traduccional (A) *pGA20ox1:GA20ox1-GUS* (Desgagne-Penix *et al.*, 2005)) y (B) *pGA20ox2:GA20ox2-GUS* (Frigerio *et al.*, 2006). La barra de escala representa 500  $\mu$ m.

Por otra parte, la expresión de la línea *GA3ox1-GUS* (Hu *et al.*, 2008) se detectó en el replum, funículo y receptáculo y no se presentó expresión en las semillas en ningún estadio (Figura 3.8A). Contrariamente, la expresión de las líneas

*GA3ox3-GUS* y *GA3ox4-GUS* (Hu *et al.*, 2008) fue detectada en las semillas entre las 24-48 horas tras la polinización (Figura 3.8D y 3.8E), presentando una señal más intensa en la zona de la chalaza y algo más ligera en el funículo y micrópilo para el gen *GA3ox3* (Figura 3.8B y 3.8D), y una señal homogénea en todas las regiones de la semilla para el gen *GA3ox4* (Figuras 3.8C y 3.8E). Es importante añadir que no se observó localización de las proteínas GA20ox ni tampoco expresión de los genes *GA3ox* en la valva para ninguna de las condiciones evaluadas (Figuras 3.7A, 3.7B y 3.8A, 3.8B, 3.8C).

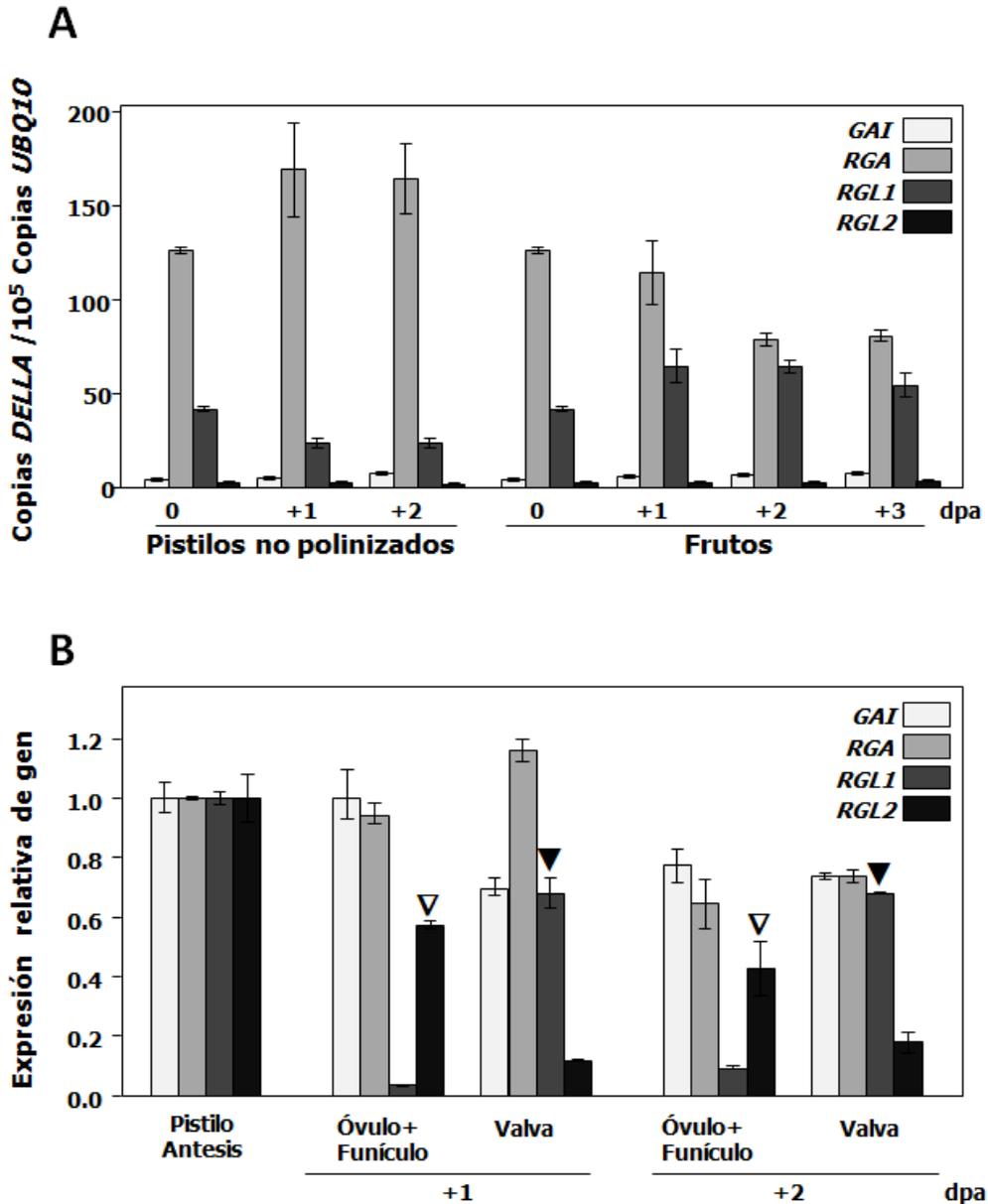


**Figura 3.8. La expresión de los genes de biosíntesis de la familia *GA3ox* se presenta en semillas pero no en valva. A.** Expresión de *pGA3ox1:GA3ox1-GUS* (Hu *et al.*, 2008) en antesis, solo presente en el replum. **B-D.** Expresión de *pGA3ox3:GA3ox3-GUS* (Hu *et al.*, 2008) exclusiva en chalaza de las semillas de frutos entre 24-48 hpa. **C-E.** Expresión de la *pGA3ox4:GA3ox4-GUS* (Hu *et al.*, 2008) detectado en toda la semilla de frutos entre 24-48 hpa. ch, chalaza; e, embrión; es, saco embrionario; f, funículo; m, micrópilo; pt, tubo polínico. La barra de escala para las imágenes A, B-C y D-E representa 100, 50 y 40  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

### 3.4. Los genes de las proteínas DELLA se co-localizan con los receptores **GID1** en óvulos y semillas en desarrollo

Las proteínas DELLA son los represores centrales de los procesos dependientes de GAs (Daviere y Achard, 2013). Como tales, están involucradas en el control de la formación del fruto en *Arabidopsis*, ya que la pérdida funcional de cuatro de los 5 genes DELLA (*GAI*, *RGA*, *RGL1* y *RGL2*) es suficiente para promover la partenocarpia. Sin embargo, las combinaciones de los triples mutantes DELLA no muestran partenocarpia, por lo que se concluye que estas 4 DELLA son las que están involucradas en el desarrollo del fruto (Dorcey *et al.*, 2009). En presencia de GAs, los receptores GID1 interactúan con las DELLA para desactivar la represión de la señalización causada por las DELLA. La formación del complejo GID1-DELLA es fundamental para permitir la activación de los genes de respuesta a GAs (Sun, 2011; Daviere y Achard, 2013). La formación de tales complejos proteicos solamente es posible si los GID1 y las DELLA co-localizan en el tiempo y en el espacio. Por lo tanto, para determinar qué complejos GID1-DELLA participan en la formación del fruto y su desarrollo, es importante analizar los patrones de expresión específicos de las DELLA en el pistilo, y compararlos con los patrones de expresión y localización de los GID1. Para ello, se analizaron los niveles de ARNm de las DELLA en pistilos y frutos mediante qPCR y los patrones espaciales de localización generando líneas transgénicas de tipo transcripcional para los genes *GAI*, *RGA* y *RGL1* fusionadas al gen reportero *GUS*. Para el gen *RGL2* se usó la línea *rgl2-5* (fusión traduccional) (Lee *et al.*, 2002).

Los análisis de qPCR en pistilo entero mostraron que *RGA* se expresa a mayor nivel seguido de *RGL1* y siendo la expresión de *GAI* y *RGL2* mucho menor (Figura 3.9A). Después de la fecundación, la expresión de *GAI* y *RGL1* se incrementa ligeramente, mientras que la expresión de *RGA* decrece. No se observaron cambios en la expresión del gen *RGL2*.

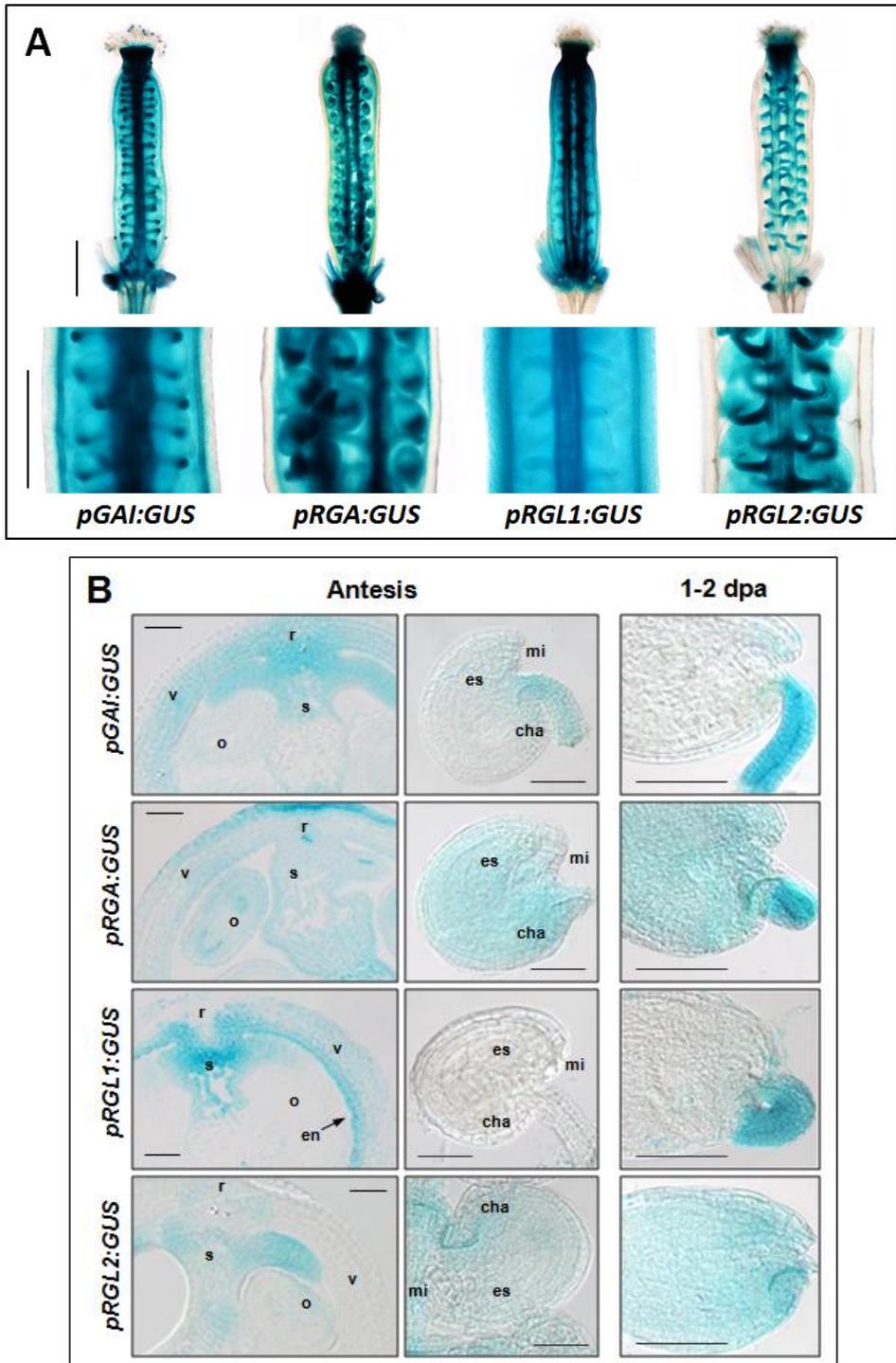


**Figura 3.9. Los genes *DELLA* se expresan diferencialmente en los tejidos de pistilo y fruto. A.** Expresión temporal de los 4 genes *DELLA* *GAI*, *RGA*, *RGL1* y *RGL2*, en pistilos no polinizados y en frutos tempranos. La expresión de cada gen está representada por el número de copias de cDNA por  $10^5$  copias de *UBQ10*. **B.** Expresión espacial y temporal de los genes *DELLA* en los óvulos+funículos y en la valva en pistilos no polinizados y diseccionados manualmente a 1 y 2 dpa. La expresión de cada gen fue normalizada para la *UBQ10* y en relación a su expresión en el pistilo entero en antesis. Los triángulos vacíos y llenos indican la expresión preferencial de *RGL2* en los óvulos y de *RGL1* en las valvas, respectivamente. El experimento se repitió tres veces y cada uno de ellos fue llevado a cabo con tres réplicas técnicas, obteniéndose resultados similares. Los datos son la media  $\pm$  SD de un experimento representativo. dpa, días post antesis.

Se analizó también la expresión de los 4 genes DELLA en pistilos no polinizados diseccionados manualmente, con la finalidad de revelar los patrones espaciales de expresión en el pistilo (Figura 3.9B). Los genes *GAI* y *RGA* se expresaron de manera similar en los óvulos+funículos y en las valvas, mientras que *RGL1* y *RGL2* se expresaron específicamente en la valva y en óvulo+funículo, respectivamente. Estos resultados manifiestan una distribución espacial diferencial, sugiriendo la existencia de funciones específicas de las proteínas DELLA asociadas al tipo de tejido en el proceso de fructificación mediado por GAs.

Para la mejor caracterización de la expresión de *GAI*, *RGA* y *RGL1* se generaron líneas transgénicas con fusiones transcripcionales del promotor de cada gen con el gen *GUS*, en colaboración con la Dra. Tai-ping Sun de la Universidad de Duke. Para conocer la localización de *RGL2* se utilizó la línea *rgl2-5* (Lee *et al.*, 2002), un 'gene trap' en la cual el gen *GUS* unido a un elemento *Ds* se inserta en el extremo N-terminal de la proteína generando una fusión traduccional.

Los análisis de las líneas deladoras mostraron que mientras *RGA* y *GAI* se expresaban en todo el pistilo, *RGL1* se expresa y *RGL2* se localiza con un patrón más específico (Figura 3.10). *RGA* se detectó a altos niveles en todos los tejidos, mientras que la expresión de *GAI* mostraba altos niveles en las valvas, específicamente en el mesocarpo y en el endocarpo de las células laterales, así como en el funículo. Se detectó una muy leve expresión de *GAI* en los óvulos en antesis y en semillas en desarrollo. Los patrones de expresión de *GAI* y *RGA* fueron muy similares a la localización que presentó *GID1A*. Por otra parte *RGL1* se expresaba principalmente en el endocarpo y a bajos niveles en el mesocarpo y el exocarpo (Figura 3.10B); también se detectó expresión en el funículo de las semillas de 2 dpa. No se detectó actividad *GUS* ni en los óvulos ni en las semillas en desarrollo. En contraste con *RGL1*, la localización de *RGL2* se observó tanto en óvulos en antesis como en las semillas, incluyendo los funículos, durante su desarrollo temprano, estando totalmente ausente en la valva. El patrón de expresión de *RGL1* y la localización de *RGL2* mostraron una notable similitud con los patrones de expresión y localización de los receptores *GID1C* y *GID1B*, respectivamente.



**Figura 3.10. La expresión de los genes *DELLA* se localiza diferencialmente en los tejidos del pistilo y fruto.** La expresión de los genes *GAI*, *RGA* y *RGL1* se analizó generando y caracterizando líneas de fusión transcripcional *pGAI:GUS*, *pRGA:GUS*, *pRGL1:GUS*, mientras que para *RGL2* se utilizó la línea mutante *rgl2-5* (Lee *et al.*, 2002). **A.** Expresión en el pistilo entero. La barra de escala representa 500  $\mu$ m. **B.** Expresión en cortes transversales del pistilo y los óvulos al momento de antesis (paneles medio e izquierdo), y las semillas a 1-2 dpa (panel derecho). o, óvulo; r, replum; s, septum-tracto de transmisión; v, valva, en, endocarpo; mi, micrópilo; es, saco embrionario; cha, chalaza. La barra de escala representa 50  $\mu$ m.

Observando los patrones de expresión en los diferentes tejidos usando las líneas transgénicas GUS y los análisis de qPCR, se puso de manifiesto una co-localización de las DELLA y los GID1, lo que posibilita la interacción espacial específica de determinados pares GID1-DELLA (Figuras 3.3, 3.5, 3.9 y 3.10).

En los óvulos, GID1A y GID1B pueden potencialmente interactuar solamente con GAI, RGA y RGL2. Por el contrario, en las valvas, GID1A y GID1C sólo pueden interactuar con GAI, RGA y RGL1. En otras palabras, mientras GID1A puede interactuar con las 4 DELLA (GAI, RGA y RGL1 en valva y GAI, RGA y RGL2 en óvulos-semillas), GID1B y GID1C tienen una interacción específica determinada por sus patrones espaciales de expresión, con RGL2 en óvulos-semillas y con RGL1 en las valvas, respectivamente.

### **3.5. Mutaciones de los genes *GID1* provocan defectos de fertilidad y desarrollo del fruto**

Estudios previos sugieren que cada gen *GID1* puede estar participando en procesos específicos relacionados con GAs en *Arabidopsis*, al menos en el desarrollo del tallo de la inflorescencia, la germinación y el desarrollo de la silicua (Griffiths *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2006 Suzuki *et al.*, 2009; Voegelé *et al.*, 2011). Sin embargo, los análisis de los patrones de expresión empleando líneas GID1-GUS podrían indicar que los receptores juegan un papel específico, al menos en el desarrollo del tallo de la inflorescencia y el crecimiento del fruto (Suzuki *et al.*, 2009). En este trabajo hemos mostrado que GID1A y GID1C se expresan y se localizan en las valvas, mientras que GID1A y GID1B se expresan y se localizan en los óvulos. Estos patrones espaciales sugieren que GID1A y GID1C perciben las GAs que median el crecimiento del fruto, mientras que GID1A y GID1B perciben las GAs en los óvulos que median el desarrollo de la semilla. Para saber si estas combinaciones de genes *GID1* regulan procesos reproductivos mediados por GAs específicos en cada tejido/órgano, se analizó en detalle el fenotipo reproductivo de los mutantes nulos correspondientes.

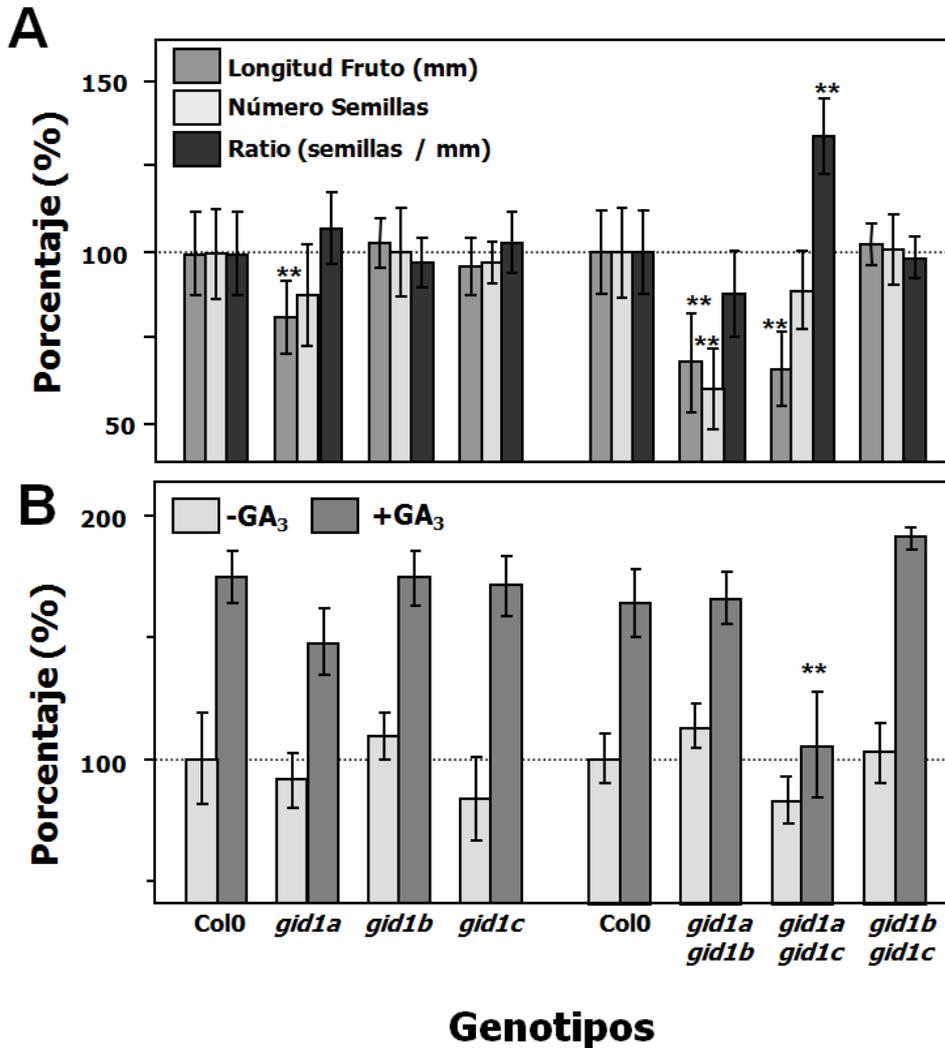
Análisis genéticos previos indican que en el mutante simple *gid1a* y los dobles mutantes *gid1a gid1b* y *gid1a gid1c* tienen comprometida la fertilidad (Griffiths

*et al.*, 2006; Luchi *et al.*, 2007; Plackett *et al.*, 2011). *gid1a* tiene un leve detrimento en el número de semillas y una ligera reducción en la longitud del fruto. Por su parte el doble mutante *gid1a gid1b* muestra una reducción en el número de semillas y en la longitud de la silicua. Este fenotipo fue atribuido al acortamiento de los filamentos de los estambres, lo cual reduce la polinización. En contraste, *gid1a gid1c* tiene una fuerte reducción en el tamaño de la silicua, pese a presentar sólo una leve disminución en el número de semillas.

El crecimiento del fruto y la fertilidad son resultado del efecto combinado de factores paternos (polen) y maternos (óvulo y ovario). Para determinar si los defectos en la fertilidad observados previamente en los mutantes *gid1* son causa de una defectuosa polinización o debidos a defectos en el tejido materno, se llevaron a cabo experimentos detallados evaluando las silicuas provenientes de pistilos de flores emasculadas de cada uno de los mutantes *gid1* polinizados con polen parental (Col0), de modo que los efectos en la fertilidad fueran solo consecuencia de defectos en el pistilo. Los frutos fueron cosechados justo antes de la abscisión, y se determinó la longitud de la silicua, el número de semillas por silicua y el cociente o ratio entre el número de semillas y la longitud de cada fruto (Figura 3.11A).

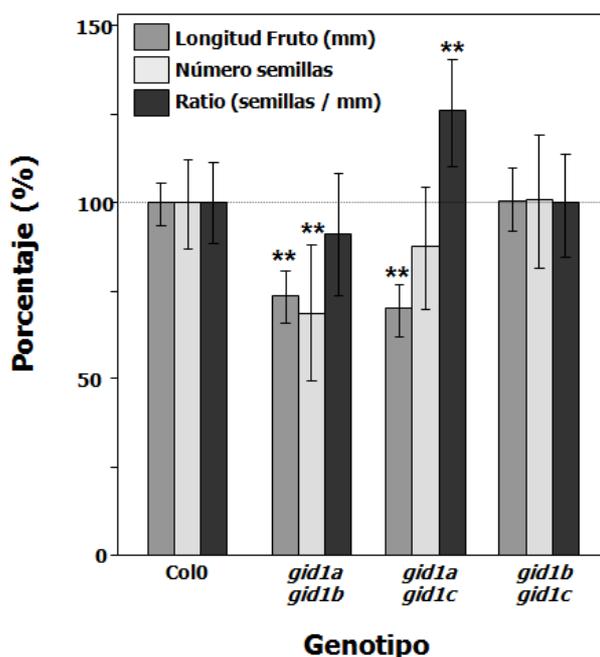
Los resultados muestran que entre los mutantes simples, solamente el *gid1a* muestra una ligera reducción en la longitud y en el contenido de semillas, dando como resultado un ratio (número de semillas vs longitud silicua) similar al parental. Los demás mutantes simples no manifiestan una alteración significativa de los parámetros analizados. Esto correlaciona con los datos de expresión, ya que *GID1A* es el que se expresa en mayor nivel y el único que muestra un fenotipo cuando es mutado. Sin embargo, los dobles mutantes muestran fenotipos diferentes (Figura 3.11A). El doble mutante *gid1a gid1b* muestra un fenotipo similar al simple *gid1a* pero más fuerte, con una reducción proporcional tanto en la longitud de la silicua como en el número de semillas, dando como resultado un ratio similar al parental. Sin embargo, *gid1a gid1c* muestra un fenotipo muy diferente, con una fuerte reducción en la longitud de la silicua y solo una ligera reducción en el número de semillas, resultando en un

significativo incremento en la ratio. Estos frutos mostraban una alta densidad de semillas y una fuerte compactación de las semillas en la silicua. Por su parte *gid1b gid1c* no muestra ningún defecto siendo muy similar al parental.



**Figura 3.11. Los receptores GID1 participan en la fertilidad y la elongación de la silicua. A.** Efectos asociados al tejido materno en los mutantes simples y dobles de *gid1*. Las flores fueron emasculadas un día antes de antesis y polinizadas manualmente en antesis con el polen parental (Col0). Los frutos maduros de 14 dpa se recolectaron individualmente y se determinó la longitud, el número de semillas, y la ratio (cociente entre el número de semillas vs. longitud) por fruto. **B.** Respuesta de los pistilos no polinizados de los mutantes simples y doble a tratamientos exógenos con GA<sub>3</sub>. Las flores fueron emasculadas un día antes de antesis. La mitad de los pistilos se trató en antesis con 300 μM GA<sub>3</sub> (+GA<sub>3</sub>) y la otra mitad se trató con una solución mock (-GA<sub>3</sub>). La longitud de frutos y pistilos se midió a 10 dpa. Los datos para cada genotipo se normalizaron con respecto a los valores de Col0. Se representa la media y la SD de al menos 50 pistilos/frutos por tratamiento. Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares. Las diferencias significativas (análisis de t-test Student) entre el Col0 y el mutante fueron marcadas con asterisco (\*\*, p-valor <0,001).

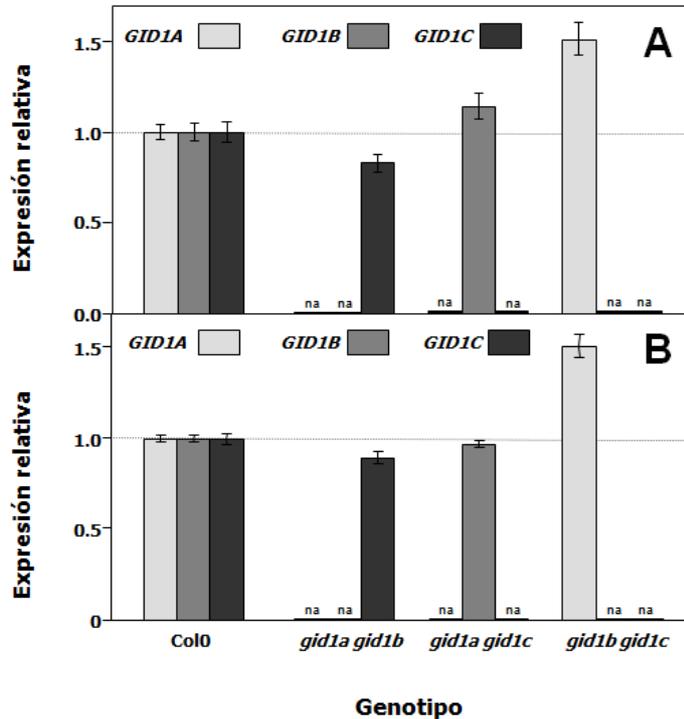
Para comparar nuestro análisis con los datos previos de la bibliografía realizamos un ensayo similar al previamente descrito pero utilizando frutos autopolinizados, donde las deficiencias en el desarrollo del polen de cada mutante también se reflejarían en los defectos en la fertilidad y desarrollo de los frutos. Como se observa en la Figura 3.12, los fenotipos fueron muy similares a los de los dobles mutantes emasculados. Estos datos indican que los defectos en fertilidad y desarrollo de fruto de los mutantes *gid1a gid1b* y *gid1a gid1c* son causados por defectos en los tejidos maternos.



**Figura 3.12. Fertilidad y longitud de los frutos autopolinizados en los dobles mutantes *gid1*.** Los frutos maduros de pistilos autopolinizados fueron individualmente recolectados a 14 dpa, y se determinó la longitud, el número de semillas, y la ratio (número de semillas vs. longitud) por fruto. Los datos para cada genotipo se normalizaron con respecto a los valores de Col0. Se representa la media y la SD de al menos 50 pistilos/frutos por tratamiento. Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares. Las diferencias significativas (análisis de t-test Student) entre el Col0 y el mutante fueron marcadas con asterisco (\*\*, p-valor < 0,001).

La eliminación de dos de los tres receptores *GID1* en cada mutante doble podría causar un aumento en la expresión del gen *GID1* no alterado, lo cual contribuiría a atenuar el fenotipo. Para comprobar esto se analizó por qPCR la expresión de cada *GID1* en los dobles mutantes y se observó que la expresión de *GID1A* en *gid1b gid1c* aumenta significativamente tanto en plántula como en pistilos en

antes (Figura 3.13), lo cual puede contribuir a un normal crecimiento incluso en la ausencia de actividad de los receptores *GID1B* y *GID1C*. Por el contrario, no se observó una alteración en la expresión de los receptores *GID1B* y *GID1C* en los dobles *gid1a gid1c* y *gid1a gid1b*, respectivamente.

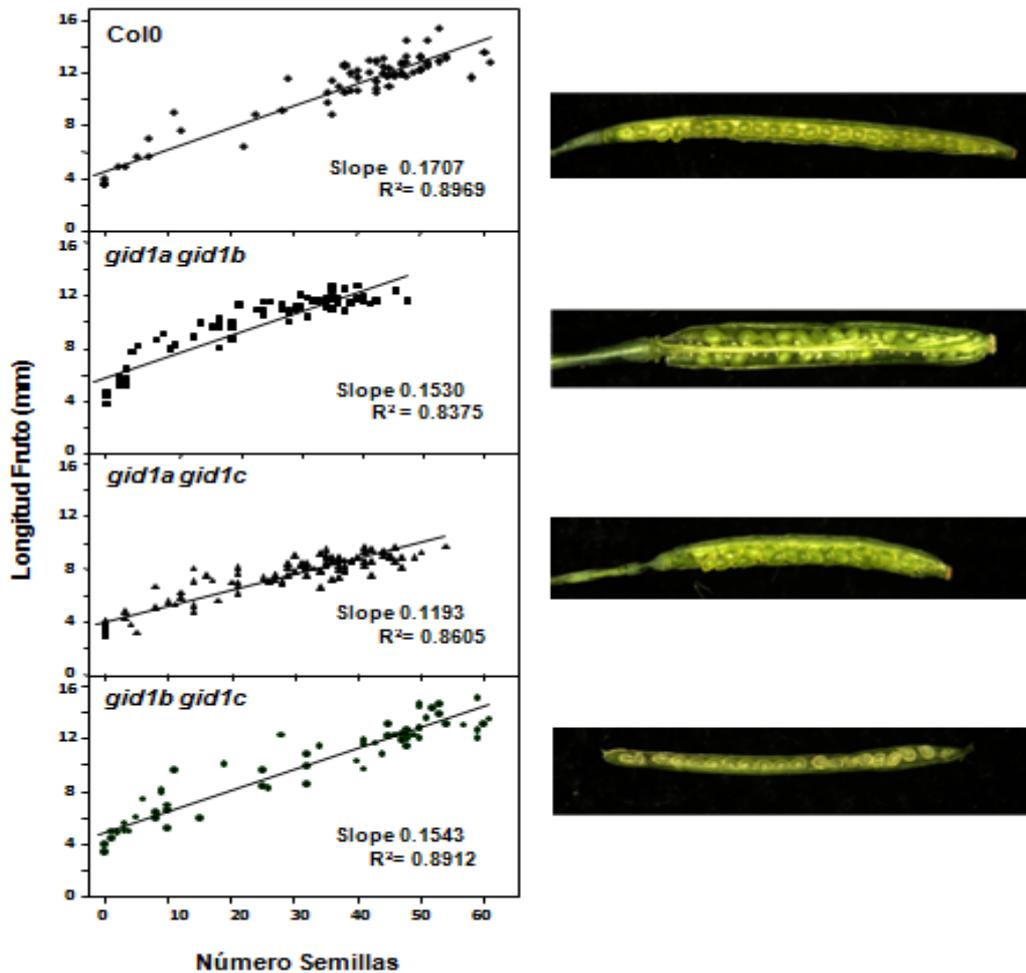


**Figura 3.13. Expresión de *GID1* en los dobles mutantes nulos *gid1*.** A. expresión en el pistilo en antesis. B. expresión en plántulas de 4 días. La expresión de cada gen fue normalizada a la de la *UBQ10* y a la expresión de Col0. na, no ensayado.

Se sabe que existe una correlación entre el tamaño final del fruto y el número de semillas que contiene, lo que se puede observar representando estos dos parámetros en una población de frutos con polinización variable, desde pistilos no polinizados, pasando por frutos con fecundación parcial, hasta frutos que presentan todos sus óvulos fecundados (Gillaspy *et al.*, 1993; Cox y Swain, 2006; Dorcey *et al.*, 2009). Esta correlación sería debida a que, en condiciones normales, la elongación del fruto es proporcional al número de semillas ya que son éstas las que producen las GAs (u otras señales) para permitir la elongación de la silicua. Por lo tanto, los cambios en el número de semillas sin alteración de la pendiente de la línea de mejor ajuste de los datos (una medida de dependencia del número de semillas con el tamaño del fruto) pueden revelar

defectos en la producción de semillas, mientras que una disminución en la pendiente puede reflejar un defecto de la elongación de la silicua, lo cual resulta en un aumento del empaquetamiento de las semillas en el fruto. Para analizar la longitud y el número de semillas, los dobles mutantes *gid1* fueron manualmente polinizados con diferentes concentraciones de polen de Col0 (Figura 3.14). El mutante *gid1a gid1b* muestra como se espera, un reducido número de semillas sin alteración en la ratio de crecimiento, indicando que un menor tamaño de fruto es debido a una menor producción de semillas. Por el contrario, el mutante *gid1a gid1c* muestra una significativa disminución en la pendiente, lo cual sugiere la incapacidad de este mutante para elongar la silicua incluso en presencia de un significativo número de semillas. De nuevo *gid1b gid1c* se comportó como el parental (Figura 3.14). Finalmente ninguna combinación de doble mutante muestra diferencias en la longitud final de los pistilos no polinizados (pistilos sin semillas), lo que sugiere que los tres receptores son redundantes en esa fase de desarrollo, o que la actividad *GID1* no es esencial para el desarrollo del pistilo hasta antesis, lo que implica que las GAs no participan en este proceso.

Los fenotipos observados para *gid1a gid1b* y *gid1a gid1c* sugieren una insensibilidad a las GAs en óvulos y valvas que causa una reducción en la producción de semillas y el crecimiento de la silicua, respectivamente. De ser cierto, los pistilos de plantas *gid1a gid1c* deberían ser insensibles al tratamiento con GAs exógenas. Para ello se realizó un ensayo de tratamiento con  $GA_3$  y se determinó la respuesta partenocárpica de los pistilos de flores emasculadas (Figura 3.11B). Los resultados muestran que los mutantes *gid1a gid1b* y *gid1b gid1c* exhiben una respuesta a  $GA_3$  normal, similar a las plantas parentales; por el contrario, *gid1a gid1c* es insensible a GAs con una casi nula respuesta en el pistilo medida como crecimiento del mismo (Figura 3.11B). Por lo tanto, podemos concluir que el reducido crecimiento del fruto del mutante *gid1a gid1c* es debido a falta de percepción de GAs en la valva, al carecer de los receptores específicos que median el desarrollo de la silicua.



**Figura 3.14. Correlación entre longitud del fruto y el número de semillas de los dobles mutantes *gid1*.** Las flores fueron emasculadas un día antes de antesis y polinizadas manualmente en antesis con diferentes cantidades de polen parental para obtener frutos con un número variable de semillas. Algunos pistilos fueron también conservados sin polinizar. Los frutos maduros de 14 dpa fueron individualmente recolectados, y se determinó la longitud y el número de semillas de cada fruto. El número de semillas y la longitud del fruto se representan con el correspondiente coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y se calculó la línea de regresión ajustada. Se utilizaron más de 60 pistilos/frutos por cada genotipo. El experimento se repitió dos veces obteniendo resultados similares. Se muestra además una imagen representativa de frutos de cada genotipo.

En resumen, nuestros datos indican que los defectos observados en los mutantes *gid1* son debido a defectos en el tejido materno. La contribución del acortamiento de los filamentos de las anteras en la fertilidad y fenotipos de fruto parece ser menor. Nuestros datos también indican que los pares de receptores GID1A-GID1B y GID1A-GID1C son parcialmente redundantes en el control de la fertilidad y la longitud del fruto, respectivamente, ya que solo se observan fenotipos severos en estos dos dobles mutantes. Mientras que GID1A es el

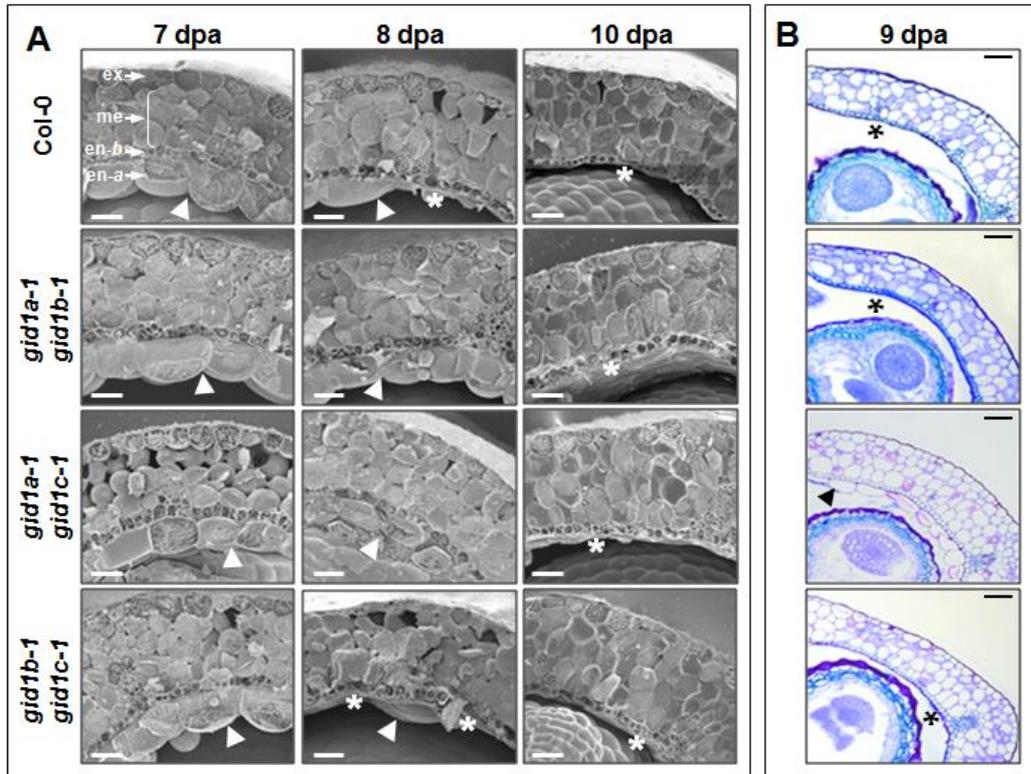
receptor con una función general en la percepción de GAs en el pistilo, ésta se complementa con la acción de *GID1B* y *GID1C* en valva y semillas, respectivamente, lo que da lugar a cierto grado de redundancia a la vez que especificidad en la percepción de GAs en cada órgano.

### 3.6. Las mutaciones en los genes *GID1* y *DELLA* provocan alteraciones en el desarrollo del endocarpo

En la epidermis interior de la valva de *Arabidopsis* existen dos capas de células que conforman el endocarpo. El endocarpo *a*, la capa de células adaxial situada hacia el espacio del carpelo, está constituida por células agrandadas que colapsan cuando el fruto se encuentra maduro. Simultáneamente, la segunda capa adaxial sub-epidérmica, el endocarpo *b*, de células más pequeñas, se lignifica. La diferenciación durante el desarrollo del fruto de estas capas de células interiores en la silicua de *Arabidopsis* es uno de los mecanismos necesarios para la apertura de la valva y dispersión de las semillas. Previamente nuestro grupo había descrito que ambos procesos son mediados por GAs (Dorcey *et al.*, 2009). Por ejemplo, se observó una prematura degradación del endocarpo *a* y lignificación del endocarpo *b* en pistilos no polinizados tras el tratamiento con GA<sub>3</sub>, así como en el cuádruple mutante *4xdella* (*gaiT6 rgaT2 rgl1-1 rgl2-1*). Con el propósito de determinar qué receptores *GID1* y qué proteínas *DELLA* están regulando este proceso se estudió el desarrollo de la estructura de la vaina en los mutantes *gid1* (Figura 3.15) y en los mutantes de triple pérdida de función *3xdella* (Figura 3.16).

Los análisis morfológicos en los mutantes *gid1* sugieren que, de los tres receptores, *GID1A* tiene una función más relevante en la regulación de la diferenciación del endocarpo. *GID1C* tendría una función menor, mientras que *GID1B* no estaría implicado (Figura 3.15). A pesar de que el mutante simple *gid1a* no muestra una alteración significativa, los dobles mutantes *gid1a gid1b* y *gid1a gid1c* muestran entre uno y dos días de retraso en la degradación del endocarpo *a* y en la lignificación del endocarpo *b*, respectivamente. La degradación y lignificación en *gid1b gid1c* es idéntica a la observada en el genotipo silvestre, lo

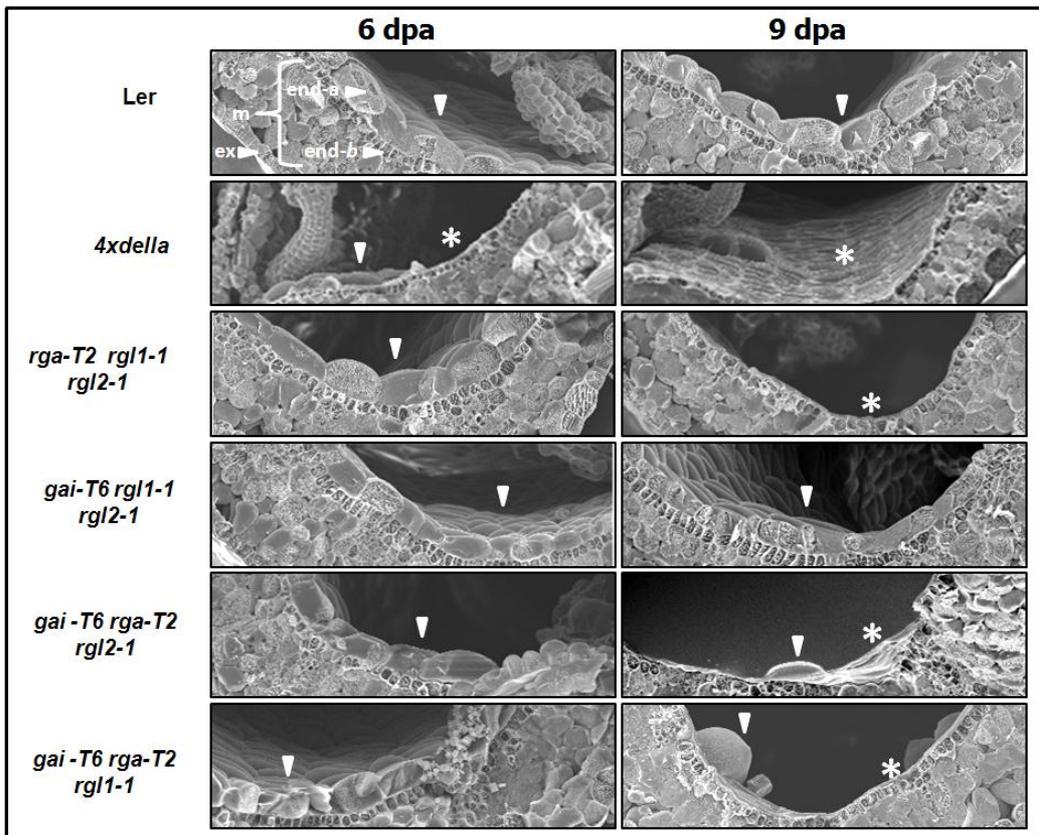
que sugiere que la elevada expresión de GID1A en todos los tejidos de este mutante sería suficiente para la correcta diferenciación. Estos resultados se correlacionan con la intensidad y la distribución de los receptores: GID1A se acumula a altos niveles en la valva, seguido de GID1C (Figuras 3.4 y 3.5). La presencia de GID1B se detecta, aunque de forma muy residual en la valva, especialmente en la capa adaxial del exocarpo y en el endocarpo *a*.



**Figura 3.15. Los mutantes nulos *gid1* muestran alteraciones en la diferenciación del endocarpo de la valva del fruto. A.** Retraso en la degradación del endocarpo *a* en los mutantes *gid1a gid1b* y *gid1a gid1c* en criosecciones transversales de frutos parentales y dobles mutantes a 7, 8 y 10 dpa. Los diferentes tejidos son etiquetados: ex, exocarpo; me, mesocarpo; en-*b*, endocarpo *b*; en-*a*, endocarpo *a*. **B.** Retraso en la lignificación del endocarpo *b* y la degradación del *a* en el doble mutante *gid1a gid1c* en criosecciones transversales de los frutos del parental y de los dobles mutantes *gid1* a 9 dpa. La presencia o degradación del endocarpo *a* se indican con un asterisco o con una punta de flecha, respectivamente. La barra de escala representa 50 µm.

Por otra parte, el análisis morfológico de los mutantes de triple pérdida de función *3xdella* mostró que RGA es el represor principal en la regulación de la diferenciación del endocarpo. De acuerdo con el trabajo de Dorcey *et al.* (2009), se observó un significativo adelanto en la degradación del endocarpo *a* y

lignificación del endocarpo *b* en el *4xdella*, que se completó a los 6 dpa, cuando se observaron muy pocas células del endocarpo *a* aún sin degradar. De los triples mutantes *3xdella*, los tres en los cuales RGA está mutado, también mostraron adelanto de la degradación. Por el contrario en el parental *Ler* y en el triple mutante *gaiT6 rgl1-1 rgl2-1* (en el que RGA es funcional) la degradación de las células del endocarpo *a* y lignificación del endocarpo *b* no se produjo antes de 9 dpa.



**Figura 3.16. El mutante *4xdella* y los mutantes triples *3xdella* muestran alteraciones en la diferenciación del endocarpo de la valva del fruto.** Se muestran criosecciones transversales de los frutos a 6 y 9 dpa del parental *Ler*, el mutante *4xdella* y los mutantes *3xdella*. El adelanto en la degradación del endocarpo *a* se observa en el *4xdella* y los mutantes triples *rgaT2 rgl1-1 rgl2-1*, *gai-T6 rgaT2 rgl1-1*, y *gaiT6 rgaT2 rgl2-1*. El triple mutante *gaiT6 rgl1-1 rgl2-1* se comporta como el silvestre *Ler*. Los diferentes tejidos son etiquetados en la primera imagen: ex, exocarpo; me, mesocarpo; *en-b*, endocarpo *b*; *en-a*, endocarpo *a*. La presencia o degradación del endocarpo *a* se indican con un asterisco o de punta de flecha, respectivamente. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

Aunque se observa un adelanto en la degradación del endocarpo *a* en los triples mutantes *rgaT2 rgl1-1 rgl2-1*, *gaiT6 rgaT2 rgl1-1* y *gaiT6 rgaT2 rgl2-1*, éste no es tan severo como en el *4xdella*, lo que sugiere la implicación de las 4 DELLA en este proceso. Aunque al parecer se trata de un efecto aditivo, los resultados obtenidos con el mutante *gaiT6 rgl1-1 rgl2-1* revelan claramente que RGA es la DELLA principal que regula la diferenciación de las capas de células del endocarpo aunque las otras proteínas DELLA podrían también contribuir aunque en menor medida a regular este proceso. Estos resultados son coherentes con el alto nivel de expresión de RGA en la valva.

### 3.7. Discusión Capítulo 1

#### 3.7.1. La expresión de los GID1 en los óvulos y las valvas es diferencial

Se ha descrito que los tres receptores GID1 de *Arabidopsis* tiene redundancia funcional en diferentes procesos de crecimiento de la planta dependiente de GAs ya que los análisis de expresión de ARNm indican que los tres genes se expresan en la mayoría de los tejidos (Griffiths *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2006). Por otra parte, el análisis de la localización espacial usando líneas transgénicas GID1-GUS sugieren que dicha redundancia funcional al parecer no es completa, al menos en el tallo de las inflorescencias y en el crecimiento de la silicua (Suzuki *et al.*, 2009). Aunque algunos estudios reportan niveles superiores de expresión de GID1A en casi todos los tejidos evaluados (Griffiths *et al.*, 2006), sugiriendo un papel predominante en la percepción de GAs durante diversos procesos del desarrollo de la planta, esto no es motivo suficiente para descartar la participación significativa de otros GID1 en procesos específicos del desarrollo.

Nuestros resultados han mostrado que dentro del pistilo *GID1A* se expresa a mayor nivel seguido de *GID1B* y *GID1C*; sin embargo la distribución espacial de los GID1 en el pistilo es diferencial, como indican nuestros resultados de análisis de ARNm y de localización de proteínas. *GID1A* y *GID1C* participan en la percepción de GAs en las valvas, donde no se expresa *GID1B*. Por el contrario, en

los óvulos la percepción de GAs es llevada a cabo por GID1A y GID1B, pero no por GID1C. Esto revela que las distintas combinaciones de GID1 perciben las GAs sintetizadas en el mismo sitio de percepción, o transportadas desde tejidos específicos del pistilo para regular diferentes procesos celulares que dan como resultado el correcto crecimiento y desarrollo de las semillas y de la valva.

Diferentes estudios indican que existe una correlación entre altos niveles de GAs y altos niveles en la expresión de los genes de biosíntesis. Por otra parte, los últimos pasos de la biosíntesis de GAs (activadas por las GA20ox y GA3ox) ocurren normalmente en el sitio de acción de las GAs bioactivas (Olszewski *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2008; Hedden y Thomas, 2012). De esta forma, el sitio de acción de las GAs puede ser descubierto por el análisis de los patrones temporales de expresión de los genes *GA20ox* y especialmente *GA3ox*, encargados de controlar el paso final en la biosíntesis de GAs. Los genes *GA20ox1* y *GA20ox2*, así como *GA3ox3* y *GA3ox4* han sido descritos por tener una función crucial en el desarrollo del fruto y en la fertilidad (Hu *et al.*, 2008; Rieu *et al.*, 2008; Plackett *et al.*, 2012). Hemos mostrado que la localización de GA20ox2 ocurre solo en semillas en desarrollo, mientras que la localización de GA20ox1 está asociada a la formación del tubo polínico durante la plasmogamia y no en las semillas en desarrollo. Además los genes *GA3ox3* y *GA3ox4* tienen una expresión específica en las semillas, en el saco embrionario y en el endospermo, respectivamente. Hay que destacar que los genes *GA20ox* y *GA3ox* se expresan específicamente en las semillas jóvenes poco después de la fecundación, pero no en las valvas (Hu *et al.*, 2008; Dorsey *et al.*, 2009) (Figuras 1.3, 3.7, 3.8B y 3.8C). Todos estos datos coinciden con lo observado en trabajos previos de otros autores (Hu *et al.*, 2008; Arnaud *et al.*, 2010; Plackett *et al.*, 2012). La única excepción es el gen *GA3ox1*, que no se expresa en semillas jóvenes, pero se expresa en el septum, en el funículo y el receptáculo del fruto (Figura 3.8A).

Aunque no hay evidencias de la biosíntesis directa de GAs en las valvas, éstas deben estar presentes en la valva para promover el crecimiento y elongación del fruto. Los análisis del patrón de expresión espacial indican que las GAs en semillas pueden ser percibidas por GID1A y GID1B, y que GID1A y GID1C son los responsables de la percepción de GAs en las valvas. Por lo tanto, las GAs

bioactivas en la valva que promueven la elongación del fruto deben ser transportadas desde las semillas en desarrollo y/o tejidos circundantes. La forma en cómo las GAs son transportadas hacia la valva, mediante un mecanismo activo o de modo pasivo, es un tema que está aun por resolver.

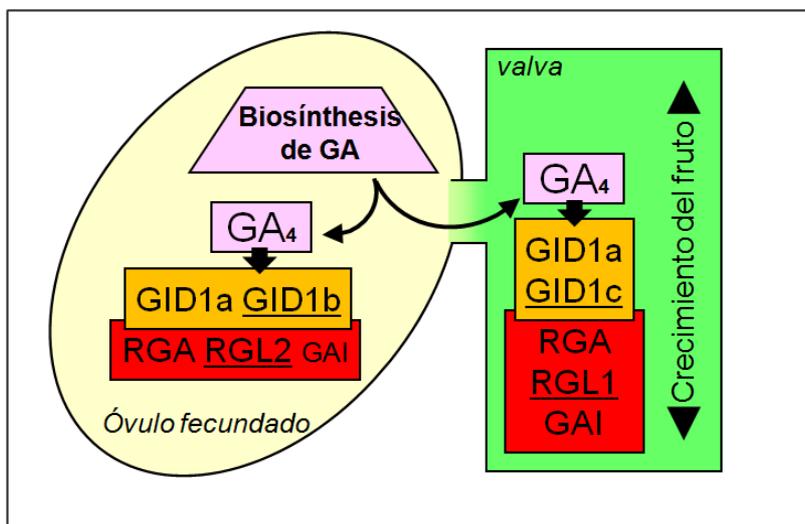
### **3.7.2. Los GID1 y las DELLA se co-expresan en el pistilo durante la formación del fruto**

La señalización por GAs ocurre a través de una interacción dependiente de GAs de los GID1 con las proteínas DELLA (Sun, 2011; Daviere y Achard, 2013). Por otra parte la interacción GID1-DELLA solamente es posible si ambas proteínas están presentes en el mismo tiempo y lugar. El análisis de la expresión y localización espacial de las DELLA y GID1, sugiere algunas combinaciones de estas proteínas que potencialmente interactúan *in vivo* para desencadenar la cascada de respuesta a GAs en el pistilo. De forma contraria, existen combinaciones GID1-DELLA que no pueden ocurrir ya que no existe co-expresión. Hemos observado que GID1A, RGA y GAI se expresan en todo el pistilo. Proponemos que las interacciones GID1A-GAI y GID1A-RGA explicarían la mayor parte de los procesos mediados por GAs tanto en óvulo como en valvas. Además de éstas, la interacción GID1B-RGL2 ocurre solamente en óvulos y la interacción GID1C-RGL1 tiene lugar exclusivamente en las valvas. Las dos últimas interacciones pueden explicar respuestas específicas de tejido en procesos mediados por GAs asociados al cuajado y desarrollo del fruto. Por ejemplo, la interacción GID1B-RGL2 tiene una función en la fertilidad y el desarrollo de las semillas, mientras que la interacción GID1C-RGL1 mediaría procesos durante el crecimiento del fruto y en la expansión de la valva.

Además de los patrones de co-expresión, la afinidad diferencial a nivel molecular de los GID1 por las DELLA también puede ser otro factor que afecte la capacidad de estas proteínas de interactuar (Nakajima *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2009). Por ejemplo, ensayos *in vitro* han revelado que existe una fuerte afinidad entre las proteínas RGA-GID1B, RGL2-GID1A y GAI-GID1B (Suzuki *et al.*, 2009). Resulta muy revelador que todas ellas se co-expresan en óvulos/semillas. Además RGL1

interacciona fuertemente con *GID1A* y *GID1C* (Suzuki *et al.*, 2009), estando todos ellos co-expresados en las valvas. Por el contrario *RGL1* y *RGL2* interaccionan *in vitro* con muy baja afinidad con *GID1B* y *GID1C*, respectivamente. Hay que destacar que estos pares *RGL1-GID1B* y *RGL2-GID1C* no se co-expresan en los pistilos, lo que sugiere que debe existir un proceso de co-evolución de los *GID1* y las *DELLA* reflejados en los patrones diferenciales de expresión y en los grados de afinidad de las interacciones. Sería necesario saber si estos genes se co-expresan o no en otros tejidos de la planta para poder confirmar esta hipótesis.

En la figura 3.17 se representa un esquema de las posibles interacciones de los *GID1* y las *DELLA* en el pistilo, basándonos en la expresión y localización espacial como en los análisis de los fenotipos mutantes. Las GAs sintetizadas en las semillas serían percibidas por *GID1A* y *GID1B*, que interaccionarían especialmente con *RGA*, *GAI* y *RGL1*. Las GAs deberían ser transportadas activa o pasivamente hasta la valva donde serían percibidas por *GID1A* y *GID1C*, los cuales interaccionarían con *RGA*, *GAI* y *RGL2*.



**Figura 3.17. Modelo espacial de la biosíntesis, percepción y señalización de GAs en semillas y valvas.** Las GAs bioactivas, principalmente  $GA_4$ , se sintetizan en semillas en desarrollo por la actividad de las *GA20ox* y *GA3ox*. En óvulos fecundados las GAs son percibidas por *GID1A* y *GID1B*, que interaccionan con *RGA*, *GAI*, y *RGL2* para promover la señalización específica de semillas. Las GAs deben ser transportadas hacia la valva y percibidas por *GID1A* y *GID1C*, que pueden interaccionar con *RGA*, *GAI*, and *RGL1*, para promover la respuesta específica en la valva (principalmente el alargamiento de la silicua y la degradación del endocarpo *a*). Las proteínas con un patrón espacial específico de tejido son subrayadas.

Teniendo en cuenta la expresión y localización espacial de los genes de biosíntesis de GAs, de los *GID1* y las *DELLA*, podemos identificar sitios potenciales de síntesis-percepción-señalización. Por ejemplo *GA20ox2* y *GA3ox4* junto con *GID1B* y *RGA* se co-localizan en la chalaza del endospermo en semillas. Además *GID1B* y *RGA* tienen una fuerte afinidad *in vitro*, incluso en presencia de bajas concentraciones de  $GA_4$  ( $10^{-8}$  M  $GA_4$ ), condiciones en las cuales no existe interacción de otras combinaciones *GID1-DELLA* (Nakajima *et al.*, 2006).

Finalmente, la síntesis de GAs en la chalaza ha sido asociada con la elongación de la silicua (Hu *et al.*, 2008). Los datos indican que además de una fuente de GAs para la elongación de la silicua, la síntesis en el endospermo puede también mediar los procesos dependientes de GAs en la semilla, que estarían mediados principalmente por *GID1B* y *RGA*.

### **3.7.3. Los receptores *GID1* tienen redundancia parcial en la fertilidad y el crecimiento del fruto**

Los datos de expresión y el análisis de los fenotipos de los mutantes indican que los *GID1* tienen funciones redundantes en el crecimiento de la planta (Griffiths *et al.*, 2006; Iuchi *et al.*, 2007; Nakajima *et al.*, 2006). Nuestro análisis sugiere que existe una redundancia funcional parcial en la formación y el desarrollo del fruto, que correlaciona de manera consistente con la distribución espacial en la expresión de estos genes. La pérdida funcional de *GID1A*, el cual está presente de manera más abundante en casi todos los tejidos del pistilo, da como resultado una reducción significativa en la fertilidad. De igual forma la pérdida funcional de *GID1A* y *GID1B*, ambos expresados en óvulos, resulta en una mayor pérdida de fertilidad, indicando que ambos genes son redundantes en el óvulo. En contraste la mutación de *GID1A* y *GID1C*, ambos genes expresados en las valvas, genera una limitada elongación de la silicua y una total insensibilidad del pistilo a las GAs exógenas, indicando una redundancia de ambos genes en el crecimiento promovida por GAs en la valva.

La reducción en la longitud de la silicua y el bajo rendimiento de semillas fue previamente correlacionado con el acortamiento de los filamentos de las anteras,

lo cual reduce la polinización (Griffiths *et al.*, 2006; Iuchi *et al.*, 2007). Estos resultados estaban acorde con los niveles de expresión similar de *GID1A* y *GID1B* en los filamentos (Suzuki *et al.*, 2009). Sin embargo, hemos demostrado que el doble mutante *gid1a gid1b*, el cual no tiene actividad de los receptores *GID1* en los óvulos, muestra una reducida producción de semillas incluso cuando este mutante es polinizado con polen parental, lo que elimina los defectos causados en las anteras o polen (Iuchi *et al.*, 2007). Estos resultados indican que la reducida producción de semillas en el mutante *gid1a gid1b* es debido a defectos en el tejido materno, posiblemente por la ausencia de los receptores de GAs en el óvulo (*GID1A* y *GID1B*). Además, la expresión de *GID1C* en el doble mutante *gid1a gid1b* no está inducida descartando la posibilidad de un mecanismo compensatorio. Finalmente, una posible expresión residual de *GID1C* en las semillas del doble mutante *gid1a gid1b* no sería suficiente para promover la señalización debido a su limitada afinidad con las *DELLA* presentes en los óvulos/semillas (*GAI*, *RGA* y especialmente *RGL2*) (Suzuki *et al.*, 2009). Es importante mencionar que el doble mutante *gid1a gid1b* aún conserva la facultad, aunque limitada, de producir semillas, a pesar de la falta de receptores en los óvulos. Esto sugiere que debe existir una vía alternativa independiente de GAs que potencialmente promueve la formación de semillas. No es posible saber si esta función recae en *GID1C*, debido a que el triple mutante *gid1a gid1b gid1c* muestra un fuerte fenotipo de deficiencia a GAs y no llega a producir flores viables.

En contraste con *gid1a gid1b*, el doble mutante *gid1a gid1c* muestra un acortamiento en la longitud de la silicua con una leve reducción en el número de semillas, incluso cuando es polinizado con el polen parental, indicando que este fenotipo es también debido a un defecto materno. Se sabe que hay una relación estrecha entre el número de semillas y la longitud del fruto y que esta relación puede ser atribuida a la síntesis en las semillas de la señal de promoción de crecimiento, probablemente las GAs, que pueden ser transportadas desde las semillas hacia la vaina y de esta forma promover su crecimiento (Cox y Swain, 2006; Hu *et al.*, 2008; Dorcey *et al.*, 2009). Como el doble mutante *gid1a gid1c* tiene un número de semillas suficiente como para sintetizar GAs a los niveles

suficientes como para promover el crecimiento de la silicua, la reducida longitud de silicua puede ser el resultado de una limitada respuesta de GAs en la vaina. Por ejemplo, los pistilos de *gid1a gid1c* no responden a los tratamientos con GAs indicando una casi total insensibilidad. El defecto en la elongación de la silicua puede ser equivalente al fenotipo enano causado por la eliminación de *GID1A* y *GID1C*, lo que coincide con que ambos genes se expresan en los tallos de las inflorescencias (Iuchi *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009). De forma similar a la respuesta partenocárpica, la elongación del hipocotilo en respuesta a GAs está bloqueada en este mutante, al igual que en el triple mutante *gid1a gid1b gid1c* mientras que los otros dobles mutantes y los mutantes simples responden de forma similar a las plantas parentales (Willige *et al.*, 2007). Por lo tanto la co-expresión en los pistilos y tallos, sumada a un fenotipo insensible a GAs en el doble mutante, sugiere que *GID1A* y *GID1C* son responsables de la percepción de GAs en ambos tejidos para producir su crecimiento dependiente de GAs.

El doble mutante *gid1b gid1c* no muestra ningún fenotipo, indicando que la actividad de *GID1A* presente en casi todos los tejidos del pistilo es suficiente para llevar a cabo la percepción a GAs sin ninguna alteración en el crecimiento y el desarrollo. Además, la expresión de *GID1A* en el doble mutante *gid1b gid1c* está ligeramente aumentada tanto en plántula como en pistilos (Figura 3.13), compensado la pérdida de los otros dos receptores, contribuyendo a un normal desarrollo de este mutante. De forma contraria a *GID1A*, no se observó ninguna alteración en la expresión de *GID1B* o *GID1C* ni en plántula ni en pistilos en los dobles mutantes *gid1a gid1c* y *gid1a gid1b*, respectivamente.

No existe evidencia que indique que la falta de defectos severos en cualquiera de los mutantes simples o dobles *GID1* sea debido a un aumento de la expresión de los genes restantes funcionales. Sin embargo se sabe que la expresión de *GID1A* y *GID1B* (pero no la de *GID1C*) está controlada de manera dependiente por el mecanismo de retroalimentación promovido por la actividad DELLA (Middleton *et al.*, 2012). Por lo tanto, la inducción de *GID1A* en el mutante *gid1b gid1c* puede ser consecuencia del mecanismo de retroalimentación. La reducida percepción de GAs por la eliminación de *GID1B* y *GID1C* puede incrementar los niveles de DELLA, derivando en una sobreexpresión de *GID1A*. Al contrario de lo

que sucede con el gen *GID1A*, la expresión de *GID1B* no aumenta en plántula o pistilo del doble mutante *gid1a gid1c*. Sin embargo, se ha descrito la inducción de la expresión de *GID1B* en botones florales del mutante *gid1a gid1c* (Suzuki *et al.*, 2009). Todas estas observaciones sugieren que el mecanismo de retroalimentación puede estar regulado de un modo u otro según los diferentes tejidos o procesos de desarrollo.

En resumen, nuestros datos indican que existe una redundancia funcional parcial de los receptores GID1 en el pistilo y en los frutos. GID1A en combinación con GID1B y GID1C perciben las GAs necesarias para la producción de semillas y el crecimiento del fruto, respectivamente. Por otro lado GID1A-GID1B y GID1A-GID1C podrían ser redundantes en la percepción de GAs en la semilla y la valva, respectivamente, según los fenotipos de los dobles mutantes. La distribución de los receptores de GAs en las valvas en conjunto con la expresión de los genes de la última fase de biosíntesis, sugiere claramente que existe un transporte de GAs desde las semillas hacia la valva para promover el crecimiento del fruto.

Finalmente, la co-expresión de los genes *GID1* y *DELLA* en diferentes tejidos del pistilo revela que existen procesos de desarrollo del fruto dependientes de GAs que son específicas de cada interacción GID1-DELLA. Un análisis más detallado de estas interacciones y el estudio de sus implicaciones específicas en cada tejido son necesarios para profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares por los cuales las GAs median el crecimiento y desarrollo del fruto. Por ejemplo, se sabe que las GAs controlan también la diferenciación de la zona de dehiscencia a través de la actividad de la GA3ox1 y la interacción de las proteínas DELLA con los genes de desarrollo *INDEHISCENT* y *ALCATRAZ* (Arnaud *et al.*, 2010). De acuerdo a esto, GID1A y GID1C, junto con RGA, GAI y RGL1, todos ellos expresados en la zona de dehiscencia, pueden estar participando en la abscisión de la silicua.



# 4- Resultados y Discusión

## Capítulo 2

*Análisis transcriptómico del fruto  
e identificación de dianas directas  
de DELLA en fructificación*



#### 4.1. Análisis transcriptómico de los eventos tempranos en la formación del fruto

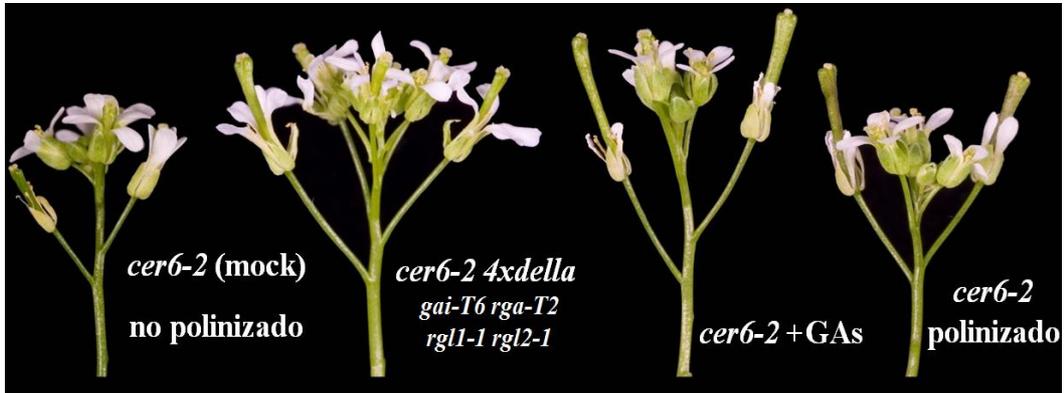
Las GAs desempeñan una función instructiva clave en el control de los procesos de formación del fruto. Numerosos resultados de tipo fisiológico, genético y molecular apoyan dicha hipótesis. Entre los más ilustrativos destacan: a) la formación de frutos partenocárpicos como consecuencia de aplicaciones exógenas de GA<sub>3</sub> sobre pistilos emasculados y no polinizados en *Arabidopsis* (Figura 4.1) o en especies de interés agronómico, simulando así el efecto de las GAs que son producidas en condiciones normales tras la polinización; b) la generación del fenotipo partenocárpico observado en el mutante *4xdella* en *Arabidopsis* (Figuras 4.1 y 4.2), o en tomate al eliminar el gen *SIDELLA* (Martí *et al.*, 2007; Carrera *et al.*, 2012).

Se conoce que las GAs controlan el crecimiento y desarrollo en la planta a través de complejas redes regulatorias que integran programas de desarrollo internos y programas de respuesta a factores medioambientales. En esta integración, las proteínas DELLA juegan un papel central, al causar una reprogramación transcripcional mediante la interacción con otros factores transcripcionales y/o modulando los cambios de expresión génica en los genes diana (Sun, 2011; Claeys *et al.*, 2014). Por lo tanto, el estudio de los cambios de expresión génica asociados a la actividad de las proteínas DELLA durante las fases tempranas del crecimiento del fruto es crucial para elucidar como las GAs regulan este proceso.

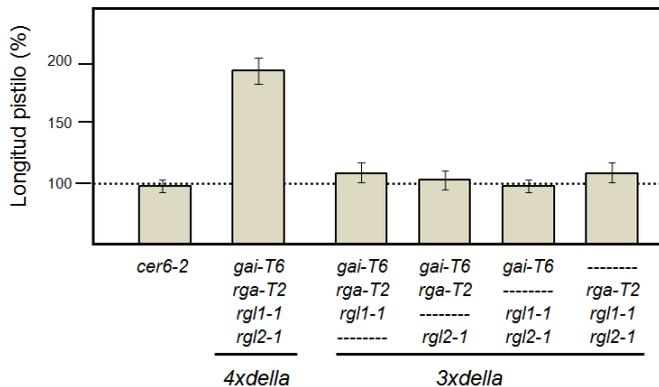
Con el objetivo de identificar qué genes están regulados por la ruta de señalización de GAs y son diana de las proteínas DELLA, participando en las fases tempranas de la formación del fruto de *Arabidopsis*, hemos realizado un análisis transcriptómico de frutos partenocárpicos, obtenidos tanto por pérdida de función de los genes DELLA o por tratamientos con GAs, y de frutos polinizados (Figura 4.1).

Con el fin de evitar la emasculación de las flores y poder obtener pistilos no polinizados en cantidad suficiente para este tipo de análisis, se utilizó el mutante estéril condicional *cer6-2* (Preuss *et al.*, 1993; Fiebig *et al.*, 2000). En este mutante los óvulos no se pueden fecundar ya que en condiciones de baja humedad no se

puede realizar la polinización al carecer el polen de componentes necesarios en la cubierta. El uso de este mutante permite además controlar de forma muy precisa el inicio de la fructificación ya sea por tratamientos hormonales o polinización manual. Para obtener un mutante partenocárpico se realizó la introgresión del alelo mutante *cer6-2* en homocigosis en el mutante *4xdella* mediante cruces genéticos reiterados y genotipado por PCR.



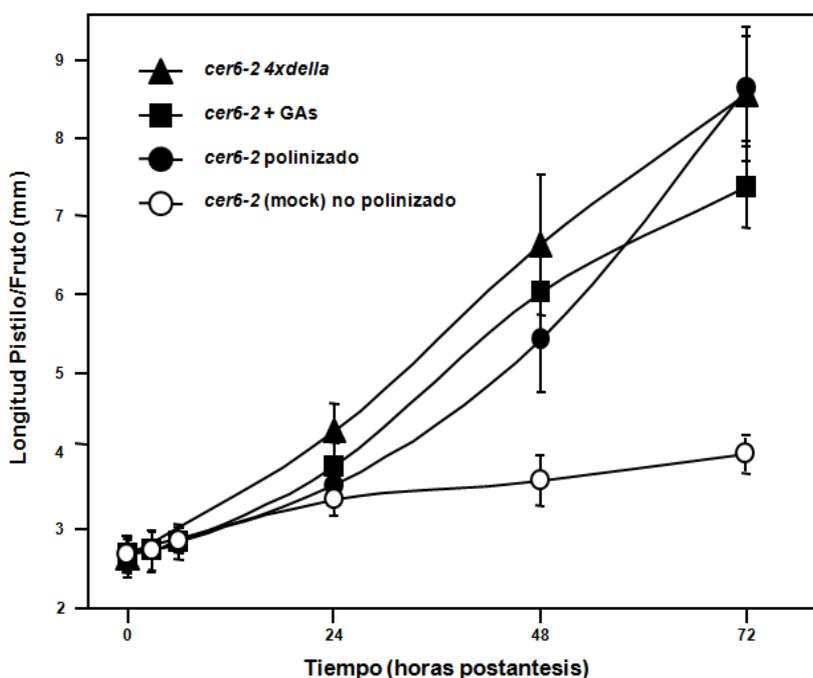
**Figura 4.1. Desarrollo del fruto partenocárpico en el mutante *4xdella* y en plantas con pistilos tratados con  $GA_3$ .** Imágenes de inflorescencias con frutos de plantas *cer6-2* control (mock), de mutantes *4xdella* y plantas tratadas con  $GA_3$ , así como frutos obtenidos por polinización.



**Figura 4.2. Desarrollo de frutos partenocárpicos por la pérdida de función de 4 de las 5 proteínas DELLA de *Arabidopsis*.** Se representa la longitud de los frutos del control *cer6-2* no polinizado, y los mutantes *4xdella* y *3xdella*. Sólo el mutante *4xdella* presenta un incremento significativo en la longitud del pistilo en ausencia de polinización, mostrando una partenocarpia constitutiva parcial (Adaptado de Dorcey *et al.*, 2009). Se representa el tamaño del fruto en relación a los pistilos no polinizados de *cer6-2*.

Para comprobar la efectividad de los tratamientos con GAs y el comportamiento del mutante *4xdella* se analizó primero la longitud de los frutos partenocárpicos

y los pistilos polinizados y no polinizados, durante las fases tempranas del desarrollo tras la antesis, a 0, 24, 48 y 72 hpa (horas post antesis o tras el tratamiento) (Figura 4.3). Se observó que los pistilos no polinizados en antesis del mutante *4xdella* son similares en tamaño a los pistilos parentales *cer6-2*, pero muestran desde ese momento activada la maquinaria molecular de formación del fruto, aumentando su longitud de forma progresiva tras la antesis. El tratamiento con GAs resultó igualmente en una inducción rápida a tiempos cortos de la longitud del fruto muy similar al mutante *4xdella*. Por tanto, los frutos partenocárpicos obtenidos por aproximación genética y farmacológica parecen seguir los mismos procesos de crecimiento a tiempos cortos que los frutos polinizados y por ende su análisis nos permite identificar los genes dependientes de GAs que son rápidamente activados para dar lugar a la formación del fruto.



**Figura 4.3. Evolución de la longitud de frutos partenocárpicos del mutante *4xdella* y tras el tratamiento con GA<sub>3</sub>, en comparación con pistilos control *cer6-2* no tratados y frutos polinizados.** Se representa la longitud de los pistilos no polinizados ni tratados (mock) de *cer6-2*, de los frutos partenocárpicos obtenidos por tratamientos con GA<sub>3</sub> (GAs) y obtenidos por pérdida de función de las proteínas DELLA (*4xdella*) y de frutos polinizados, durante los primeros 3 días de desarrollo tras la antesis o el tratamiento. Para cada tiempo y genotipo o tratamiento se determinó la longitud de al menos 60 pistilos o frutos. Se representa la media  $\pm$  SD.

Nuestra hipótesis es que los eventos transcriptómicos comunes en frutos partenocárpicos y frutos polinizados indicarían cuáles son los sucesos moleculares y biológicos que tienen lugar en las fases tempranas de la formación del fruto en *Arabidopsis*, en especial aquellos regulados por GAs.

#### 4.1.1. Diseño experimental del análisis transcriptómico

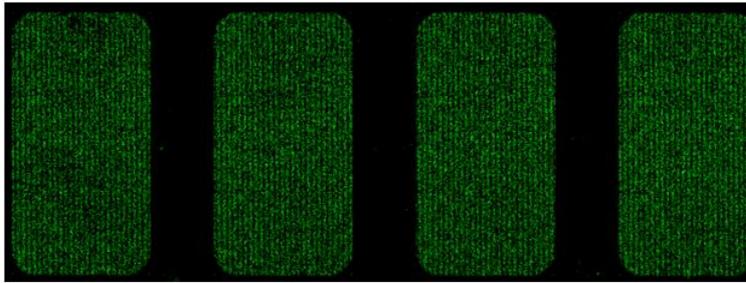
Para realizar el análisis transcriptómico empleamos el mutante *cer6-2* crecido en humedad relativa menor al 50% lo que provoca esterilidad. Como control se utilizaron los pistilos *cer6-2* no polinizados y recolectados a las 0, 3, 6, 24, 48, y 72 hpa y se compararon con frutos de tres condiciones distintas: frutos partenocárpicos inducidos por el tratamiento de pistilos de *cer6-2* con GA<sub>3</sub> y recolectados a las 3, 6, 24, 48 y 72 hpa; frutos partenocárpicos del mutante *4xdella* en el fondo *cer6-2* y recolectados a las 0, 24, 48 y 72 hpa y frutos *cer6-2* obtenidos por polinización manual con polen *Ler* y recolectados a las 24, 48 y 72 hpa (Figura 4.4).

Tiempo Postantesis Tratamiento	0h	3h	6h	24h	48h	72h
	 <i>cer6-2</i> (mock) no polinado	✓	✓	✓	✓	✓
 <i>cer6-2 4xdella</i> ( <i>gai-T6 rga-T2</i> <i>rgl1-1 rgl2-1</i> )	✓			✓	✓	✓
 <i>cer6-2</i> + GAs		✓	✓	✓	✓	✓
 <i>cer6-2</i> polinado				✓	✓	✓

**Figura 4.4. Diseño experimental del análisis transcriptómico.** Se representan las diferentes muestras evaluadas y el tiempo de recolección: *cer6-2* no polinado (mock-control), mutante *cer6-2 4xdella* (partenocárpico), *cer6-2* tratado con GA<sub>3</sub> (partenocárpico) y *cer6-2* polinado manualmente con polen *Ler*.

Se recogieron 5 réplicas biológicas, 4 de las cuales se utilizaron para los análisis de micromatrices mientras que la 5ª réplica se reservó para análisis complementarios posteriores. Las muestras se utilizaron para el marcaje con el fluoróforo Cy5, tal como se describe detalladamente en Materiales y Métodos. Para el análisis transcriptómico se utilizaron las micromatrices v4 de Agilent para *Arabidopsis* con 44.000 oligonucleótidos (Figura 4.5), en un diseño de un único color (Agilent Single Color 21169), distribuyendo las muestras al azar pero evitando que 2 réplicas biológicas coincidieran en el mismo cristal (Gautier *et al.*, 2004).

## Agilent



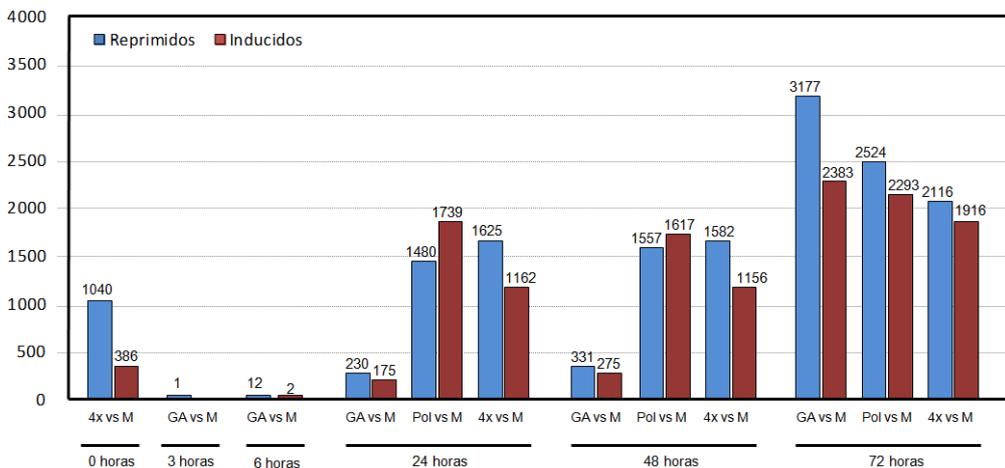
**Figura 4.5. Micromatrices v4 de Agilent único color.** Imagen de un cristal con 4 micromatrices de 44.000 sondas cada una.

Tras la hibridación, las micromatrices se escanearon y se analizaron las imágenes obtenidas usando el programa Feature Extractor 9.5.1.1 (Agilent). El procedimiento de normalización y filtrado de las señales de hibridación se detalla en Materiales y Métodos. Solo se consideraron sondas para las cuales se disponía de al menos 3 datos válidos de las 4 réplicas biológicas. Finalmente se obtuvieron datos para 34.537 sondas que superaron todos los controles de calidad impuestos. Para identificar a qué genes correspondían estas sondas, se realizó un nuevo análisis de anotación de todas las sondas de la micromatriz a partir de su secuencia mediante análisis BLAST contra la base de datos de *Arabidopsis* (TAIR BLAST 2.2.8). Se constató que un número significativo de sondas no correspondían aparentemente a ningún gen de *Arabidopsis* (3.254 sondas), mientras que otras podrían hibridar con más de un transcrito distinto (516 sondas). Por tanto, todas estas sondas se eliminaron de modo que

finalmente se disponía de datos para 30.767 sondas que corresponden a 22.744 genes, los cuales se utilizaron en los análisis posteriores.

#### 4.1.2. Análisis estadístico e identificación de los genes diferencialmente expresados durante el desarrollo temprano del fruto

Con las sondas que superaron todos los controles de calidad anteriormente citados, se realizó una búsqueda de genes con expresión diferencial entre las distintas condiciones biológicas. Se usó el software GeneSpring (Anexo 1) para realizar un t-test aplicando una corrección de tipo Benjamini Hochberg FDR con valor  $p \leq$  de 0,05 entre cada muestra y su correspondiente mock. Además se seleccionaron aquellos que presentaron un cambio de expresión de al menos dos veces superior (inducido) o inferior (reprimido) con respecto a los niveles de la muestra control, obteniendo un total de 28.779 genes diferenciales comunes entre distintas condiciones (Figura 4.6), lo que conlleva que un mismo gen se contabiliza "n" veces si aparece diferencial en "n" comparaciones de muestras dos a dos. Eliminando esta redundancia, finalmente se obtiene un listado de 10.977 valores únicos o genes diferencialmente expresados en al menos una comparación.



**Figura 4.6. Resultado del análisis estadístico de datos transcriptómicos: Identificación de 10.977 genes diferencialmente expresados.** Se muestra el número de genes diferenciales, según el resultado del t-test 'unpaired p-value  $\leq 0,05$ ' con nivel de cambio de expresión (Fold Change)  $\geq 2$  ó  $\leq 2$ , aplicado a cada una de las muestras comparadas con la muestra mock (M) correspondiente a cada tiempo. El número de genes reprimidos o inducidos se representa en las cajas de color azul o rojo, respectivamente. M, mock; 4x, mutante *4xdella*; GAs, tratado con GA<sub>3</sub>; Pol, polinizado.

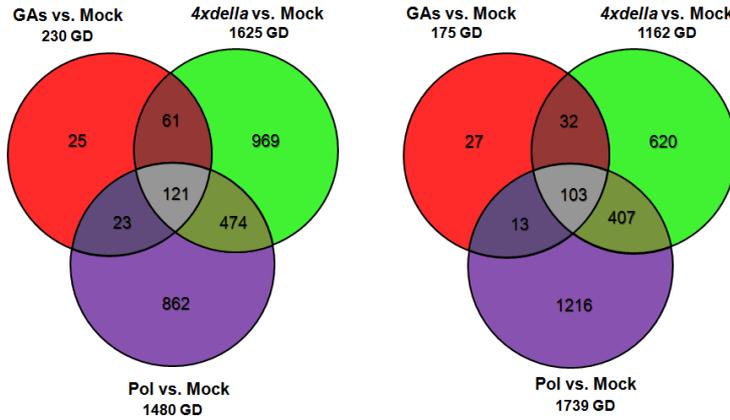
A continuación, se realizaron diagramas de Venn para identificar el grupo de genes diferenciales que son comunes o específicos para cada tiempo/tratamiento. Hay un total de 2.041 genes comunes en toda la serie temporal (Figura 4.7). Se observa que el porcentaje de genes comunes en las tres categorías se incrementa conforme pasa el tiempo, desde de un 3,5% a las 24 hpa (224 genes, 121 inducidos y 103 reprimidos) y 3,2% a las 48 hpa (208 genes, 145 inducidos y 63 reprimidos), a un 11% a las 72 hpa (1.609 genes, 822 inducidos y 787 reprimidos), lo que refleja el aumento del número total de genes diferenciales en cada comparación, especialmente en el tratamiento de GAs a las 72 hpa. Este aumento de genes comunes sugiere que los tres procesos van convergiendo paulatinamente a un perfil de expresión génica común asociado al desarrollo del fruto, independiente del factor que desencadena la fructificación.

Por otra parte, se observa que la inducción con GAs es la que menor número de genes diferencialmente expresados presenta en los tiempos 24 y 48 hpa, comparado con el *4xdella* o el fruto polinizado; sin embargo a las 72 hpa el número de genes diferenciales incrementa considerablemente, llegando a ser mayor que los diferenciales en el *4xdella* o en frutos polinizados. La expresión de un reducido número de genes diferenciales de respuesta rápida tras el tratamiento con GAs, sugiere que este tratamiento en etapas tempranas no logra mimetizar por completo los eventos transcriptómicos que ocurrirían tras la polinización o bien estos eventos ocurren con retraso. Por el contrario, observamos que el número de los genes comunes entre el *4xdella* y el polinizado es alto en las primeras fases, a 24 y 48 hpa (con 1.749 genes comunes, un 15%), pero disminuyen considerablemente a las 72 hpa (con 767 genes comunes, equivalente al 8%). Este descenso podría ser consecuencia de los procesos asociados al desarrollo de las semillas que ocurre en el polinizado, que no estarían presentes en los frutos partenocárpicos del *4xdella*.

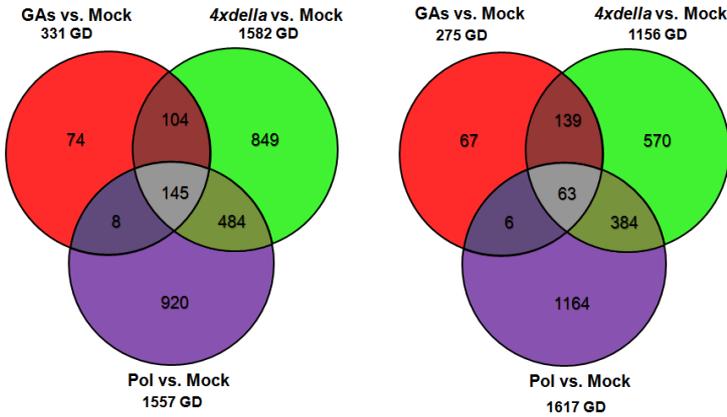
**Represión**

**Inducción**

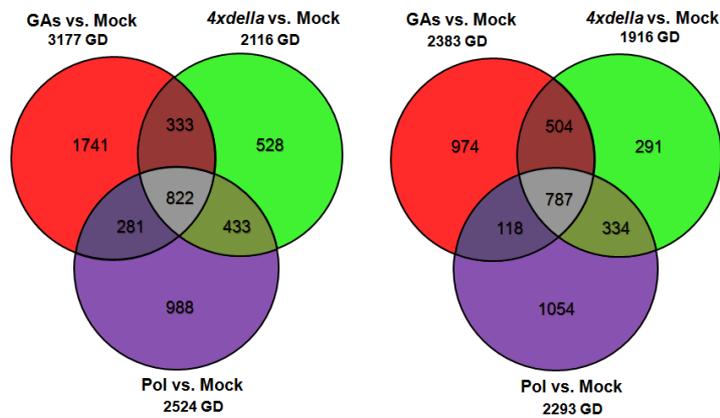
**24 hpa**



**48 hpa**



**72 hpa**



**Figura 4.7. Análisis por diagramas de Venn para identificar genes diferencialmente expresados que son comunes o específicos a cada tratamiento en los diferentes tiempos analizados.** Se representa el grupo de genes diferenciales comunes reprimidos ('fold change' ≤2) e inducidos ('fold change' ≥2) a las 24 hpa, 48 hpa y 72 hpa. hpa: horas post antesis o tratamiento; GD: Genes diferencialmente expresados.

### 4.1.3. Análisis de enriquecimiento de términos de Ontología Génica (GO)

Con el fin de identificar los procesos biológicos subyacentes en las tres condiciones evaluadas, y deducir los componentes biológicos implicados en la formación del fruto, se realizó un análisis de enriquecimiento de categorías funcionales utilizando la herramienta web de análisis de ontología de genes y base de datos AgriGO (GO Analysis toolkit and Database for Agricultural Community; Du *et al.*, 2010). Los términos de ontología génica (Gene Ontology, GO) sobre-representados en los grupos de genes diferenciales se identificaron utilizando el algoritmo de análisis de enriquecimiento singular (SEA) de genes (Anexo 2, listado de categorías GO y Anexo 3, gráficos jerárquicos).

El mayor término GO sobre-representado entre los genes reprimidos en las tres condiciones y en toda la serie temporal es la respuesta a estímulos de GAs. A las 0 hpa en el *4xdella* (Tabla Suplementaria 1.2) esta categoría está conformada por 20 genes entre los que destacan, además de las 4 proteínas DELLA con pérdida de función en este mutante, *GID1A*, *GID1B*, *GA3ox1* y *GA20ox2*, es decir genes de la síntesis y señalización de GAs, lo que era de esperar como respuesta a su regulación por las proteínas DELLA según el mecanismo 'feedback'. Asimismo este término es también significativo en sucesivos tiempos tras la antesis en las tres condiciones, a las 24, 48 y 72 hpa; esta categoría está conformada por 8, 10 y 22 genes, respectivamente entre los que destacan *GID1A*, *GID1B*, *SCL3*, *XERICO*, *BOI*, *SNEEZY* (Tablas Suplementarias 1.5, 1.7 y 1.9) genes que son regulados positivamente por las proteínas DELLA.

Relacionado con el mismo mecanismo, en pistilos tratados con GAs a las 24 y 48 hpa y en el *4xdella* entre las 0-48 hpa (Anexo 2) aparece entre los genes reprimidos, una sobre-representación de los términos GO asociados a los procesos de biosíntesis de GAs y ruta de señalización de GAs (Figura 4.8A).

Los procesos biológicos sobre-representados exclusivamente en los frutos polinizados y que solo se activan a las 24 horas en los genes inducidos son aquellos ligados al desarrollo del polen y al tubo polínico, con alrededor de 500 genes, muchos de estos relacionados con procesos de reducción oxidativa, actividad quinasa, desarrollo del tubo polínico, guía del polen y polinización,

tales como *PPME1*, *AGP6*, *RIC1* ó *GCS1* (Anexo 2 y Figura 4.8B). Este resultado es predecible si se tiene en cuenta que los frutos polinizados son los únicos en los que se produce la polinización efectiva y desarrollo de los tubos polínicos, además de los eventos tempranos tras la fecundación de los óvulos. Contrariamente, los términos GO asociados al desarrollo del polen y el tubo polínico están sobre-representados significativamente entre los genes reprimidos en toda la serie temporal en el *4xdella* (Anexo 2 y Figura 4.8A). Estos resultados se explican si se considera que en los pistilos del *4xdella* hay menor deposición de polen debido a la descoordinación del desarrollo del pistilo y las anteras. Hay que señalar que en todas las variantes estudiadas, incluida el mock, hay polen aunque éste no germina en el mutante *cer6-2*, a excepción de los frutos polinizados, siendo la cantidad menor en el *4xdella*.

Llama la atención que categorías GO relacionadas con procesos de pared celular aparecen sobre-representados desde los tiempos más tempranos entre los genes inducidos en el *4xdella*, mientras que en las otras condiciones aparecen a tiempos posteriores (Anexo 2 y Figura 4.8B). Por ejemplo, estos términos se activan de manera significativa a partir de las 48 hpa en pistilos tratados con GAs y a las 72 hpa en los frutos obtenidos por polinización, de modo que a las 72 hpa parece un proceso común para las 3 condiciones (Tabla Suplementaria 1.12). En él participan más de 600 genes, como genes asociados a biosíntesis de carbohidratos y polisacáridos (Figura 4.8B). El adelanto en la expresión de los genes relacionados con pared celular en el *4xdella* se explica por el ligero adelanto en el crecimiento que muestran los frutos partenocárpicos *4xdella*, según se observa en la Figura 4.3.

Además de estas categorías, no se identificaron otras que aparecieran de forma continua en el tiempo y fueran compartidas por las tres condiciones, de forma que sugiriesen un claro patrón común. Sin embargo, hay categorías diferenciales en determinadas condiciones o momentos del desarrollo que pueden aportar información sobre los eventos que tienen lugar durante el desarrollo del fruto.

Por una parte, hay diferentes procesos biológicos enriquecidos entre los genes inducidos en algunas condiciones, asociados a la promoción de la división y

expansión celular, es decir al crecimiento. Por ejemplo, se presenta un sobre-representación a las 24 hpa de los genes inducidos en las tres condiciones en los procesos de división celular (9 genes), ciclo celular (18 genes), citocinesis (9 genes) y replicación de ADN (12 genes) (Tabla Suplementaria 1.6 y Figura 4.8B). En esta categoría son representativos genes de regulación de meiosis *ASY3*, de control de la división celular, como *CDC6*, genes involucrados en la morfogénesis de microtúbulos, como *ATHK5*, *MAP65-5* o involucrados en la regulación del ciclo celular a través de la proteína quinasa, como el *CYCBI*. Esto indica que tras las primeras 24 horas de crecimiento tiene lugar un aumento de división y diferenciación celular, como consecuencia del cambio de patrón de crecimiento del pistilo para transformarse en un fruto.

Del mismo modo, los términos GO de síntesis y metabolismo de brasinoesteroides aparecen significativamente enriquecidos entre los genes inducidos a partir de las 24 hpa en el *4xdella*, mientras que aparecen a las 72 hpa en pistilos tratados con GAs y en frutos polinizados (Anexo 2 y Figura 4.8B). A las 72 hpa esta categoría compartida en las tres condiciones está formada por 44 genes (Tabla Suplementaria 1.12). Se sabe que los brasinoesteroides están implicados en la promoción de respuestas de expansión, división y diferenciación celular en los tejidos en crecimiento y como se ha expuesto previamente, todas las condiciones experimentan procesos de crecimiento y desarrollo aunque adelantados en el mutante *4xdella*. En relación con el mismo mecanismo, los términos GO relacionados con auxinas están sobre-representados en algunas categorías. Es así como la respuesta a estímulos de auxina está sobre-representada en genes inducidos en GAs y en el *4xdella* a las 72 hpa, mientras que el transporte de auxinas está sobre-representado en genes inducidos tras el tratamiento con GAs y frutos polinizados a las 72 hpa (Anexo 2 y Figura 4.8B). Las auxinas están relacionadas con la elongación celular de tal forma que la activación de estos procesos a las 72 hpa podría estar relacionada con una mayor elongación celular que da como resultados el aumento del tamaño de los frutos.

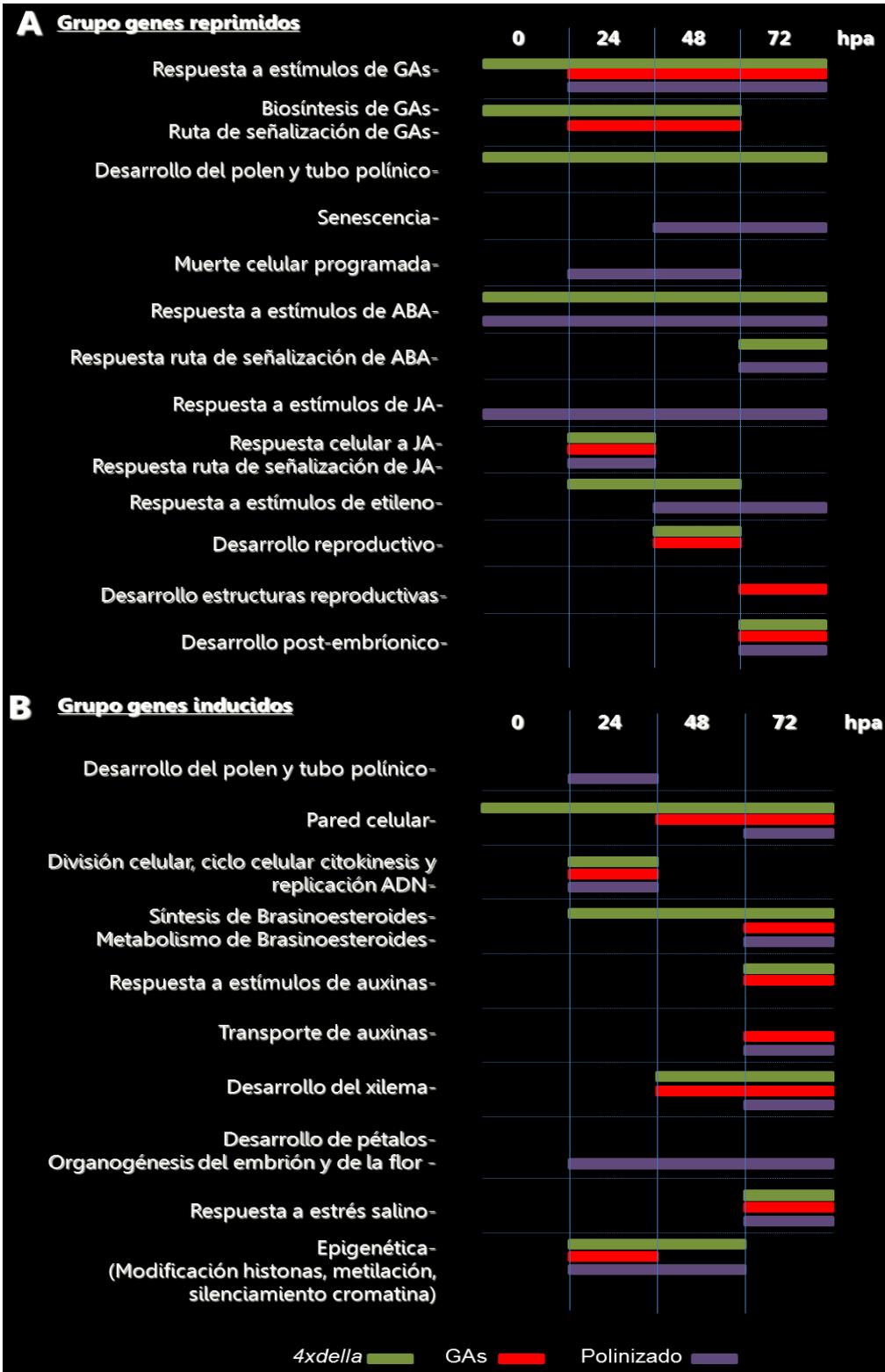


Figura 4.8. Esquema de los términos GO enriquecidos en los grupos de genes diferenciales de los tratamientos analizados. Se indican los términos GO enriquecidos entre el grupo de genes reprimidos (A) e inducidos (B) en los frutos partenocárpicos y polinizados durante toda la serie temporal.

Otros procesos biológicos significativamente sobre-representados en los genes inducidos asociados a procesos de desarrollo, son el desarrollo del xilema que aparece a las 48 horas en los genes inducidos tras el tratamiento con GAs y en el *4xdella* y a las 72 hpa es común en las 3 condiciones (Tabla Suplementaria 1.13). Se sabe que las interacciones entre auxinas y GAs determinan las velocidades relativas de producción del xilema, de tal forma que el desarrollo del cambium vascular alcanza un máximo con la presencia simultánea de auxinas y GAs (Rost *et al.*, 2005). De forma similar, hay otras categorías enriquecidas asociadas con eventos de desarrollo como el desarrollo de pétalos, la organogénesis del embrión y la organogénesis de la flor que se encuentran sobre-representadas en los genes inducidos en frutos polinizados durante toda la serie temporal (Anexo 2 y Figura 4.8B).

Por otra parte, hay diferentes procesos biológicos que muestran genes reprimidos para las diferentes condiciones que están asociados a senescencia ó a degradación de los tejidos que componen el fruto. Destacan las categorías de senescencia y muerte celular programada, con genes reprimidos en el polinizado a las 48-72 y 24-48 hpa, respectivamente (Anexo 2 y Figura 4.8A). Estas categorías están conformadas por 36 y 25 genes respectivamente, entre los que destacan *SWEET15*, *ARF1*, *ANAC092*, *ANAC047*, muchos de estos relacionados con la respuesta a la señalización de ABA. Sabemos que durante las primeras etapas tras la polinización, se reprime el programa de senescencia de diferentes órganos y tejidos que tendría lugar en pistilos no polinizados (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2010), especialmente la senescencia de los óvulos que no ocurren en los frutos polinizados pero si en las otras tres categorías.

Relacionado con lo anterior, hay términos GO asociados a las repuestas a estímulos y rutas de señalización de diferentes hormonas represoras del crecimiento que se encuentran enriquecidos con genes reprimidos en las distintas condiciones. Por ejemplo, la respuesta a estímulos de ABA aparece sobre-representada con genes reprimidos en el *4xdella* y el polinizado durante toda la serie temporal, o la respuesta a la ruta de señalización de ABA, con los genes reprimidos a las 72 horas para estas dos condiciones (Anexo 2 y Figura 4.8A). Se sabe que la restricción del crecimiento mediada por ABA es

dependiente de las proteínas DELLA (Colebrook *et al.*, 2014). Por lo tanto es congruente el hecho de que a bajos niveles de las proteínas DELLA tanto en el *4xdella* como en los frutos polinizados, se deriven alteraciones en una respuesta a ABA y/o en la represión de la ruta de señalización de ABA.

De igual forma, la respuesta a estímulos de ácido jasmónico (JA) está sobre-representada con genes reprimidos durante toda la serie temporal de los frutos polinizados. También aparecen sobre-representadas la respuesta celular y la ruta de señalización de JA en las tres categorías con genes reprimidos a 24 hpa (Anexo 2, Tabla Suplementaria 1.5 y Figura 4.8B). Se conoce que la activación de la ruta de señalización de JA puede inhibir el crecimiento mediado por GAs, a través de múltiples mecanismos (Yang *et al.*, 2012; Claeys *et al.*, 2014).

Siguiendo con el mismo enfoque, la respuesta a estímulos de etileno también está sobre-representada con genes reprimidos en el *4xdella* a las 24 y 48 hpa y en fruto polinizado a las 48 y 72 hpa (Figura 4.8A), constituidas por 78 y 94 genes, respectivamente, entre los que destacan algunos genes de la ruta de señalización de ABA o asociados a la respuesta de etileno y ABA, como *ERF72*, *GID1A*, *GID1B*, *GID1C*, *ABF3*, *RPK1*, *RD26*, *ABI1*, *UGT71B6* (Anexo 2). La senescencia, como la biosíntesis y respuesta de etileno que la regula, tiene lugar de forma rápida tras la antesis en pistilos no polinizados con excepción de los frutos polinizados (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2010).

Por otro parte, se presentan algunos procesos biológicos que pueden ser relevantes en momentos puntuales entre las diferentes condiciones. Entre estos se encuentra la respuesta a estrés salino, sobre-representada en los genes inducidos en las 3 condiciones a las 72 hpa, y conformada por 60 genes (Tabla Suplementaria 1.12 y Figura 4.8B). Se conoce que la respuesta a estrés salino desencadena el catabolismo de GAs bioactivas generando una desactivación de la respuesta a GAs y por ende una restricción en el crecimiento (Colebrook *et al.*, 2014). De igual forma, los términos GO asociados a procesos de desarrollo reproductivo están sobre-representados entre el grupo de genes reprimidos en los frutos partenocárpicos del *4xdella* y tratados con GAs a las 48 hpa, reflejando la ausencia del desarrollo de la semilla que sí ocurre en los frutos polinizados. El

desarrollo de estructuras reproductivas y desarrollo post-embriónico está reprimido en GAs a las 72 hpa, siendo esta categoría formada por 110 genes (Anexo 2 y Figura 4.8A).

Finalmente, los procesos asociados a epigenética, como las modificaciones de histonas, metilación o el silenciamiento de cromatina, están sobre-representados entre los genes inducidos a las 24 hpa en los 3 tratamientos (Tabla Suplementaria 1.6). Sin embargo estos términos sólo aparecen en el polinizado y en el *4xdella* a las 48 hpa (Anexo 2 y Figura 4.8B), lo que sugiere que estos procesos pueden ser relevantes en las fases muy tempranas del desarrollo del fruto.

En resumen, pese a que hay ciertos términos GO significativos que permiten describir algunos eventos que tienen lugar durante la formación del fruto, no se logró identificar categorías enriquecidas comunes en las tres condiciones a lo largo del tiempo, que revelaran los procesos biológicos subyacentes a la formación del fruto, a pesar de que el número de genes diferenciales identificados es muy alto. Esto podría ser debido a que la fructificación es un proceso muy complejo con diferentes tejidos y órganos que experimentan eventos muy dispares, en los que participan muchos genes pertenecientes a diversas categorías funcionales. Por lo tanto, es necesario enfocar la búsqueda de genes maestros o FTs que estarían regulando ciertos nodos dentro de esta red génica, e identificar las rutas subyacentes que regulan la formación del fruto mediada por GAs.

#### **4.1.4. Búsqueda de FTs regulados por GAs e implicados en la formación del fruto**

##### **Meta-análisis de co-expresión de factores transcripcionales**

Con el propósito de identificar aquellos reguladores transcripcionales que desempeñan una función central en las fases tempranas del desarrollo del fruto y que participan aguas abajo de las proteínas DELLA se realizó un análisis topológico de una red de co-expresión de *Arabidopsis*, sobre la que se aplicaron los datos obtenidos en los micromatrices (0 y 24 hpa), determinando así el

potencial transcripcional de co-regulación y de interacción de los genes diferencialmente expresados en el análisis transcriptómico, que son comunes en frutos partenocárpicos y polinizados, activados a tiempos cortos durante la formación del fruto.

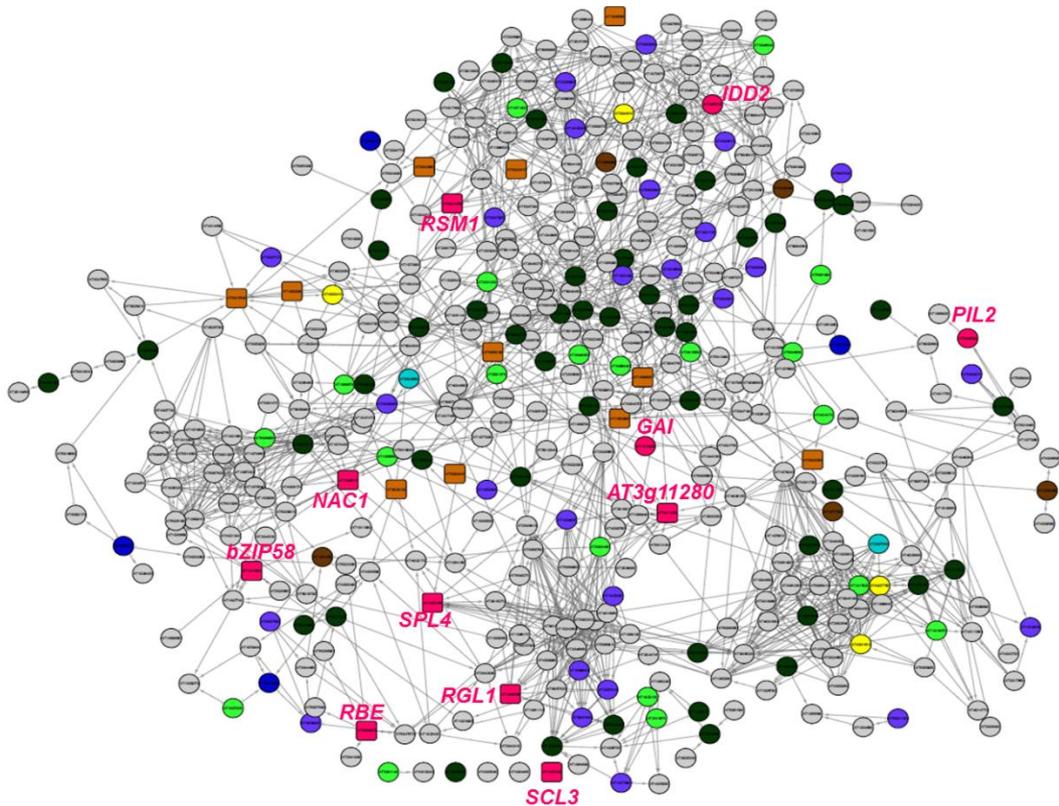
Las redes o matrices de co-expresión son un método para integrar información parcial obtenida en diferentes experimentos o análisis de expresión génica, datos transcriptómicos masivos, principalmente de micromatrices o RNA-seq. En una red de co-expresión génica los nodos representan genes y las aristas entre nodos representan los correspondientes genes que se co-expresan en las distintas condiciones de los experimentos analizados. La co-expresión entre genes suele medirse utilizando la correlación entre sus perfiles de expresión en las condiciones estudiadas. El análisis de la topología de la red ó de la relación nodo-nodo (gen-gen) y la integración de la relación de los nodos, proporciona una visión general de la organización, la jerarquía y la complejidad de la regulación transcripcional dentro de una matriz (Vandepoele *et al.*, 2009). Esta información permite extraer grupos (clusters) de co-expresión que se corresponden a módulos funcionales involucrados en procesos biológicos particulares. La hipótesis central es que la magnitud de la co-expresión entre cualquier par de genes está asociada con una alta probabilidad de que estos dos genes interactúen o que tengan perfiles transcriptómicos muy similares (Tseng *et al.*, 2012) sugiriendo su implicación en funciones o rutas biológicas similares.

Para realizar el análisis topológico, se utilizó una matriz de co-expresión de "FTs-Gen diana" modelada a partir de la recopilación de 1.436 experimentos de micromatrices con la plataforma Affymetrix, disponibles en el TAIR (Carrera *et al.*, 2009). Esta matriz representa la correlación entre los FTs y los genes diana potencialmente regulados. En esta red de co-expresiones hay contenidas 19.108 nodos y 139.016 correlaciones. De esta matriz, se extrajeron los genes diferencialmente expresados en nuestros micromatrices a tiempos cortos (24 hpa) comunes para las tres condiciones (Pol, *4xdella* y GAs), como también los comunes entre dos condiciones (Pol-*4xdella*, GAs-*4xdella* y Pol-GAs), obteniendo una sub-red de 7.097 nodos y 61.582 correlaciones (Anexo 4). A continuación,

para determinar dentro de esta sub-red de co-expresión aquellos genes que presentan un efecto regulatorio relevante que indiquen su mediación en rutas biológicas similares, se realizó un cribado utilizando algunos parámetros de topología de la red como los valores de *neighborhood connectivity in and out* (muestra la distribución de conectividad de los vecinos de un nodo en la red o el potencial de un nodo de regular múltiples genes diana) entre 0-30; y el valor *Clustering coefficient* (medida del grado de interconectividad de los vecinos de un nodo en la red) entre 0 y 0,5. Se consideraron estos parámetros topológicos debido a que con ellos se logra la identificación de organizaciones modulares en una red de co-expresión que permite la predicción de redes metabólicas (Ravasz *et al.*, 2002).

Aplicando dichos parámetros, se extrajo un clúster o módulo de co-expresión conformado por 416 nodos y 2.641 correlaciones (Figura 4.9), identificándose en este clúster 131 FTs diferenciales (Figura 4.9 y Tabla suplementaria 2: Listado 131 FTs).

Considerando que los cambios transcriptómicos derivados de la ruta de señalización por GAs ocurren de forma muy rápida tras el estímulo con GAs (Claeys *et al.*, 2014), se ha realizado un segundo cribado seleccionando dentro del grupo de los 131 FTs previamente identificados, aquellos FTs regulados por las proteínas DELLA, es decir que se expresaran diferencialmente a 0 hpa en el *4xdella*, con el fin último de identificar dianas rápidas o primarias de DELLA que estarían potencialmente mediando rutas biológicas implicadas en la formación del fruto dependiente de GAs. Con esta premisa se identificaron 11 FTs candidatos que potencialmente podrían desempeñar un papel importante en el proceso de fructificación mediado por GAs a tiempos tempranos (Figura 4.9) (Tabla 4.1).



**Figura 4.9. Grupos de co-expresión de los genes diferenciales en el desarrollo temprano del fruto mediado por GAs que presentan efectos regulatorios destacados.** Esquema de la posible organización modular de los genes implicados en los eventos transcriptómicos tempranos en la formación del fruto mediada por GAs. En blanco se muestran los posibles genes diana de los factores transcripcionales (FT) que se representan en diferentes colores, cada color representa una condición individual: verde fluorescente para *4xdella* a 24 hpa; verde oscuro para *4xdella*+Pol a 24 hpa; amarillo para GAs a 24 hpa; marrón para GAs+*4xdella* a 24 hpa; violeta para GAs+Pol a 24 hpa; morado para Pol a 24 hpa; y naranja para GAs+Pol+*4xdella* a 24 hpa. En fucsia se marcan los 11 FTs destacados que se expresan diferencialmente en el *4xdella* a 0 hpa.

**Tabla 4.1.** Implicación biológica según base de datos (TAIR) de los factores transcripcionales con los mayores efectos regulatorios en la red de co-expresión presentes en el *4xdella* a 0 hpa y en GAs, *4xdella* y polinizado a las 24 hpa. hpa: horas post antesis.

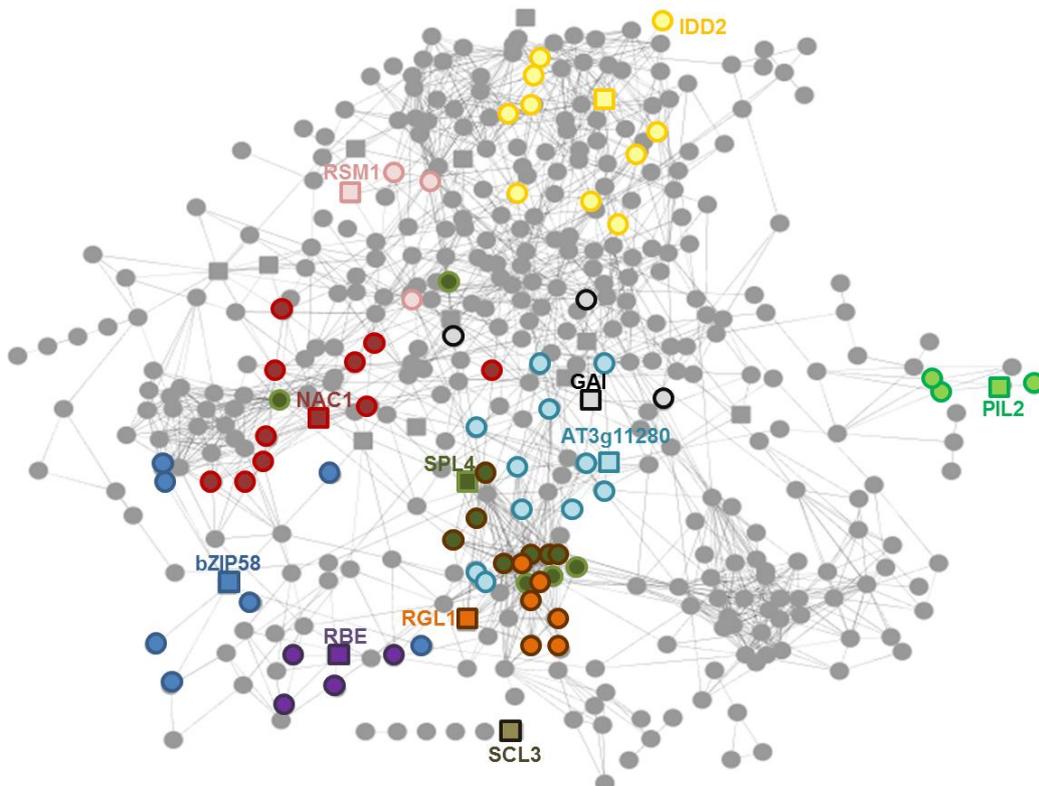
Factor de Transcripción	Anotación del gen	Ruta de ontología de gen (GO)
1	AT1G13600 Bzip58	Regulador transcripcional
2	AT1G56010 NAC1	Activador de la ruta de señalización de auxinas; desarrollo lateral de raíz; desarrollo multicelular; regulador transcripcional
3	AT1G53160 SPL4	Regulador transcripcional; regulador del cambio de fase vegetativa
4	AT5G06070 RBE	Diferenciación celular; desarrollo del pétalo; morfogénesis de pétalos; regulación de la organización estructural del meristemo; regulador de la transcripción; respuesta al frío
5	AT1G50420 SCL3	Regulador transcripcional; respuesta a GAs
6	AT3G11280 AT3G11280	Boisíntesis de cisteína; regulador transcripcional; respuesta a auxinas; respuesta a GAs; respuesta a ácido jasmónico; respuesta a ácido salicílico; respuesta a estrés salínico
7	AT3G62090 PIL2	Macromoléculas de la pared celular; procesos metabólicos; ruta de señalización de luz roja; regulador transcripcional; desarrollo del xilema
8	AT3G50700 IDD2	Diferenciación celular; ruta de señalización de ácido jasmónico; morfogénesis de la hoja; regulador negativo en la respuesta de defensa; regulador positivo en la transcripción; regulación de la respuesta de hipersensibilidad de la planta; resistencia sistémica adquirida, ruta de señalización de ácido salicílico.
9	AT2G21650 RSM1	Desarrollo embrionario y dormancia; gravitropismo; regulador de la transcripción; respuesta a luz roja
10	AT1G66350 RGL1	Diferenciación celular; morfogénesis del órgano floral; ruta de señalización de GAs; ruta de señalización de ácido jasmónico; regulador negativo de la ruta de señalización de GAs; respuesta a ácido abscísico; respuesta a etileno; respuesta a GAs; respuesta a estres salínico; germinación
11	AT1G14920 GAI	Morfogénesis del órgano floral; ruta de señalización de GAs; ruta de señalización de ácido jasmónico; regulador negativo de la ruta de señalización de GAs; regulador negativo de la semilla; regulación de la dormancia; transporte de floema; respuesta a ácido abscísico; respuesta a etileno; respuesta a GAs; respuesta a estres salínico

Analizando los valores de los 2 parámetros topológicos (Clustering Coeficiente y Neighborhood Connectivity) empleados para seleccionar los 11 FTs que se expresan diferencialmente a tiempos cortos en las tres condiciones y a 0 hpa en el *4xdella* (Tabla 4.2.) (Figura 4.10); se observa que los genes que presentan una mayor distribución de conectividad entre sus vecinos o con un potencial relevante para regular múltiples genes diana son *IDD2*, *RGL1*, *GAI*, *PIL2* y *SPL4*, sin embargo la interconectividad entre estos vecinos es baja, a excepción de *PIL2*, sugiriendo que estos FTs son centros de actividad importante en mediar las interacciones entre un largo número de genes menos conectados que pueden estar involucrados en diferentes procesos biológicos o rutas metabólicas. En el caso de *PIL2* no solo presenta varios nodos vecinos con los que conecta o regula, sino también exhibe una fuerte interconexión entre sus vecinos, esto sugiere la participación de *PIL2* en la conformación de un módulo jerárquico dentro de este cluster de co-expresión que se traduce en su implicación relevante en la regulación de algún proceso biológico particular. Por otra parte, los genes *bZIP58*, *At3g11280*, *NAC1* y *RSM1*, conectan con un reducido número de vecinos que regulan, lo que se traduce en una baja potencialidad de regular múltiples genes diana y a su vez estos vecinos están ligeramente interconectados entre sí. En el caso de *RBE* y *SCL3* tienen muy pocos vecinos con los que conectan y los datos indican que no hay interconexión entre sus vecinos. Todo esto sugiere que *bZIP58*, *At3g11280*, *RSM1* y *NAC1* podrían ser nodos intermediarios de regulación dentro de esta red transcripcional y que *RBE* y *SCL3* podrían ser nodos finales de regulación de una ruta transcripcional determinada.

Identificando en la red de co-expresión el grupo de primeros vecinos con los que conecta cada uno de los FTs seleccionados es posible inferir a groso modo el tipo de ruta metabólica o proceso biológico en el que estaría implicado o interviniendo cada uno de ellos, y por ende su posible función biológica en el desarrollo del fruto (Figura 4.10) (Tabla 4.3).

**Tabla 4.2. Listado de los 11 FTs seleccionados en el módulo de co-expresión.** Se enumeran los 11 FTs diferenciales comunes entre las tres condiciones y que son además diferenciales en el *4xdella* a 0 hpa.

name	Alias	Neighborhood Connectivity	Clustering Cefficient	Venn
AT1g53160	<i>SPL4</i>	23,48	0,14	GA+POL+4x
AT3g62090	<i>PIL2</i>	14,50	0,50	GA+4x
AT2g21650	<i>RSM1</i>	7,77	0,03	GA+POL+4x
AT1g14920	<i>GAI</i>	12,75	0,17	GA+4x
AT1g66350	<i>RGL1</i>	17,62	0,09	GA+POL+4x
AT3g11280	<i>AT3g11280</i>	8,25	0,02	GA+POL+4x
AT5g06070	<i>RBE</i>	4,00	0,00	GA+POL+4x
AT1g50420	<i>SCL3</i>	1,00	0,00	GA+POL+4x
AT1g13600	<i>bZIP58</i>	9,00	0,12	GA+POL+4x
AT3g50700	<i>IDD2</i>	14,90	0,20	GA+4x
AT1g56010	<i>NAC1</i>	8,31	0,01	GA+POL+4x



**Figura 4.10. Distribución de los 11 FTs y los primeros vecinos con los que se conectan.** Se marca con el mismo color el FT seleccionado y las posibles dianas que regula. *SPL4*, verde; *RGL1*, naranja; *RBE*, violeta; *Bzip58*, azul; *NAC1*, rojo; *PIL2*, verde claro; *IDD2*, amarillo; *GAI*, blanco-negro; *RSM1*, rosa; *At3g11280*, azul claro; *SCL3*, negro-gris.

**Tabla 4.3. Listado de los primeros vecinos o dianas que se co-expresan con cada uno de los FTs seleccionados.**

<i>PIL2</i>		<i>RGL1</i>		<i>AT3G11280</i>		<i>NAC1</i>	
AT1G68920	<i>AT1G68920</i>	AT1G24260	<i>AGL9</i>	AT1G13260	<i>RAV1</i>	AT1G02340	<i>FBI1</i>
AT1G77950	<i>AGL67</i>	AT1G59640	<i>BPE</i>	AT1G24625	<i>ZFP7</i>	AT2G43060	<i>IBH1</i>
AT5G18450	<i>AT5G18450</i>	AT2G33810	<i>SPL3</i>	AT1G56170	<i>HAP58</i>	AT2G45100	<i>AT2G45100</i>
<i>GAI</i>		AT2G45650	<i>AGL6</i>	AT1G68840	<i>EDF2</i>	AT3G29035	<i>ANAC059</i>
AT2G01570	<i>RGA</i>	AT3G01530	<i>MYB57</i>	AT2G28550	<i>TOE1</i>	AT4G05170	<i>AT4G05170</i>
AT4G04890	<i>PDF2</i>	AT3G02310	<i>AGL4</i>	AT2G38880	<i>ATNF</i>	AT4G21340	<i>B70</i>
AT4G21750	<i>ATML1</i>	AT3G15270	<i>SPL5</i>	AT3G46130	<i>MYB48</i>	AT5G15830	<i>bZIP3</i>
<i>IDD2</i>		AT3G27810	<i>MYB21</i>	AT4G36160	<i>NAC76</i>	AT5G25810	<i>tny</i>
AT1G05805	<i>AT1G05805</i>	AT3G54340	<i>AP3</i>	AT5G13180	<i>NAC83</i>	AT5G53980	<i>HB52</i>
AT1G30210	<i>TCP24</i>	AT4G18960	<i>AG</i>	AT5G13790	<i>AGL15</i>	<i>RBE</i>	
AT1G49720	<i>ABF1</i>	AT5G15800	<i>AGL2</i>	AT5G58900	<i>AT5G58900</i>	AT1G23420	<i>INO</i>
AT2G02070	<i>IDD5</i>	<i>SPL4</i>		AT5G59780	<i>MYB59</i>	AT2G41930	<i>AT2G41930</i>
AT2G03340	<i>WRKY3</i>	AT1G69120	<i>AGL7</i>	<i>RSM1</i>		AT5G07640	<i>AT5G07640</i>
AT2G18300	<i>AT2G18300</i>	AT2G03710	<i>AGL3</i>	AT1G75250	<i>RSM3</i>	AT5G23260	<i>AGL32</i>
AT2G43010	<i>PIF4</i>	AT2G33810	<i>SPL3</i>	AT2G20570	<i>GLK1</i>	AT5G28590	<i>AT5G28590</i>
AT4G29190	<i>3H49/TZF3</i>	AT2G45650	<i>AGL6</i>	AT5G18240	<i>MYR1</i>		
AT5G05090	<i>AT5G05090</i>	AT3G02310	<i>AGL4</i>	<i>bZIP58</i>			
AT5G08330	<i>TCP11</i>	AT3G15270	<i>SPL5</i>	AT1G11080	<i>scpl31</i>		
		AT3G54340	<i>AP3</i>	AT1G21890	<i>AT1G21890</i>		
		AT4G18960	<i>AG</i>	AT1G29270	<i>AT1G29270</i>		
		AT5G15800	<i>AGL2</i>	AT1G30650	<i>AR411</i>		
		AT5G43270	<i>SPL2</i>	AT1G69580	<i>AT1G69580</i>		
		AT5G60910	<i>AGL8</i>	AT2G20550	<i>AT2G20550</i>		
		AT5G65210	<i>TGA1</i>	AT5G25160	<i>ZFP3</i>		

Los genes *SPL4* y *RGL1* comparten muchas dianas con las que se co-expresan, entre los que destacan genes con el dominio MADS-box de las familias génicas *AGAMOUS*, *AGAMOUS-like* y *SP3* involucrados en identidad floral, específicamente en la formación de estambres y carpelos. *RGL1* también se co-expresa con los genes *MYB21* y *MYB57* implicados en el control del desarrollo de estambres señalando la interacción entre GA y JA en este proceso (Cheng *et al.*, 2009). Por su parte *IDD2*, *RSM1* y *At3g11280* se co-expresan con genes relacionados con el control del ciclo celular y el metabolismo secundario y la respuesta a estrés abiótico. De igual forma *At3g11280* se co-expresa con genes de las familias *NAC*, *TOE* y *RAV* implicados en desarrollo del xilema, integración con la ruta de ABA y etileno. Los genes *bZIP58* y *NAC1* se co-expresan con otros miembros de tipo zing-finger involucrados en desarrollo floral y germinación, también con genes del tipo *WRKY* involucrados en respuesta a patógenos, senescencia y desarrollo de tricomas, como también con genes involucrados en respuesta a citoquininas. Por otro lado *PIL2* se co-expresa con genes del tiempo a floración y de la regulación de la germinación y el desarrollo floral. Finalmente *RBE* se co-expresa con genes de determinación de la polaridad de la parte central del óvulo y genes de regulación de biosíntesis de proantocianidina en la capa más interna de las células de la cubierta de la semilla.

De igual forma a lo observado con el análisis GO, la mayor parte de los FTs representativos involucrados en el cluster de co-expresión y sus dianas, están asociados a procesos biológicos relacionados con rutas de señalización hormonal como auxinas, GAs, ácido jasmónico y ácido salicílico, como también relacionados a respuestas a auxinas, GAs, brasinoesteroides, etileno y ácido jasmónico (Tabla 4.1 y 4.3). Destaca que, dentro de este grupo reducido de 11 FTs, están presentes 2 genes DELLA (*RGL1* y *GAI*), lo que indica que su expresión está regulada por el mecanismo de retroalimentación.

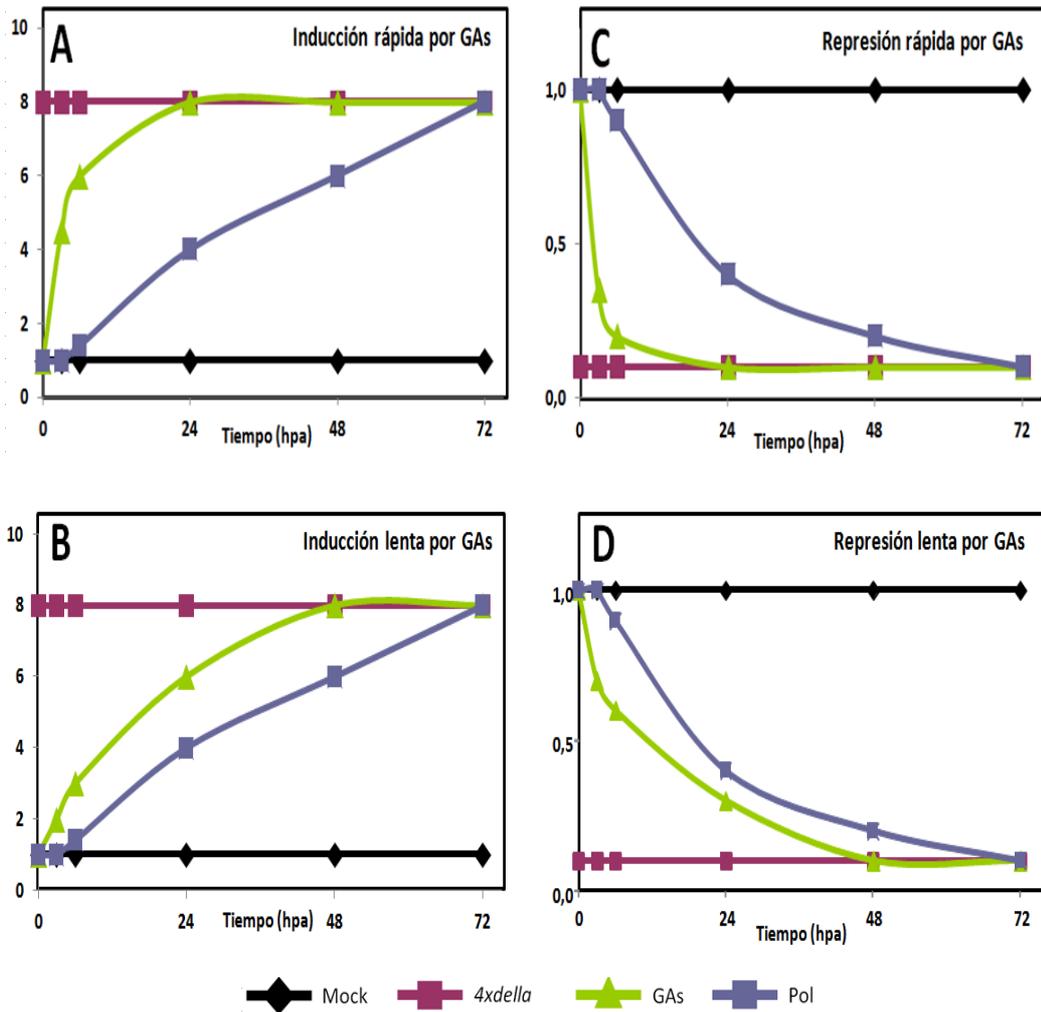
Todas estas evidencias ponen de manifiesto la relevancia de las interrelaciones entre las distintas rutas de señalización hormonal durante la fructificación. Además se observa que algunos de estos FTs están involucrados en procesos específicos de tejido, como el desarrollo del polen y carpelo, desarrollo del xilema, desarrollo de la pared celular, desarrollo del embrión, dormancia y germinación. Todas estas categorías pertenecen a términos GO significativos en los análisis previos.

Es importante considerar que este tipo de análisis de predicción de genes clave, utilizando matrices de datos para identificar nodos y redes de regulación, tiene limitaciones, y que es necesario ajustar los resultados obtenidos. La matriz de co-expresión usada para este análisis es el resultado de la recopilación de cientos de experimentos transcriptómicos diferentes sobre los cuales, a pesar de haber ajustado algunos parámetros estadísticos para garantizar cierto nivel de uniformidad entre experimentos (Carrera *et al.*, 2009), contiene variaciones considerables de diversa magnitud y clase, tales como el tipo de preparación de los datos, las técnicas experimentales usadas, el tipo de tejido analizado, los cambios en los factores ambientales, los tratamientos realizados ó diferencias entre laboratorios, entre otras. Por lo tanto, hemos analizado con detalle los perfiles de expresión de estos 11 FTs durante el desarrollo temprano del fruto según los datos de las micromatrices.

#### **4.2. Análisis de los perfiles de expresión de los factores de transcripción con expresión diferencial a 0 hpa en el *4xdella***

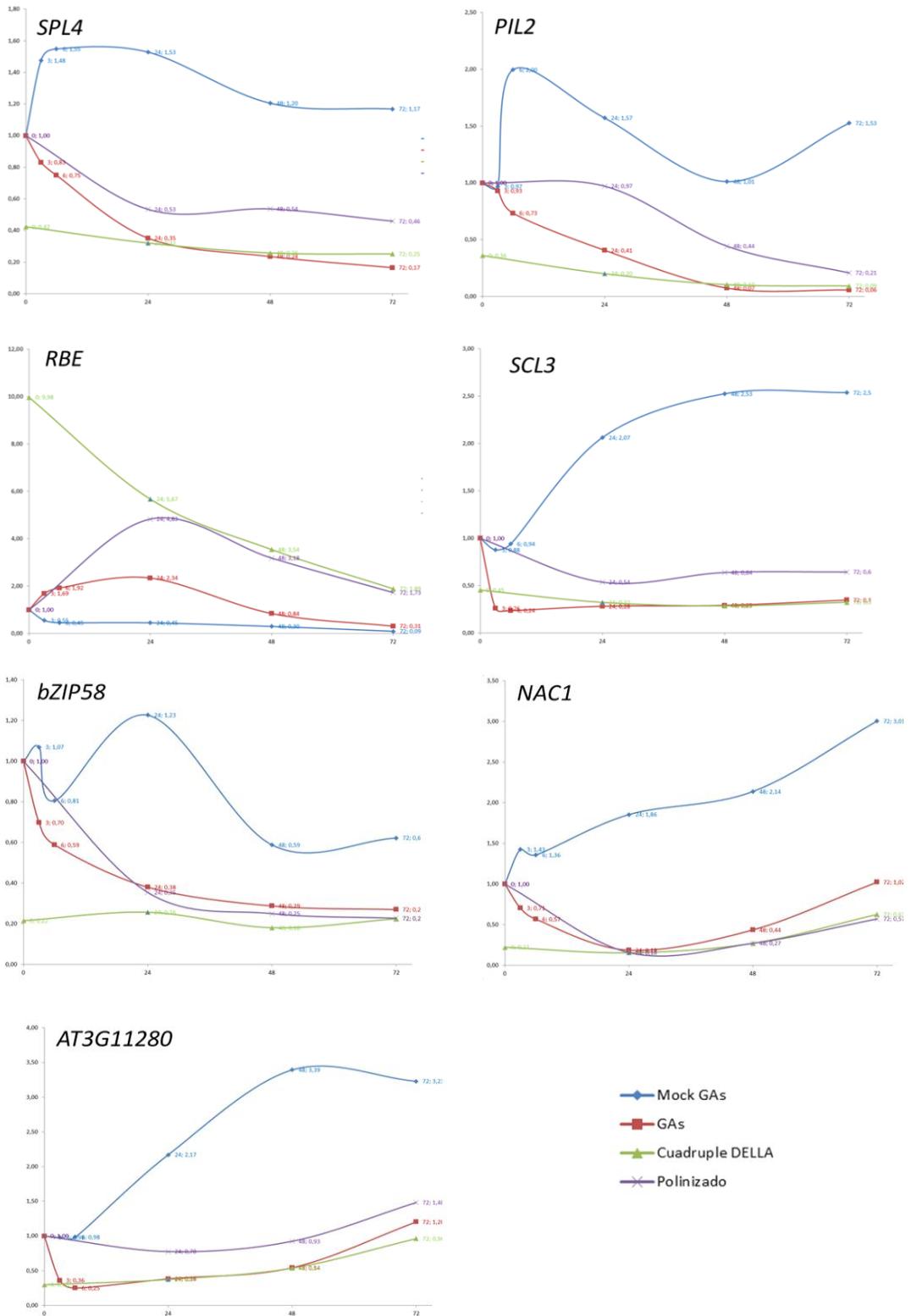
Para identificar genes de respuesta a GAs y posibles dianas de las proteínas DELLA durante la fructificación se definieron perfiles temporales teóricos que debían seguir los genes candidatos en las muestras de fruto analizadas (Figura 4.11). Dos perfiles corresponderían con genes inducidos y dos con genes reprimidos por GAs, además, dentro de cada una de estas dos categorías, deberían existir genes con respuesta rápida o respuesta lenta. Por ejemplo, un gen inducido por GAs debería presentar una mayor expresión en el *4xdella* que el control mock a 0 hpa (Figura 4.11A y 4.11B). El tratamiento con GAs debería provocar un aumento de los niveles de mRNA, de forma más o menos rápida durante las primeras horas tras el tratamiento; las respuestas rápidas, en las primeras 3-6 horas post-antesis o tras el tratamiento, podrían corresponder con dianas primarias de DELLA. Por otro lado, la polinización debería provocar un aumento de la expresión, posiblemente más lenta que el tratamiento ya que la señalización por GAs derivada de la fecundación de los óvulos es más lenta que la provocada tras un tratamiento con GAs exógenas. De forma similar se pueden explicar los perfiles de los genes reprimidos por GAs que tendrían menor expresión a 0 hpa en el *4xdella* y una disminución de su expresión tras el tratamiento con GAs o tras la polinización (Figuras 4.11C y 4.11D).

A continuación, se analizaron los perfiles de expresión de los 11 FTs seleccionados en el análisis de co-expresión. Se observó que 7 de ellos presentaban perfiles de expresión que son coherentes con su participación en la fructificación mediada por GAs, ya que exhibían una respuesta rápida a los tratamientos con GAs y ésta provocaba un cambio de expresión coherente con lo observado en el mutante *4xdella*. Entre este grupo de genes figuran *SCL3*, *PIL2*, *RBE*, *At3g11280*, *bZIP58*, *NAC1* y *SPL4* (Figura 4.12).



**Figura 4.11. Perfiles teóricos de expresión temporal de genes regulados por GAs/DELLAs en la fructificación.** Se representan los cuatro perfiles modelo de expresión esperados para genes de respuesta rápida (A y C) y lenta (B y D) ya sean inducidos (A y B) o reprimidos (C y D) por GAs.

En concreto, *SCL3* y *At3g11280* muestran represión pero esta es rápida, ya que a las 3 horas posteriores al tratamiento con GAs la expresión de ambos genes cae a niveles del *4xdella*. Por otro lado, *SPL4*, *PIL2*, *bZIP58* y *NAC1* mostraban una regulación negativa y lenta por GAs, su expresión está reprimida constantemente en el *4xdella* y se reprime de forma lenta en los tratamientos con GAs. Por el contrario, la expresión de *RBE* aumenta por GAs aunque de forma lenta y está inducida en el *4xdella* a tiempos cortos, aunque va disminuyendo en el tiempo.

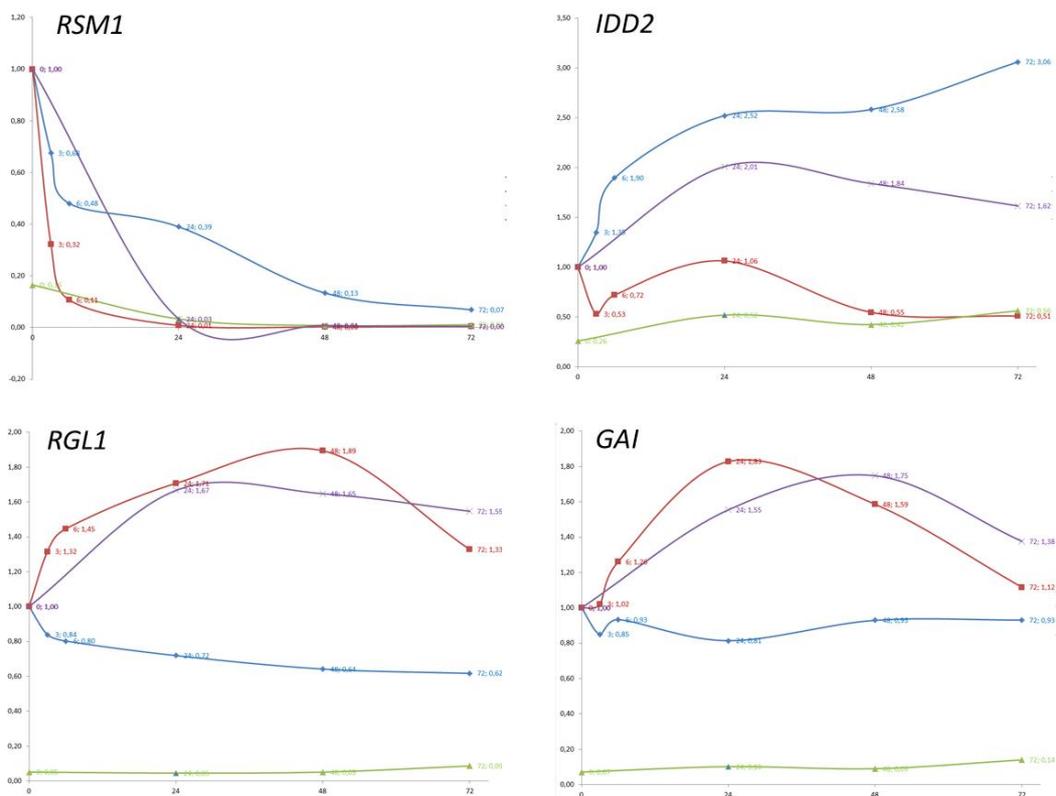


**Figura 4.12.** Perfiles de expresión de los 7 FTs seleccionados en la red de co-expresión que son candidatos en fructificación regulados por GAs/DELLAs. Se representan los perfiles de expresión de los datos transcriptómicos para 7 de los 11 FTs seleccionados en el análisis de co-expresión cuyos perfiles de expresión sugieren su implicación en la formación del fruto mediada por GAs.

Por otra parte, los genes *IDD2* y *RSM1* muestran perfiles de expresión que no sugieren su implicación en la fructificación, ya que no se observan diferencias entre los perfiles de expresión de tratamientos polinizados y GAs con respecto al mock, respectivamente (Figura 4.13).

En el caso de *RSM1*, su expresión baja muy rápidamente tras el tratamiento con GAs y en el polinizado, y es baja constitutivamente en el *4xdella* a 0 hpa, pero también disminuye en cierta medida en la muestra mock. La expresión de *IDD2* es baja en el *4xdella* y disminuye aunque sólo de forma transitoria con GAs, y aumenta en el polinizado y en el mock. En este caso, aunque parece estar regulado por GAs/DELLAs, no parece que tenga una función en la fructificación dado el perfil de expresión observado en el tratamiento polinizado. Por último, los genes *GAI* y *RGL1*, no son considerados ya que su expresión diferencial se asocia al mecanismo de retroalimentación de GAs. Tomando como referencia los perfiles de expresión obtenidos de los datos transcriptómicos de estos FTs, se identificaron otros genes candidatos que fuesen regulados tempranamente por DELLAs y potencialmente importantes en la fructificación que no habían sido seleccionados como representativos por la naturaleza y posición en la topología de la red de co-expresión. Para ello se analizaron los perfiles de expresión en los micromatrices de los FTs expresados diferencialmente en *4xdella* a 0 hpa.

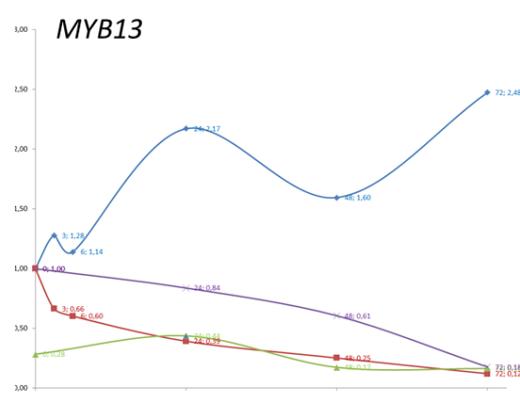
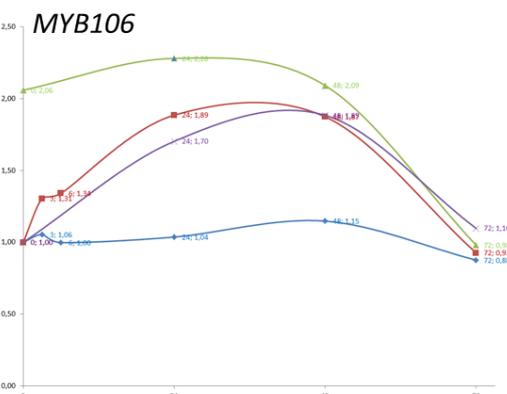
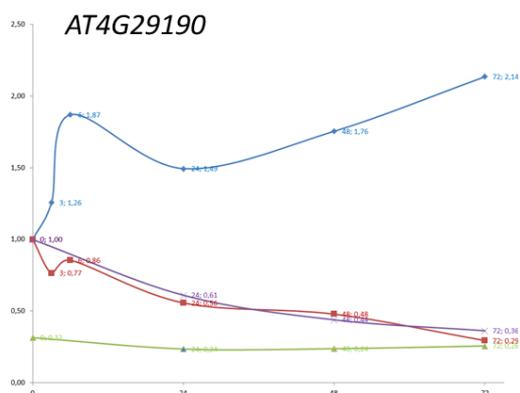
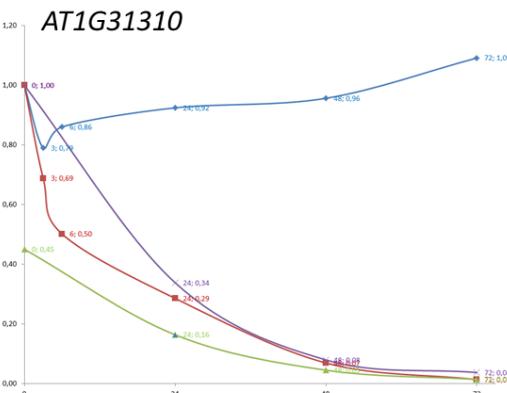
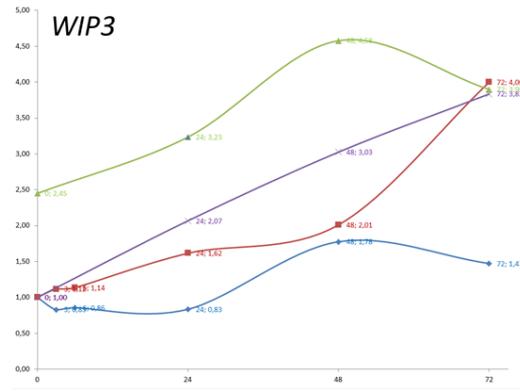
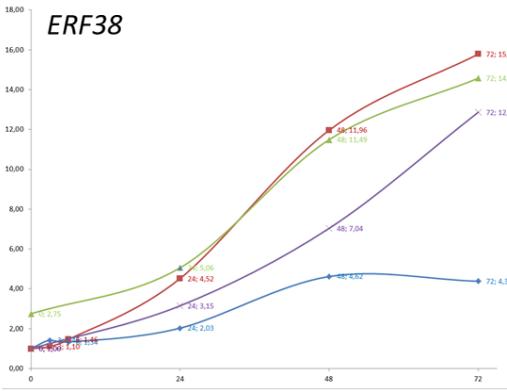
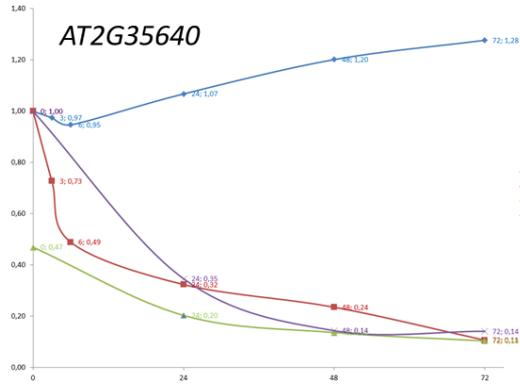
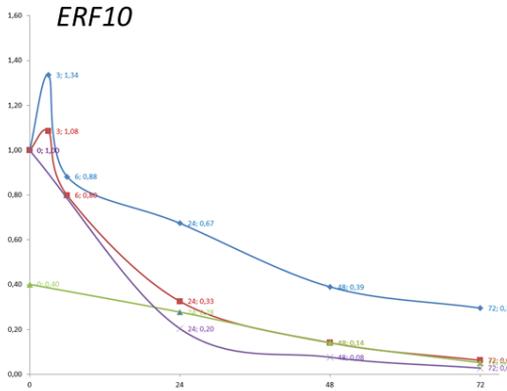
A continuación, se analizaron los perfiles de expresión de los 100 FTs diferenciales presentes en el *4xdella* a 0 hpa identificando 9 FTs adicionales (*At1g31310*, *At4g29190* (*3H49/TZF3*), *MYB106*, *MYB13*, *ERF10*, *At2g35640*, *ERF38*, *WIP3*, *MYB10*) (Figura 4.14) que se agrupan en alguno de los perfiles de expresión modelo (Figura 4.11). Dentro de este grupo de 100 FTs diferenciales también están presentes los 7 FTs previamente seleccionados como candidatos en fructificación regulados por GAs/DELLAs (Figura 4.12).

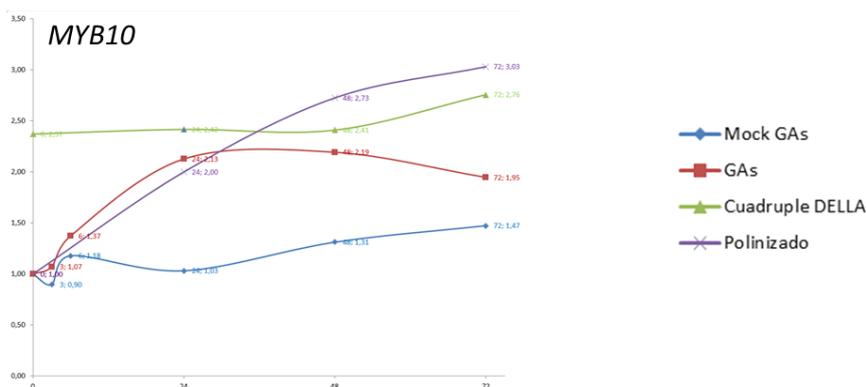


**Figura 4.13. Perfiles de expresión de 4 de los FTs seleccionados en el análisis de co-expresión que no exhiben un efecto regulatorio en fructificación.** Se representan los perfiles de expresión de los datos transcriptómicos para 4 de los 11 FTs seleccionados en el análisis de co-expresión cuyos perfiles de expresión indican que no son candidatos potenciales a ser dianas directas de DELLA en fructificación.

Entre este grupo de genes los FTs *At2g35640* y *At1g31310* son reprimidos en el *4xdella* y por GAs ya que hay una descenso rápido de la expresión tras 3-6 horas posteriores al tratamiento; en el polinizado se observa una caída en de expresión progresiva (Figura 4.14). De igual forma los genes *ERF10*, *At4g29190* y *MYB13* son reprimidos por GAs, aunque la respuesta es lenta; estos presentan una disminución progresiva de su expresión en el polinizado, mientras que en el *4xdella* la expresión está reprimida de una manera constante.

Por otra parte, los genes *ERF38*, *WIP3*, *MYB106* y *MYB10* son inducidos desde fases iniciales de desarrollo en el *4xdella* aunque su expresión se incrementa progresivamente tras la antesis (Figura 4.14); además se inducen por GAs, respondiendo lentamente tras el tratamiento o la polinización. Ninguno de estos genes es inducido por GAs con una respuesta rápida al estímulo.





**Figura 4.14. Perfiles de expresión de los 9 FTs seleccionados en la condición *4xdella* 0 hpa cuyos perfiles transcripcionales sugieren su potencialidad como dianas primarias de DELLA en fructificación.** Se representan los perfiles de expresión de varios FTs diferenciales según los datos transcriptómicos.

De esta forma, finalmente se identificaron 16 FTs candidatos cuya clasificación funcional e información general se recopila en las Tablas 4.4, 4.5 y 4.6. Estos genes se han agrupado en tres grupos: (1) genes inducidos por DELLA de respuesta rápida (Tabla 4.4), (2) genes inducidos por DELLA de respuesta lenta (Tabla 4.5) y (3) genes reprimidos por DELLA de respuesta lenta (Tabla 4.6)

A continuación, y para validar los datos de expresión de estos 16 FTs, se utilizó la quinta réplica biológica recolectada para la realización de los micromatrices para realizar un análisis de expresión génica por qPCR (Tabla 4.7). Los resultados obtenidos mostraban una excelente correlación entre las dos metodologías, confirmando de esta forma los datos de expresión de los candidatos seleccionados para todos los genes.

**Tabla 4.4. Factores transcripcionales inducidos por DELLA en fruto de respuesta rápida**

Nombre	AGI Código	Descripción	Características- Función	Referencia
MYB-Like	AT3g11280	MYB-Like	Inducido por Auxinas y factores de transcripción del tipo ERF que regulan la expresión de los genes PR	Blanco <i>et al.</i> , 2005; Zentella <i>et al.</i> , 2007
SCL3	AT1g50420	GRAS	Regulador positivo de la ruta señalización GAs, regula la expresión de genes de biosíntesis de GAs. Regulación de la elongación celular en raíz.	Zhang <i>et al.</i> , 2011; Heu <i>et al.</i> , 2011
MYB-Like	AT1g31310	MYB-Like	Desconocida	TAIR
NAC1	AT1g56010	ANAC NAC Domain	Establecimiento del meristemo apical del tallo y los órganos florales. Senescencia de la hoja y la biosíntesis de la pared celular También está involucrado en respuesta a stress abiótico. Desarrollo lateral de la raíz. NAC1 es inducido por auxinas.	Li <i>et al.</i> , 2012; D'haeseleer <i>et al.</i> , 2011; Henanff <i>et al.</i> , 2013
bZIP58	At1g13600	bZIP- basic leucine-zipper	Desarrollo de la semilla y respuesta a estrés. Interactúa con <i>ABI3</i> , un regulador importante en la expresión génica en la semilla de <i>Arabidopsis</i>	Lara <i>et al.</i> , 2003; Ehlert <i>et al.</i> , 2006

**Tabla 4.5. Factores transcripcionales inducidos por DELLA en fruto de respuesta lenta**

Nombre	AGI Código	Descripción	Características-Función	Referencia
3H49/TZF3	AT4g29190	CCCH Zing Finger	Involucrado en la respuesta a ABA y JA. La sobreexpresión confiere hipersensibilidad a ABA y tolerancia a la sequía. Se expresa en plántula, en flores en sépalos y filamentos, y en embriones maduros	Huang <i>et al.</i> , 2012 Lee <i>et al.</i> , 2012
MYB106	AT3g01140	MIXTA-like MYB NOECK	Regula morfología de la epidermis y grupo de genes involucrados en la biosíntesis y desarrollo de cutícula	Jakoby <i>et al.</i> , 2008; Cao <i>et al.</i> , 2006; Oshima <i>et al.</i> , 2013
MYB13	AT1g06180	MYB3R-R2R3	Respuesta a estrés. Desarrollo floral	Cao <i>et al.</i> , 2006; Yanhui <i>et al.</i> , 2006
ERF10	AT5g50080	ERF/AP2	Inducido por DELLA en boton floral.	Cao <i>et al.</i> , 2006; Nakano <i>et al.</i> , 2006
PIL2	AT3g62090	MYC tipo bHLH	Interactúa con APRR1/TOC1 y es miembro del grupo PIF3. Media la respuesta del phyB a la luz, y la respuesta al ambiente frente a cambios de luz y temperatura. Regulación de dormancia y germinación	Penfield <i>et al.</i> , 2010; Sairanen <i>et al.</i> , 2012
SPL4	AT1g53160	SPL-Squamosa Promoter Binding Protein Like	Tiene sitios de unión a miR156 que regula su expresión. Regulación del tiempo de floración y el cambio de la fase juvenil a la adulta	Cardon <i>et al.</i> , 1999; Wu y Poething 2006; Lal <i>et al.</i> , 2011; Torti <i>et al.</i> , 2012; Jorgensen <i>et al.</i> , 2014
MYB-Like	AT2g35640	Homeodomain-Like	Desconocida	TAIR

**Tabla 4.6. Factores transcripcionales reprimidos por DELLA en fruto de respuesta lenta**

Nombre	AGI Código	Descripción	Características-Función	Referencia
ERF38	AT2g35700	ERF/AP2	Corregulado con genes involucrados en pared celular. Se expresa intensamente en silicuas maduras y tallos florales	Nakano <i>et al.</i> , 2006; Lasserre <i>et al.</i> , 2008
WIP3	AT1g08290	C2H2	Control de la diferenciación del endotelio de la semilla	Sagasser <i>et al.</i> , 2002; Appelhagen <i>et al.</i> , 2010
MYB10	AT3g12820	R2R3	Regulador positivo temprano en la cascada regulatoria bajo condiciones de deficiencia a hierro	Yanhui <i>et al.</i> , 2006; Palmer <i>et al.</i> , 2013;
RBE	AT5g06070	C2H2	Reprime la transcripción de <i>AG</i> y <i>miR164c</i> , este regula la expresión de <i>CUC1</i> y <i>CUC2</i> , siendo estos los responsables de regular los eventos de desarrollo requeridos para la organogénesis de pétalos y sépalos. RBE se expresa en los integumentos de los óvulos.	Křízek <i>et al.</i> , 2005; Huang <i>et al.</i> , 2012; Takeda <i>et al.</i> , 2014

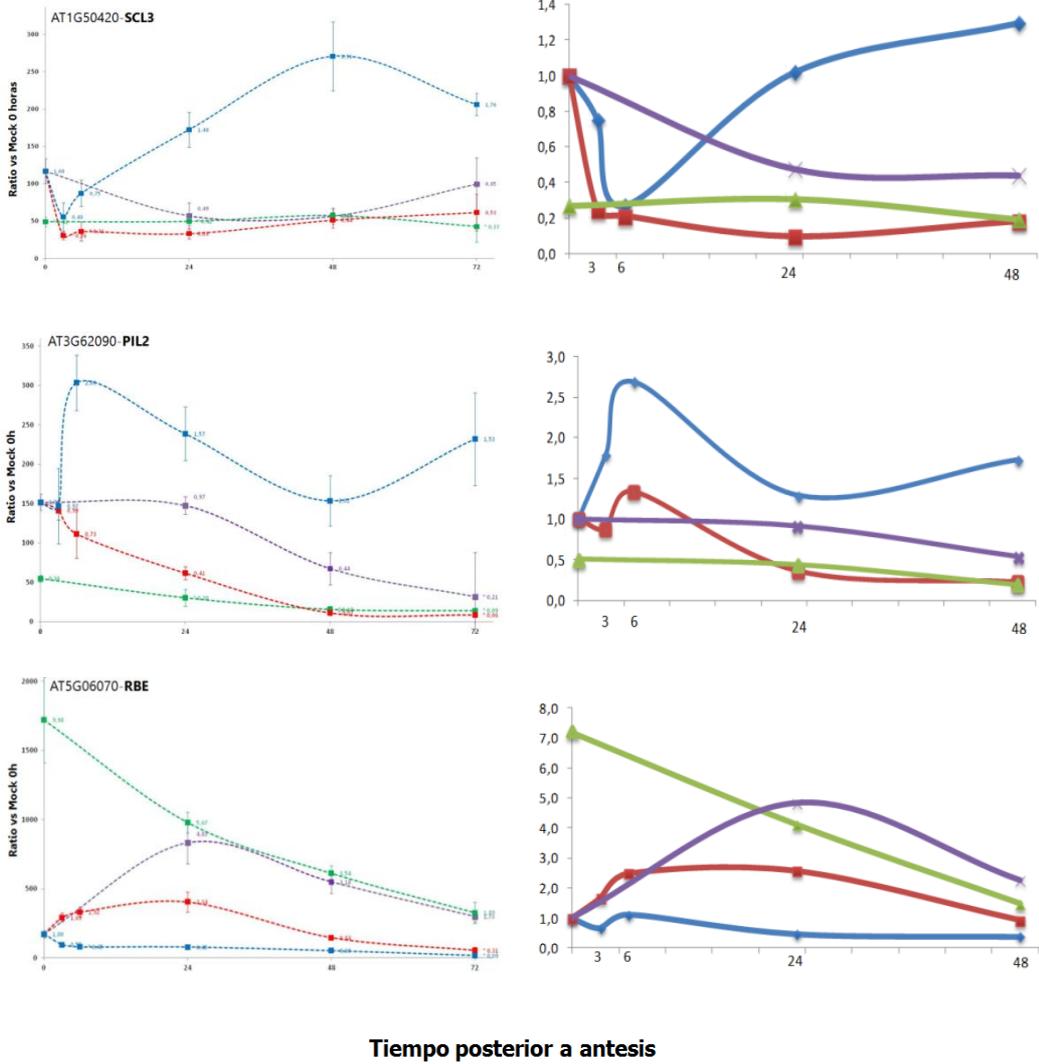
**Tabla 4.7. Validación por qPCR de la expresión de los FTs candidatos.** Se muestran los valores de expresión, como la diferencia de expresión entre el *4xdella* y el mock a 0 hpa, obtenidos en los micromatrices (panel izquierdo) y por qPCR (panel derecho). En rosa se agrupan aquellos FTs cuyo perfil de expresión se ajusta al perfil modelo tipo C; en verde se agrupan los FTs del perfil modelo tipo D; y en violeta se agrupan los FTs del perfil modelo tipo B.

AGI Código	Nombre	Array	qPCR
AT3g11280	MYB-Like	0.50	0.21
AT1g50420	SCL3 (SCARECROW-Like3)	0.45	0.26
AT1g31310	MYB-Like	0.45	0.49
AT1g56010	NAC1 (NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 1)	0.22	0.32
AT1g13600	Bzip58 (basic Leucine-Zipper 58)	0.22	0.46
AT4g29190	4H49/TZF3 (oxidation related zinc finger 2)	0.34	1.02
AT3g01140	MYB 106 (MYB DOMAIN PROTEIN 106)	2.28	2
AT1g06180	MYB13 (MYB DOMAIN PROTEIN 13)	0.28	0.07
AT5g50080	ERF10 (Ethylene Response Factor 10)	0.4	0.61
AT3g62090	PIL2 (Phytochrome Interacting Factor 3- Like 2)	0.36	0.5
AT1g53160	SPL4 (Squamosa Promoter Binding Protein Like 4)	0.31	0.33
AT2g35640	MYB-Like	0.47	0.58
AT2G35700	ERF38 (Ethylene Response Factor 38)	3.21	2.00
AT1G08290	WIP3 (WIP DOMAIN PROTEIN 3)	9.98	7.18
AT3G12820	MYB10 (MYB DOMAIN PROTEIN 10)	2.45	3.00
AT5G06070	RBE (RABBIT EARS)	2.75	2.25

Para los 16 genes se procedió a realizar el análisis por qPCR de toda la serie temporal, con excepción de las muestras a 72 hpa (Anexo 5) confirmándose los patrones de expresión derivados de los datos transcriptómicos. En las figuras 4.15 se muestran los perfiles de expresión de los genes *SCL3*, *RBE* y *PIL2* comparando los perfiles de los datos obtenidos en las micromatrices y por qPCR.

### A. Perfil expresión micromatrices

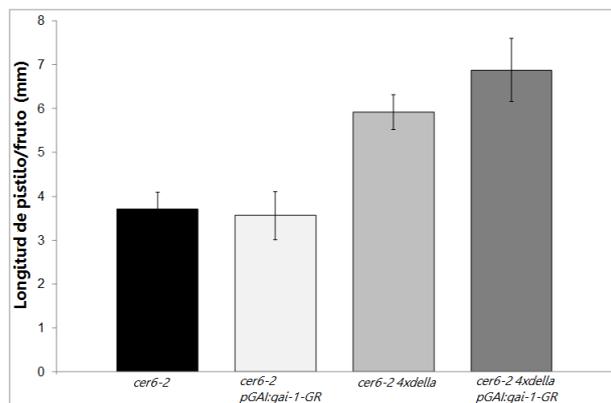
### B. Perfil expresión qPCR



**Figura 4.15. Perfiles de expresión de 3 FTs durante las fases tempranas de fructificación, según los datos de micromatrices y qPCR.** Se muestran los perfiles de expresión de *SCL3*, *PIL2* y *RBE* según los datos de micromatrices (A) ó qPCR (B). Para las qPCR no se evaluó las muestras de 72 hpa. Los perfiles de expresión son casi idénticos, confirmando los datos de expresión.

### 4.3. Identificación de dianas directas de DELLA en fructificación

Para determinar si los 16 FTs candidatos eran dianas directas de las proteínas DELLA se utilizó una línea transgénica que expresa una fusión traduccional de la versión dominante de GAI (*gai-1*) con el dominio receptor de glucocorticoides (GR) de rata, bajo el control del promotor de GAI (*pGAI:gai-1-GR*) (Lloyd *et al.*, 1994; Aoyama y Chua, 1997; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011). Esta línea se cruzó con el mutante partenocárpico *cer6-2 4xdella* para disponer de una línea que no expresa ninguna DELLA en condiciones no inducibles, pero que tras el tratamiento con dexametasona (Dex) expresara *gai-1* de forma rápida y controlada y poder así estudiar su efecto en la regulación de los posibles genes diana de las proteínas DELLA. Una vez generado este cruzamiento, se comprobó que la nueva línea no tenía afectado el desarrollo del fruto al observar que la partenocarpia del *4xdella* no estaba disminuida con la presencia de la construcción *pGAI:gai-1-GR* (Figura 4.16).



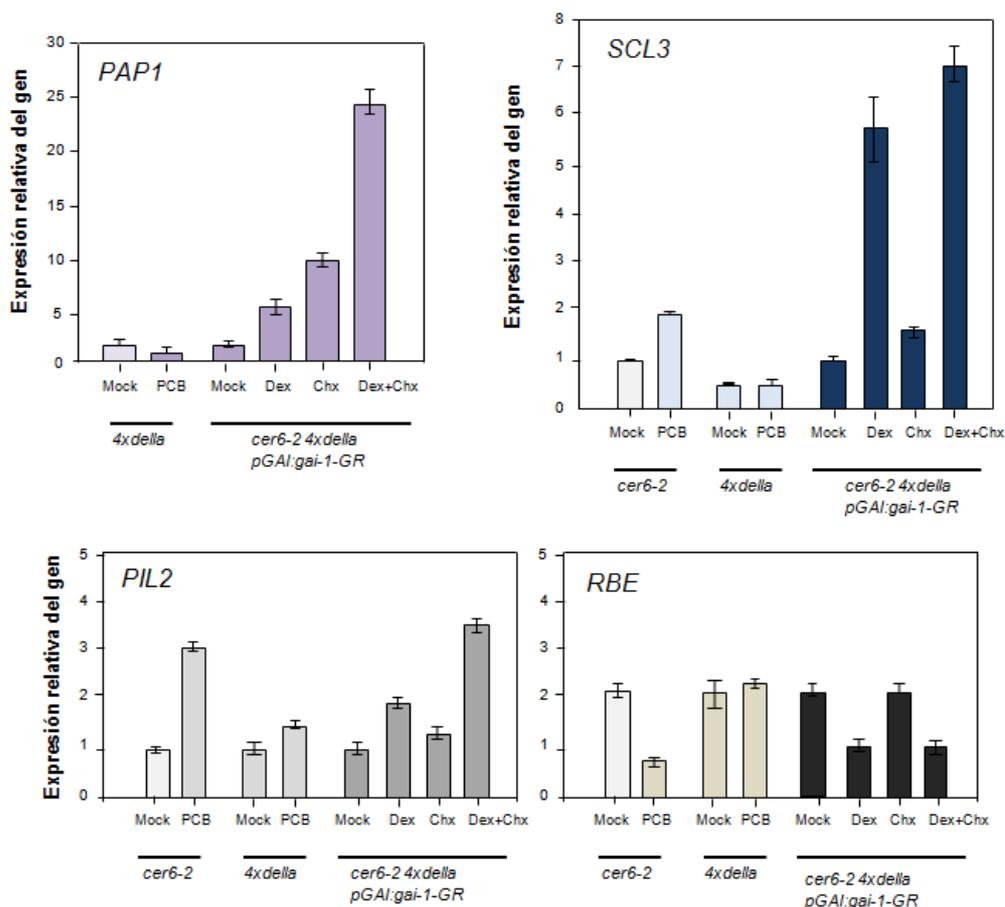
**Figura 4.16. Desarrollo del pistilo y fruto de la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR*.** Se muestra el tamaño del pistilo no polinizado de *cer6-2* y de la línea *pGAI:gai-1-GR*, en ausencia (columnas izquierda) o presencia de la mutación *4xdella* (columnas derecha). No se observa un efecto negativo sobre la partenocarpia en la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR*.

En primer lugar se utilizó la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* para saber si los 16 FTs eran dianas directas o no de DELLAs en plántulas etioladas de 4 días, realizando tratamientos con Dex y cicloheximida (Chx). El tratamiento con Dex induce translocación de la proteína *gai-1* al núcleo para poder regular la transcripción de los genes de respuesta, mientras que el tratamiento con Chx, un inhibidor de la síntesis proteica, nos permite saber si los cambios de expresión

provocados por *gai-1* requieren de la expresión previa de otras proteínas; de no ser así, es decir, si la inducción o represión de la expresión de los genes por *gai-1* (+Dex) tiene lugar también en presencia de la Chx se puede afirmar que esos genes son dianas primarias de las proteínas DELLA.

Para corroborar la fiabilidad de los tratamientos en estas líneas, hemos testado junto con los 16 FTs, el gen *PAP1*, el cual ha sido previamente identificado como diana directa de GAI en plántula (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011) (Figura 4.17). Se observó que la expresión de *PAP1* se induce tras el tratamiento con Dex tanto en presencia como en ausencia de Chx lo que confirma que la línea transgénica introgresada en *cer6-2 4xdella* era una buena herramienta para identificar nuevas dianas de DELLA.

Primero se realizó el análisis de los FTs en plántulas, dado que se conocía las condiciones a las que había que realizar los tratamientos (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011). En total se observaron cambios en la expresión de 15 de los 16 FTs en plántula, acorde a lo esperado según los datos de micromatrices y qPCR. En el Anexo 6 se muestra la respuesta de cada uno de los 16 FTs a los tratamientos en plántula; el único gen que no se comporta como era de esperar fue *ERF10*, ya que no responde al tratamiento con Dex. Además se estudió la respuesta de estos genes al Paclobutrazol (PCB), un inhibidor de la síntesis de GAs, confirmándose la regulación positiva o negativa por DELLA (Anexo 6 y Figura 4.17). La expresión de los genes *WIP3*, *SCL3*, *ERF38*, *MYB106*, *MYB10*, *PIL2*, *RBE* responde a los tratamientos con Dex y Chx del mismo modo por lo que se concluye que estos 7 FTs son dianas directas de GAI en plántula (Tabla 4.8). Por ejemplo, *SCL3* y *PIL2* se inducen por DELLA tanto tras el tratamiento con Dex como con PCB, y en ausencia o presencia de Chx (Figura 4.17). Por otro lado, *RBE* se comporta de modo contrario, y su expresión se reduce por DELLA (con Dex o PCB), independiente de la presencia o no de Chx. Hay que destacar que *SCL3* había sido previamente identificado como diana directa de RGA y que está regulado positivamente por DELLA en plántula (Zentella *et al.*, 2010). Por otra parte, los genes restantes responden a *gai-1* pero no parecen ser dianas primarias, dada la ausencia de respuesta al tratamiento combinado (Anexo 6).



**Figura 4.17. Dianas directas de GAI en plántula.** Expresión de 4 genes diana directa de DELLAS en plántulas *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* tratadas con Dex y Chx. *PAP1* es una diana directa previamente identificada y utilizada como control del ensayo. Los genes *SCL3*, *PIL2* y *RBE* están normalizados sobre *cer6-2* mock. Se observa el tipo de regulación del gen tras tratamientos con PCB, tanto en el *cer6-2* como en el *4xdella* en plántula. PCB, paclobutrazol; Dex, Dexametasona; Chx, Cicloheximida; Dex+Chx, tratamiento combinado Dex y Chx.

**Tabla 4.8. Listado de FTs identificados como dianas directas de GAI en plántula.**

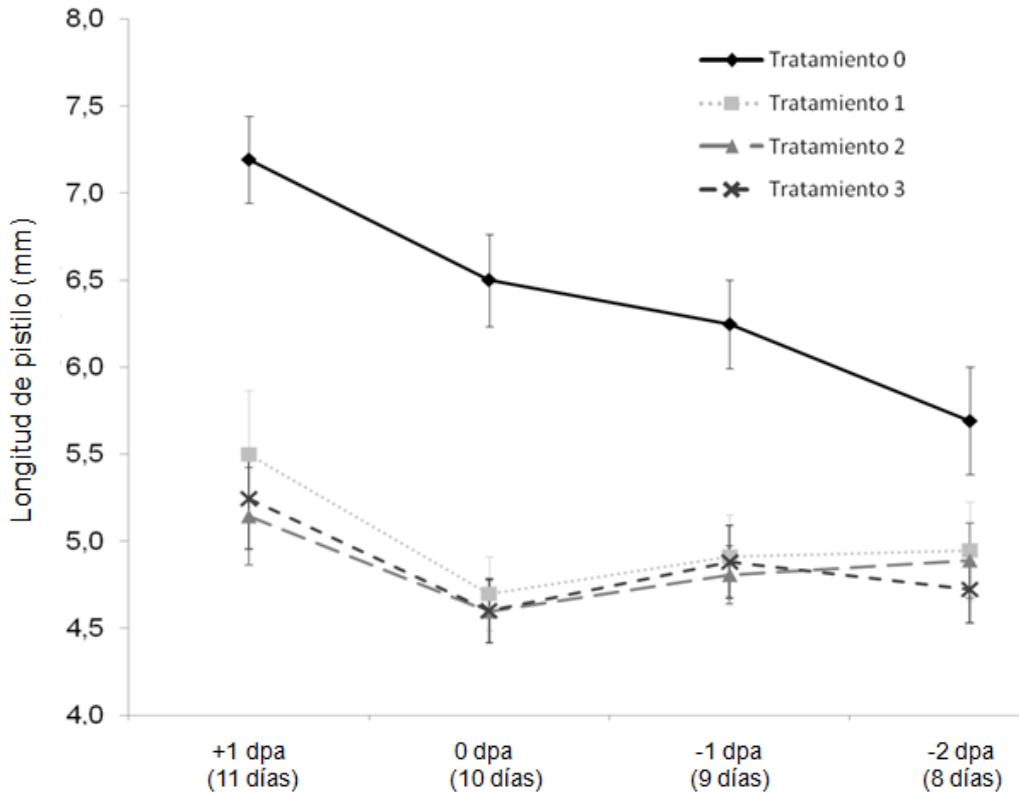
Se indica el valor de la expresión en los datos de micromatrices en el *4xdella* a 0 hpa y los valores de expresión de inducción o represión obtenidos por qPCR de la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* tratada con Dex y Chx, datos normalizados sobre el valor de la línea tratada solo con Chx.

Código Gen	Nombre Gen	Micromatrices 4xdella 0h	qPCR <i>cer6-2 4xdella</i> <i>pGAI:gai-1-GR</i> Plántula Chx+Dex
<i>At1g08290</i>	<i>WIP3</i>	2,45	0,79
<i>At1g50420</i>	<i>SCL3</i>	0,45	4,84
<i>At2g35700</i>	<i>ERF38</i>	2,75	0,80
<i>At3g01140</i>	<i>MYB106</i>	2,28	0,64
<i>At3g12820</i>	<i>MYB10</i>	3,21	1,02
<i>At3g62090</i>	<i>PIL2</i>	0,36	2,43
<i>At5g06070</i>	<i>RBE</i>	9,98	0,62

Nuestro objetivo es conocer si estos FTs juegan una función en la respuesta a GAs en el pistilo durante la fructificación. Por tanto es necesario saber si responden a las DELLAs en el pistilo del mismo modo a lo observado en las plántulas, utilizando la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR*. Previamente se realizó un estudio para conocer si los pistilos de esta línea responden a los tratamientos con Dex. Era de esperar que el tratamiento con Dex aboliese el fenotipo partenocárpico del *4xdella*. Se crecieron plantas *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* en baja humedad y se realizaron tratamientos con Dex para determinar el efecto en el tamaño del fruto maduro. Se realizaron 3 tipos de tratamientos, correspondientes al número de días consecutivos en los que se sumergieron las inflorescencias en Dex, y se evaluaron los tamaños de los frutos procedentes de los pistilos que estaban entre 2 días antes de la antesis y 1 día después de antesis en el momento del primer tratamiento (Figura 4.18). El diseño experimental se describe detalladamente en Materiales y Métodos.

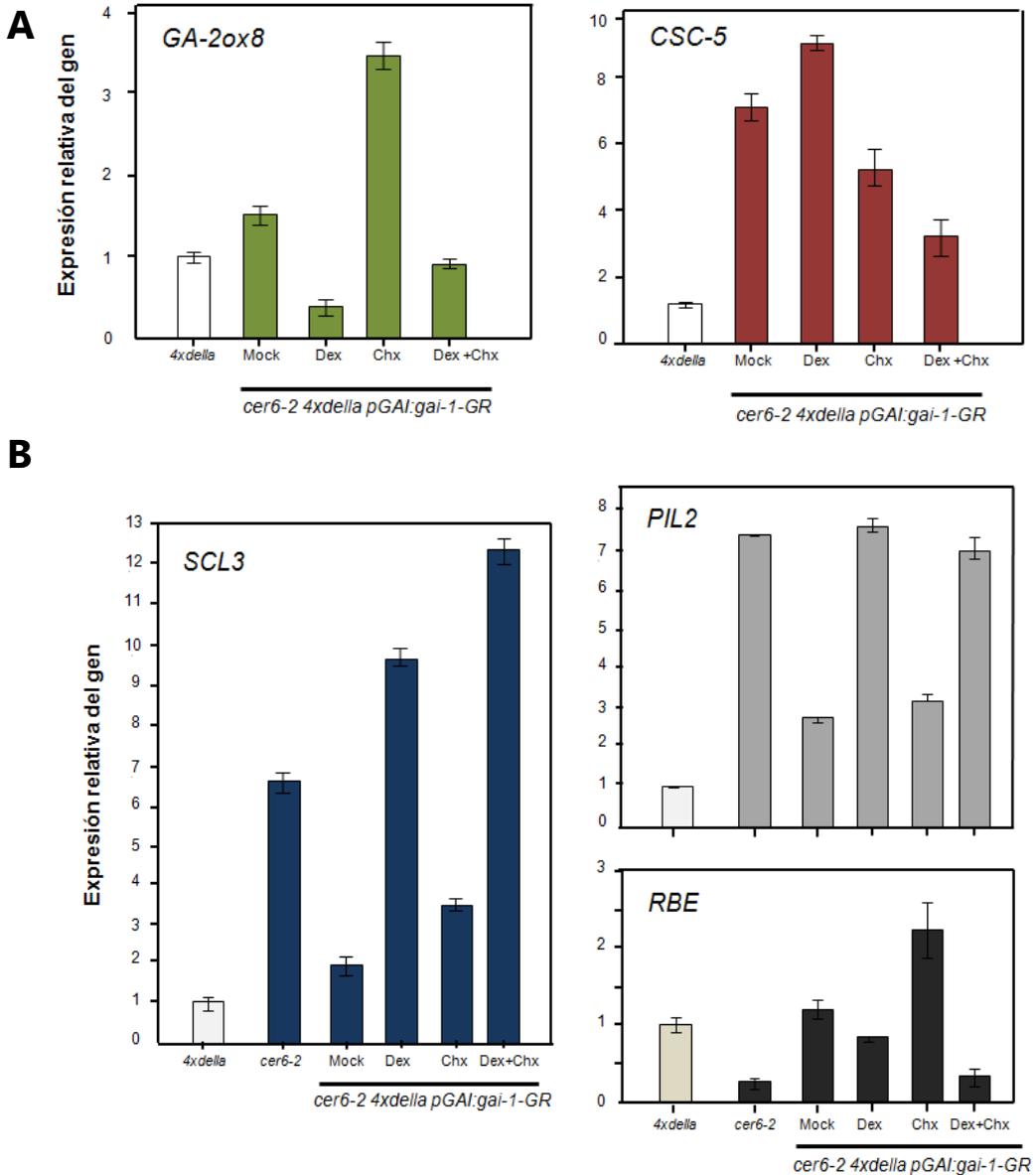
Se observó que los frutos de las plantas no tratadas (Tratamiento 0) tenía un tamaño correspondiente a su estado de desarrollo, desde los frutos de 8 días (aquellos que estaban en estadio -2 dpa en el momento del primer tratamiento), hasta los 11 días (aquellos que tenían 1 día en el primer tratamiento). Se observó que un único tratamiento era suficiente para abolir la partenocarpia del *4xdella* aunque un segundo tratamiento reforzaba el efecto, indicando que la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* exhibe una respuesta positiva al tratamiento con Dex en pistilo, y por tanto es una buena herramienta para realizar el análisis en pistilo de los genes candidatos.

De la misma manera a lo realizado en plántulas, utilizamos genes control para asegurarnos de la calidad de las muestras y de la óptima respuesta al tratamiento con Dex y Chx en el pistilo. Para ello, testamos junto con los 16 FTs, los genes *GA2ox8* y *CSC-5*, que son diana directa y no diana directa de GAI, respectivamente (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011) (Figura 4.19). En el Anexo 7 se muestra las respuestas de cada uno de los 16 FTs en pistilos de *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* tratados con Dex y Chx.



**Figura 4.18. Respuesta al tratamiento con Dex en la línea *cer6-2 4xdella* que porta la construcción *pGAI:gai-1-GR*. Pérdida de partenocarpia en los pistilos tratados con Dex. **Tratamiento 0:** No aplicación **Tratamiento 1:** Aplicaciones a pistilos con Dex en días -1 y -2 dpa. **Tratamiento 2:** Aplicaciones a pistilos con Dex en días -2, -1 y 0 dpa. **Tratamiento 3:** Aplicaciones a pistilos con Dex en días -1,-2, 0 y +1 dpa. *dpa*: días post antesis. En la primera línea del eje x, se muestra la edad del pistilo en el momento del primer tratamiento y en la segunda línea la edad de los frutos al momento de recolección.**

Se observó que el gen *CSC-5* no presentaba una respuesta consistente tras el tratamiento combinado, mientras que la expresión de *GA2ox8* se reprime con el tratamiento con Dex y el combinado Dex-Chx; confirmando que estas muestras y condiciones de tratamiento son adecuadas para realizar el análisis (Figura 4.19A).



**Figura 4.19. Dianas directas de GAI en pistilo. A.** Perfiles de expresión de la *GA2ox8* como diana directa de GAI y de *CSC-5* que no es diana directa. **B.** Perfiles de expresión de 3 FTs representativos dentro de nuestro grupo de candidatos, *SCL3*, *PIL2* y *RBE*. Se observa cómo estos tres genes son dianas directas de GAI en pistilo. Dex, Dexametasona; Chx, Cicloheximida; Dex+Chx, tratamiento combinado con Dex y Chx. Los niveles de expresión están normalizados al nivel del *4xdella*.

Tras analizar los 16 FTs candidatos, se observó que algunos de ellos, como *MYB10*, *MYB106*, *ERF38*, *WIP3*, no responden a *gai-1* en pistilo, mientras que otros, aunque sí que responden a *gai-1*, no parecen ser dianas directas, como *MYB13*, *Bzip58*, *ERF10* y *At2g35640* (Anexo 7). Los genes que claramente son

dianas directas de GAI en pistilo son *RBE*, *At3g11280*, *SPL4*, *PIL2*, *SCL3*, *At1g31310*, *4H49/TZF3*, y *NAC1* (Figura 4.19B y Anexo 7).

Finalmente tras la evaluación de cada uno de los 16 FTs se seleccionaron aquellos que eran dianas directas de GAI tanto en plántula como en pistilo o solo en pistilo (Tabla 4.9). Cabe destacar que todos ellos se inducen por las proteínas DELLA, con la excepción de *RBE* que se reprime.

**Tabla 4.9. Dianas directas de GAI en pistilo y/o plántula.** En asterisco se marcan los genes que son dianas en pistilo pero no en plántula. Se indica el tipo de regulación de la DELLA sobre la diana directa.

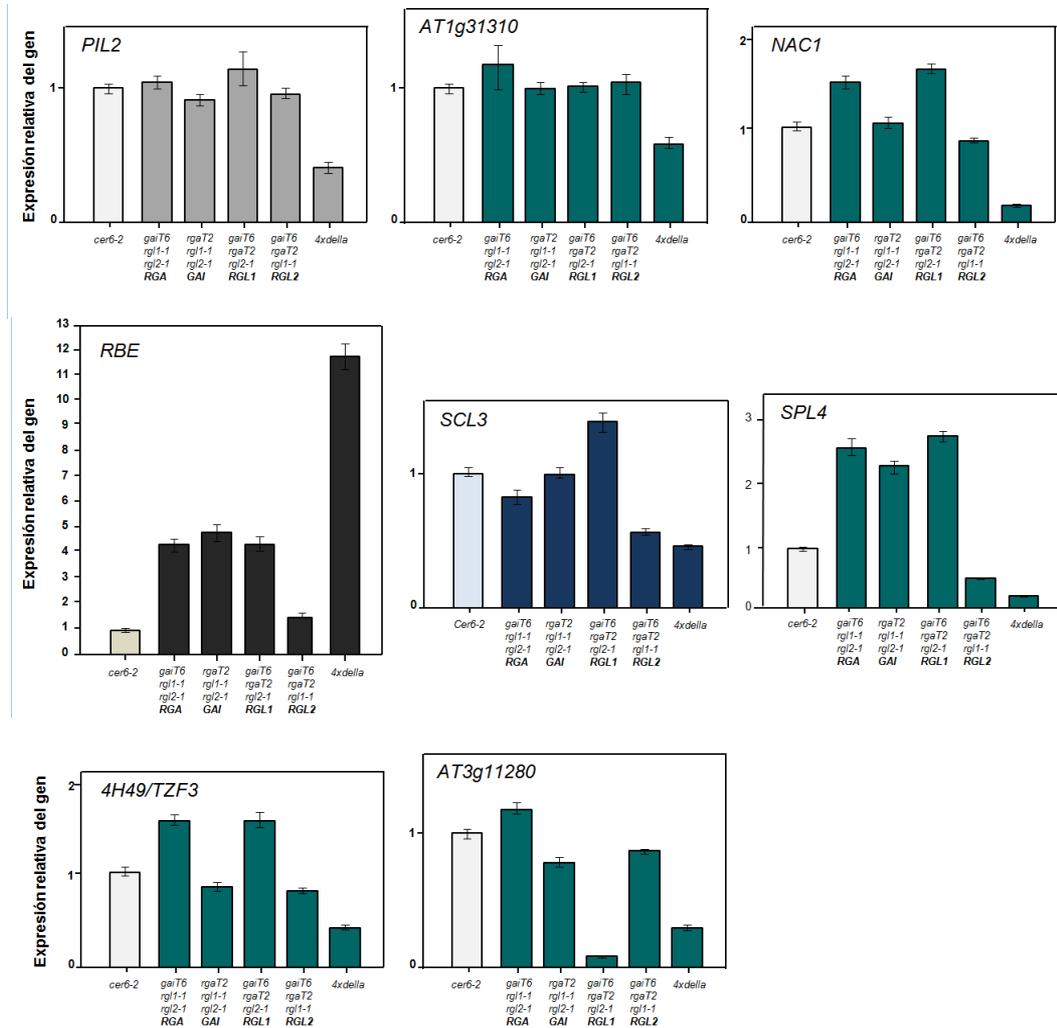
Nombre Gen	PISTILO		Línea <i>cer6-2 4xdella</i> <i>pGAI:gai-1-GR</i>		Regulación por DELLA
	Micromatriz	qPCR	Plántula +/- CHX	Pistilo +/- CHX	
<i>At1g31310</i>	0,45	0,49	1,16*	2,53	Inducción
<i>SCL3</i>	0,45	0,26	4,84	3,71	Inducción
<i>SPL4</i>	0,31	0,33	0,53*	4,02	Inducción
<i>NAC1</i>	0,22	0,32	0,83*	2,67	Inducción
<i>At3g11280</i>	0,5	0,21	1,16*	2,90	Inducción
<i>PIL2</i>	0,36	0,50	2,43	3,23	Inducción
<i>4H49/TZF3</i>	0,34	1,02	0,96*	2,05	Inducción
<i>RBE</i>	9,98	7,18	0,62	0,28	Represión

#### 4.4. Primera aproximación experimental para conocer el rol biológico en fructificación de las dianas directas de GAI

Una vez identificado un grupo reducido de genes que son dianas directas de GAI en pistilo y/o en plántula (Tabla 4.9), se procedió a realizar estudios preliminares encaminados a determinar la implicación biológica de estas dianas directas en fruto.

Una primera aproximación ha sido la de estudiar si las 4 DELLAs que participan en el desarrollo del fruto regulan estos FTs del mismo modo. Para ello se evaluaron los perfiles de expresión en pistilo en los 4 mutantes *3xdella* y el *4xdella* (Figura 4.20). Este análisis y el conocimiento de los patrones espaciales

de expresión de las 4 proteínas DELLA mostrado en el Capítulo 1, permitiría inferir su posible función en los pistilos y frutos.



**Figura 4.20. Regulación por DELLAs de las dianas directas de GAI en pistilo.** Perfiles de expresión de los 8 FTs en cada uno de los fondos mutantes *3xdella*, el *4xdella* y el parental *cer6-2*. Los niveles de expresión están normalizados al de *cer6-2*.

Se observó que la expresión de *PIL2*, *At1g31310*, *4H49/TZF3* y *NAC1* no está alterada en ninguno de los 4 mutantes triples, indicando que todas las proteínas DELLA participan en su regulación de forma conjunta, es decir, es necesario eliminar las 4 DELLA (en el mutante *4xdella*) para alterar la expresión de estos genes. Por otra parte, se observó que *RBE* está regulado principalmente por RGL2, ya que su expresión aumenta en presencia de la mutación *rgl2-1*, mientras

que en el triple *gaiT6 rgaT2 rgl1-1* que expresa la versión silvestre de RGL2, su expresión no se ve alterada. Al contrario de lo observado para *RBE*, RGL2 parece ser la DELLA minoritaria en la regulación de *SCL3* y *SPL4* ya que la expresión en el *4xdella* y en el triple *gaiT6 rgaT2 rgl1-1* es similar. Para otros genes también se observa regulación diferencial, como *At3g11280* en el cual RGL1 es la DELLA con una participación menor.

Es posible que las diferencias en regulación sean indicativas de los sitios de expresión de estos FTs, que deben coincidir con la expresión de las proteínas DELLA que los regulan. Por ejemplo, la regulación por RGL2 observada para *RBE* y *At3g11280*, podría sugerir que el sitio de expresión ó de acción estaría asociado al óvulo, ya que es RGL2 la DELLA específica de óvulo. De hecho *RBE* es un gen que se expresa en óvulo específicamente en la zona de los integumentos (Takeda *et al.*, 2014). Al contrario, los genes *SCL3* y *SPL4* podrían estar asociados a la valva al no estar regulados por RGL2.

#### **4.4.1. Estudio de la implicación en germinación y fructificación de la diana PIL2- Phytochrome interacting factor 3- Like 2**

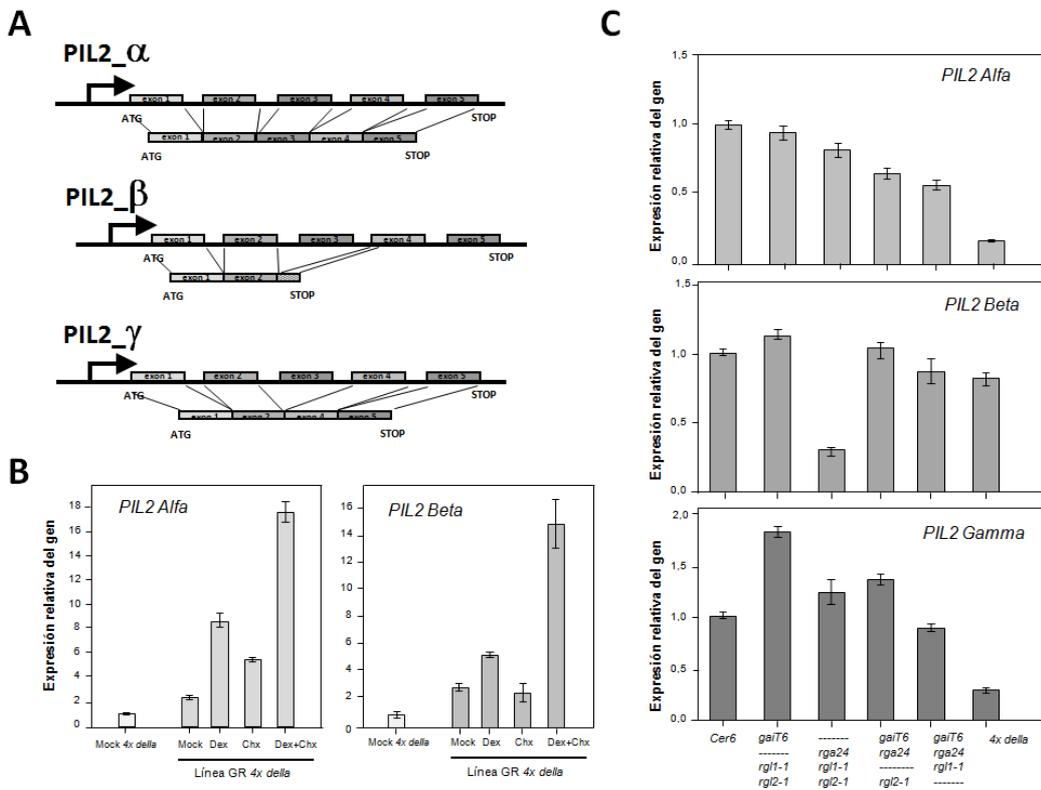
Una de las dianas tempranas de GAI identificada es PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE2 (*PIL2/PIF6*), cuya expresión se induce por las 4 proteínas DELLA tanto en plántula como en pistilo (Figuras 4.17, 4.19 y 4.20). Se realizó una caracterización genético-molecular de este gen para conocer si ejerce alguna función significativa durante la fructificación y las fases tempranas del desarrollo del fruto.

Este gen codifica tres isoformas o transcritos. *PIL2- $\alpha$*  se corresponde con la proteína completa con 5 exones (Figura 4.21A). *PIL2- $\gamma$*  es una variante de "splincing" que ha perdido el tercer exón. Finalmente *PIL2- $\beta$*  tiene un condón de parada al inicio del tercer exón perdiendo el 4<sup>to</sup> y 5<sup>to</sup> exón perdiendo la región que codifica para el dominio bHLH (Penfield *et al.*, 2010).

Con la finalidad de definir la regulación de las diferentes isoformas de *PIL2* por las DELLA se testó la respuesta en tratamientos con Dex y Chx en la línea *cer6-2*

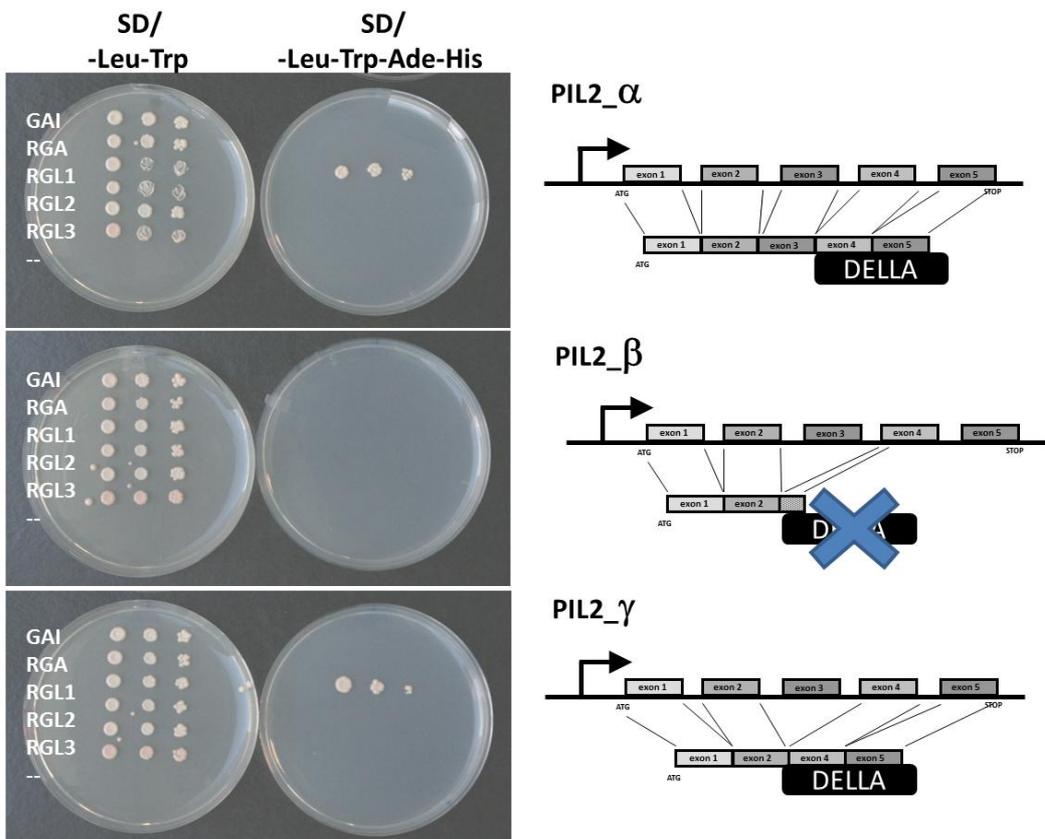
*4xdella pGAI:gai-1-GR* y los niveles de expresión de los transcritos en pistilo entero de los mutantes triples de *3xdella* y *4xdella*. Se observó que el transcrito más abundante en los pistilos es *PIL2-α* (datos no mostrados), y que los transcritos *PIL2-α* y *PIL2-β* beta responden como dianas directas de DELLA (Figura 4.21B).

Por otra parte se observó que *PIL2-α* se reprime en el *4xdella* y se regula por todas las DELLA casi al mismo nivel, aunque RGL2 parece ser la que menos contribuye (Figura 4.21C). Los niveles de *PIL2-β* no se ven afectados en el *4xdella* pero si en el triple *rgaT2 rgl1-1 rgl2-1*, lo que sugiere que se regula minoritariamente por GAI. Finalmente *PIL2-γ* se reprime en el *4xdella* y es RGA la proteína que lo regula en mayor medida.



**Figura 4.21. Expresión de los transcritos de las tres isoformas de *PIL2* en pistilo entero en respuesta a Dex y Chx y en los mutantes *3xdella* y *4xdella*.** **A.** Esquema de la estructura génica de las tres isoformas de *PIL2*. **B.** Expresión *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* tratadas con Dex y Chx. **C.** Expresión en los mutantes *3xdella* y *4xdella*. Dex, Dexametasona; Chx, Cicloheximida; Dex+Chx, tratamiento combinado Dex y Chx.

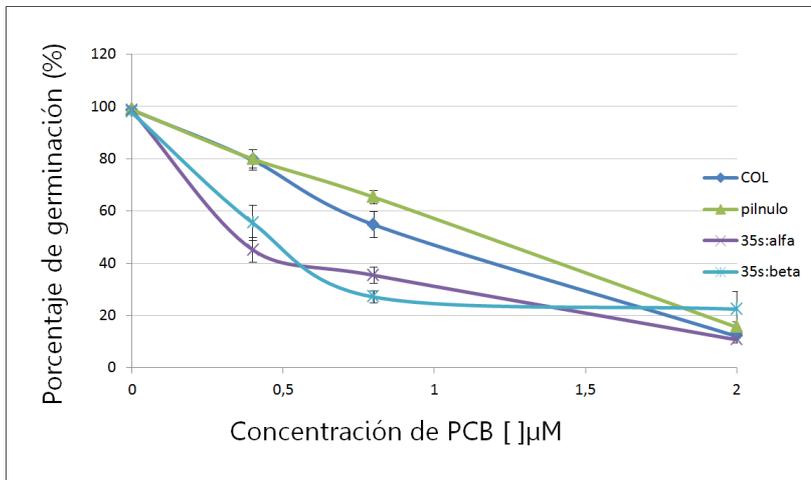
Para saber si PIL2, además de ser una diana, es también un interactor de DELLA, se realizó un estudio de doble híbrido en levadura. Para ello se utilizaron versiones truncadas de las proteínas DELLA, eliminando los dominios DELLA y TVHYNP que provoca la transactivación en levadura (denominadas M5-RGA, M5-GAI, M5-RGL1, M5-RGL2, y M5-RGL3) (de Lucas, M. *et al.*, 2008), proporcionadas por la Dra. Salomé Prat (CNB, Madrid), fusionadas al dominio de unión a DNA (BD) del factor Gal4. Cada una de las isoformas de PIL2 se fusionó al dominio de activación Gal4. Los resultados mostraron que existe interacción física entre RGL1 y las isoformas PIL2- $\alpha$  y PIL2- $\gamma$  pero no con la isoforma PIL2- $\beta$  lo que sugiere que la interacción de las DELLA con PIL2 reside en los exones 4 y 5 (dominio C-terminal de la proteína), que contienen el dominio bHLH (Figura 4.22).



**Figura 4.22. Ensayo de doble híbrido de levaduras de la interacción entre las DELLAs y las tres isoformas de PIL2.** Se observa que RGL1 interactúa físicamente con las isoformas PIL2- $\alpha$  y PIL2- $\gamma$ , aquellas que contienen el dominio bHLH. El experimento se repitió 2 veces obteniendo resultados similares. Se verificó la correcta acumulación de las proteínas DELLA y PIL2 por análisis "western blot" (Anexo 8).

Para comprobar si PIL2 participa en procesos mediados por GAs, se analizó el fenotipo mutante *pil2-2* (un mutante nulo completo para las 3 isoformas) y de las líneas de sobre-expresión *35S:PIL2- $\alpha$*  y *35S:PIL2- $\beta$*  (Penfield *et al.*, 2010) en germinación, ensayos de fertilidad y de respuesta del pistilo a tratamientos con GAs.

Los resultados de los ensayos de germinación muestran que mientras no existen alteraciones en *pil2-2* en presencia de PCB, las líneas de sobre-expresión *35S:PIL2- $\alpha$*  y *35S:PIL2- $\beta$*  exhiben una hiper sensibilidad a PCB (Figura 4.23), lo que podría indicar que PIL2 podría mediar la función de las GAs en la germinación.

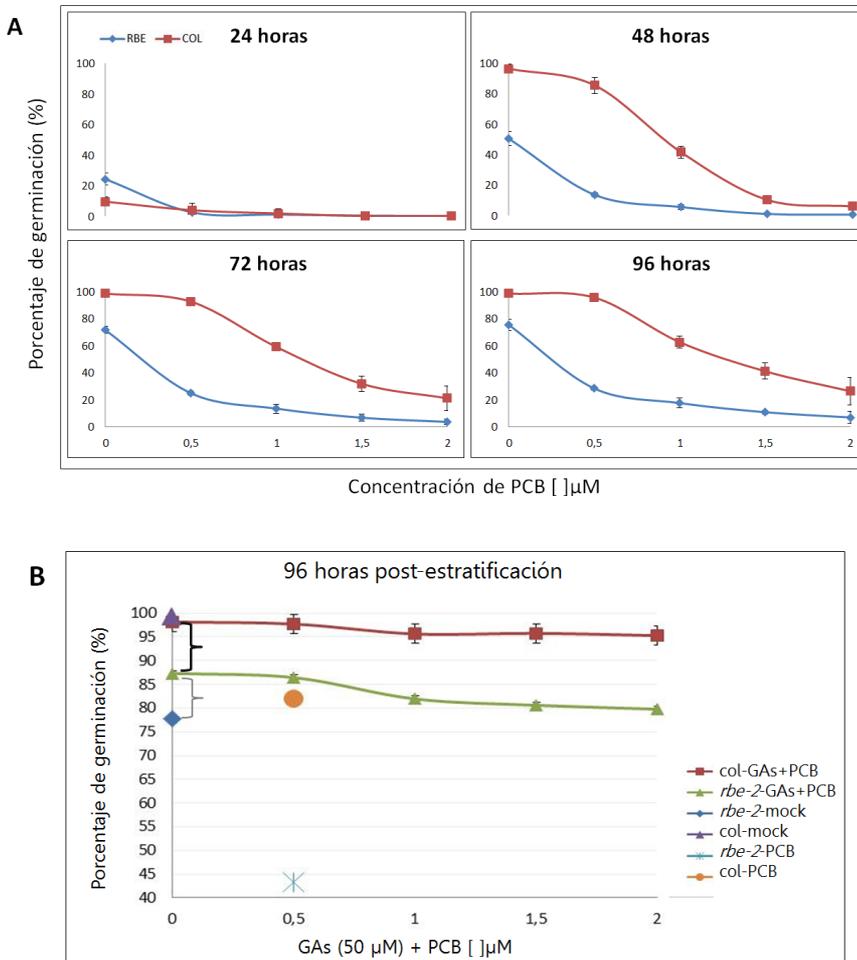


**Figura 4.23. Ensayo de germinación del mutante nulo *pil2-2* y las líneas sobreexpresantes bajo diferentes concentraciones de PCB.** Se observa una hiper sensibilidad de las líneas sobreexpresantes *35S:PIL2- $\alpha$*  y *35S:PIL2- $\beta$*  en presencia de PCB. Se realizaron tres réplicas biológicas obteniendo resultados similares. PCB: Paclobutrazol.

Los ensayos de fertilidad y de respuesta del pistilo a aplicaciones exógenas con GAs en el mutante nulo *pil2-2* y en las líneas de sobre-expresión *35S:PIL2- $\alpha$*  y *35S:PIL2- $\beta$*  no mostraron ninguna diferencia significativa con respecto al control Col0 (datos no mostrados). Por lo tanto, la función de PIL2 en fructificación no pudo ser confirmada. Es probable que la redundancia génica presente en la familia génica de los PIL sea una de las causas que contribuya a la ausencia de fenotipo en el pistilo.

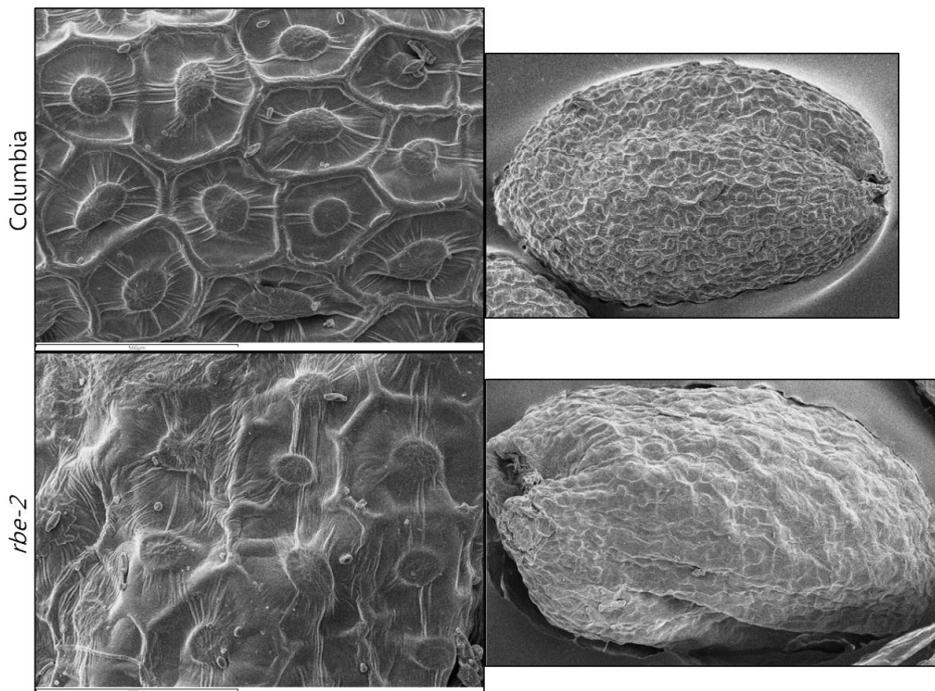
#### 4.4.2. Estudio de la implicación en germinación y fructificación de la diana RBE

RBE (RABBIT EARS) es una diana directa de DELLA, cuya expresión es reprimida por GAI tanto en plántula como en pistilo. Con el fin de definir la implicación de RBE en procesos mediados por GAs, se estudió la germinación del mutante nulo *rbe-2* (Takeda *et al.*, 2014) bajo diferentes concentraciones de PCB. Se observó que *rbe-2* presenta un fenotipo severo en germinación mostrando una alta sensibilidad especialmente a tratamientos con PCB de 0,5 - 1  $\mu$ M (Figura 24A).



**Figura 4.24. Ensayos de germinación del mutante nulo *rbe-2*.** **A.** Se representa el porcentaje de germinación del mutante *rbe-2* y el fenotipo silvestre Col0 bajo diferentes concentraciones de PCB durante 96 horas post estratificación. **B.** Ensayo de germinación de *rbe-2* bajo diferentes condiciones de PCB y GAs. Porcentajes de germinación de *rbe-2* y Col0 sin tratamiento (mock), tratado con diferentes concentraciones de PCB y tratado con PCB y 50  $\mu$ M de GAs.

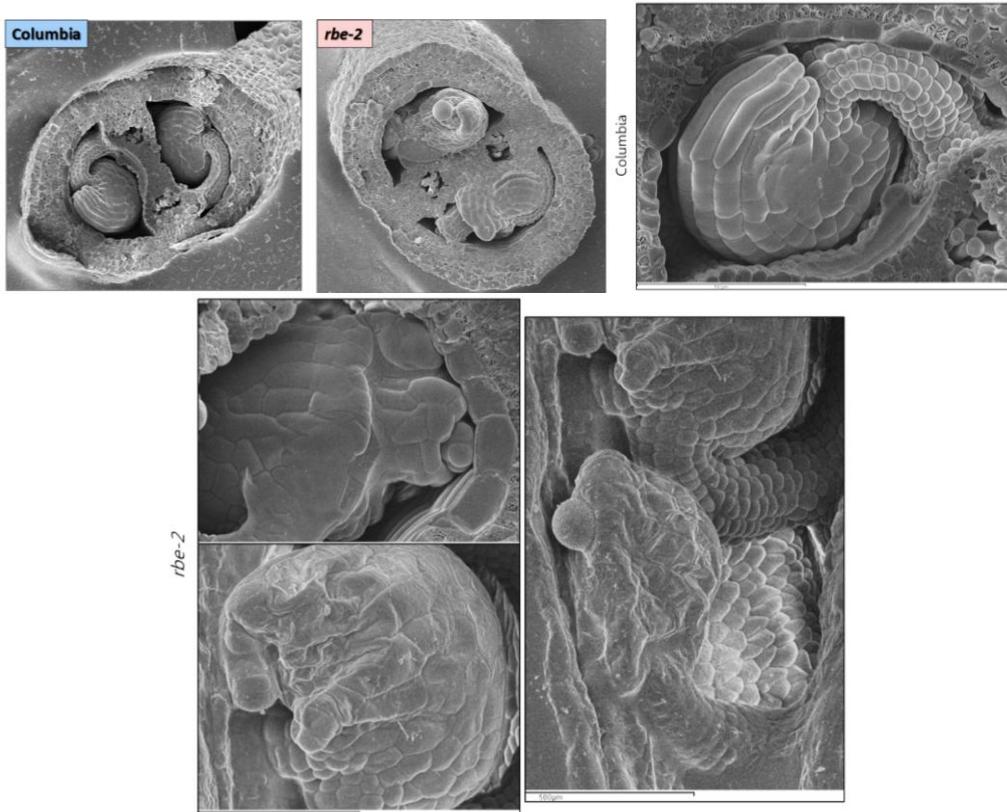
Adicionalmente, se realizaron ensayos de germinación con PCB en combinación con una dosis de 50  $\mu$ M GAs (para neutralizar el efecto inhibitorio en la germinación causado por PCB) (Figura 24B). Los resultados mostraron que el porcentaje de germinación de *rbe-2* en MS es cercano al 77%, y aumenta al 87% con GAs. Sin embargo, dicho incremento no alcanza al del control Col0 (100%) bajo las mismas condiciones, indicando que la implicación de RBE en la germinación mediada por GAs no es el único factor que determina la baja germinación de *rbe-2*, pudiendo contribuir los defectos en la forma de la semilla. Se observó que las semillas de *rbe-2* son diferentes en forma, tendiendo a ser ovaladas y con una superficie irregular, debido a que la testa presenta un cambio en la conformación de sus células (Figura 4.25). Estas alteraciones en la forma de la semilla, podría explicar los defectos de germinación del mutante en presencia de GAs observados en la Figura 4.24.



**Figura 4.25. Imágenes de la superficie de la semilla de Col0 y *rbe-2*.** Se observa que en *rbe-2* la geometría de las células de la testa es irregular y que las semillas son ovaladas o alargadas.

**Figura 4.24.** Se observa que aunque *rbe-2* mejora el porcentaje de germinación con GAs, no logra llegar al mismo nivel de germinación que Col0. Se realizaron tres réplicas biológicas en cada ensayo con resultados similares. PCB, paclobutrazol. Paréntesis gris y negro indica el aumento de germinación entre *rbe-2* y Col0 no tratados y tratados con GAs, respectivamente.

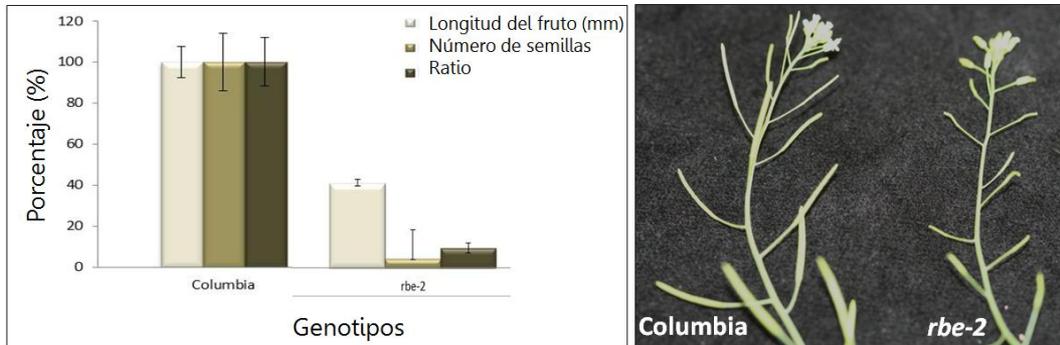
Estudios previos han mostrado que *RBE* se expresa en óvulo, específicamente en los integumentos (Takeda *et al.*, 2014), lo que concuerdan con las alteraciones que muestran los óvulos de *rbe-2*, con una deformación severa a causa de defectos en la extensión de los integumentos (Figura 4.26). Estas deformaciones en los óvulos serían los responsables de las alteraciones observadas en las semillas maduras.



**Figura 4.26. Imágenes de pistilos en antesis y óvulos del mutante *rbe-2* y Col0.** Se observa que los óvulos de *rbe-2* tienen defectos en la extensión de los integumentos. La barra de escala representa 500  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, se evaluó la implicación de RBE en la formación del fruto mediada por GAs, estudiando la fertilidad y la respuesta a tratamientos exógenos con GAs de los pistilos de *rbe-2*. Los resultados indican que *rbe-2* presenta serios problemas de fertilidad, con reducciones claras tanto del tamaño de silicua como del número de semillas (Figura 4.27). Los defectos de fertilidad serían consecuencia de las alteraciones observadas en los óvulos del mutante, que

afectarían a la correcta fecundación y desarrollo de las semillas correspondientes.

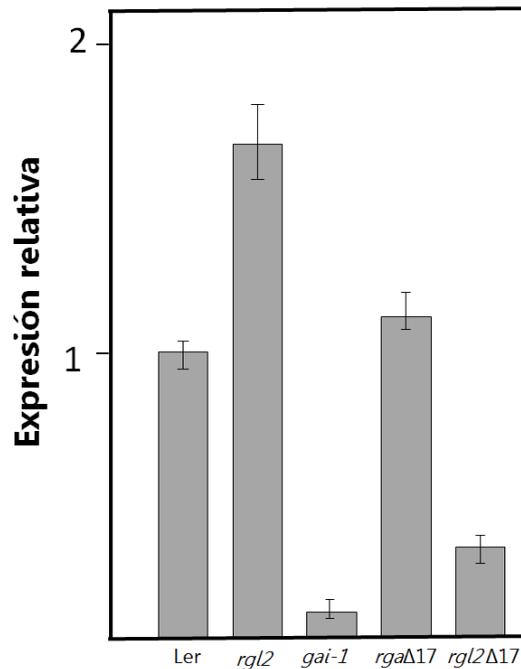


**Figura 4.27. La fertilidad del mutante *rbe-2* está severamente afectada.** Se determinó la longitud, el número de semillas, y la ratio (número de semillas vs. longitud) de frutos maduros autopolinizados de 14 dpa. El mutante *rbe-2* produce un número muy reducido de semillas lo que afecta a su longitud y al ratio. Se representa la media y la SD de al menos 50 pistilos/frutos por tratamiento. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

La expresión de *RBE* en los fondos *3xdella* y *4xdella* indicaron que se regula principalmente por *RGL2* (Figura 4.20). Para confirmar estos datos se examinó su expresión en los mutantes dominantes *gai-1*, *rgaΔ17* y *rgl2Δ17*, y en el mutante nulo *rgl2-1* (Figura 4.28), observándose que tanto *gai-1* como *rgl2Δ17*, pero no *rgaΔ17*, reprimen su expresión, que aumenta en el nulo *rgl2-1*, confirmando que *RGL2* es la DELLA que parece regular su expresión de forma mayoritaria. Cabe destacar que previamente se mostró que *RGL2* se expresa en óvulos (Figuras 3.9B y 3.10), al igual que *RBE* (Takeda *et al.*, 2014), lo que sugiere que *RGL2* regula la expresión de *RBE* en los óvulos para controlar procesos relacionados con la ontogenia del óvulo.

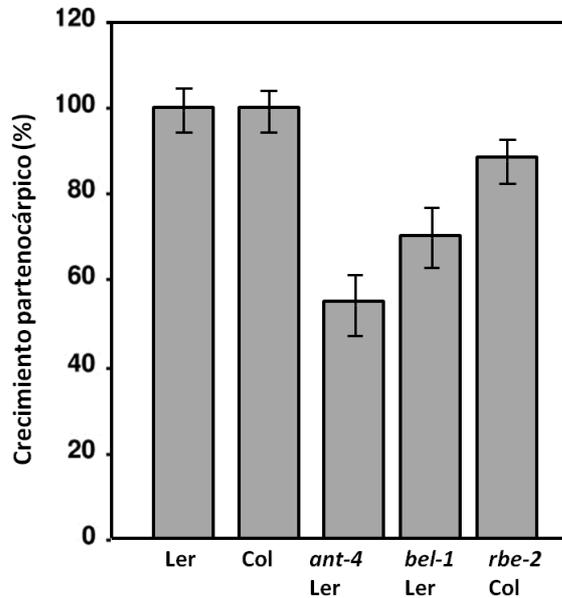
Estudios previos han sugerido que un óvulo viable es requerido para una apropiada respuesta del pistilo a las GAs, ya que mutantes de desarrollo de óvulo, como *bel-1* y *ant-4*, tienen afectada la respuesta y que la pérdida de respuesta de los pistilos se correlaciona con la entrada en senescencia de los óvulos (Carbonell-Bejarano *et al.*, 2010). El mutante *bel-1* desarrolla solo una capa de integumento que posteriormente forma un tejido engrosado, de tal forma que el saco embrionario no se desarrolla en su totalidad y degenera (Carbonell-Bejarano *et al.*, 2010). El mutante severo *ant-4* no desarrolla

integumentos ni saco embrionario (Klucher *et al.*, 1996; Carbonell-Bejerano *et al.*, 2010). Se evaluó la respuesta a GAs de pistilos de *rbe-2* en paralelo con los de *bel-1* y *ant-4* para comprobar si ésta estaba también afectada. Sin embargo, se observó que la respuesta de *rbe-2* es muy similar al control en comparación con la de *bel-1* y *ant-4* (Figura 4.29), indicando que el defecto en los óvulos del mutante *rbe-2* no es lo suficientemente drástico como para limitar la percepción o la respuesta del óvulo a las GAs.



**Figura 4.28. RBE se regula mayoritariamente por RGL2.** Se representan los niveles del transcrito de *RBE* en los diferentes fondos mutantes. La expresión de *RBE* se induce en el mutante nulo *rgl2-1* y se reprime en los mutantes dominantes *rgl2Δ17* y *gai-1*, pero no en *rgaΔ17*. Se realizaron 2 réplicas biológicas con resultados similares.

En resumen, los datos parecen indicar que RGL2 regula la expresión de RBE para el correcto desarrollo del óvulo y por consiguiente para una óptima fertilidad. Sin embargo RBE no está asociado en la regulación de la elongación de la valva mediada por GAs.



**Figura 4.29. Respuesta de los pistilos de *rbe-2* a tratamientos exógenos con GAs.** Se representa la respuesta de los pistilos de mutantes de óvulo a tratamientos con GA<sub>3</sub>. Se determinó la longitud de los frutos a los 10 días post tratamiento con GA<sub>3</sub>. Se representan el porcentaje de crecimiento partenocárpico (longitud final de pistilo tratado con GA<sub>3</sub> dividido sobre la longitud del pistilo no tratado, para cada genotipo), normalizado para los respectivos fondos Ler y Col0. Los datos son la media y la SD de al menos 30 pistilos. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares.

#### 4.5. Discusión Capítulo 2

Avances recientes en el área han permitido dilucidar el mecanismo molecular que media la acción de las proteínas DELLA en el control del desarrollo vegetativo en *Arabidopsis* (Zentella *et al.*, 2007; de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011) y en el desarrollo de la flor (Hou *et al.*, 2008). Continuar estos estudios para identificar los genes que median su acción en el desarrollo reproductivo y la fructificación es clave para comprender cómo las GAs controlan estos procesos. En este estudio hemos identificado 8 dianas primarias o directas de la proteína GAI que estarían potencialmente implicadas en el control del desarrollo temprano del fruto en *Arabidopsis*.

Hemos comprobado cómo se produce un gran cambio en el programa transcriptómico en las fases tempranas tras la fructificación. El hecho de no identificar categorías funcionales características, junto con el elevado número de

genes diferenciales identificados, indican que la fructificación es un proceso complejo, en el que participan tanto múltiples rutas bioquímicas como diferentes tejidos y órganos. Sin embargo, destaca la alta proporción de genes implicados en la respuesta hormonal, principalmente de auxinas, etileno, ABA, JA y CKs. Aunque se considera que las GAs y las auxinas son las hormonas principales en regular el proceso de fructificación, nuestros datos sugieren que otras hormonas podrían estar implicadas en este proceso. Además, los análisis han permitido identificar genes relacionados con la identidad y desarrollo floral que, además, están también relacionados con la respuesta hormonal, como los genes de respuesta JA y genes de tipo *AGAMOUS*. Se sabe que *AGAMOUS* regula la maduración del estambre por el control directo de los genes de biosíntesis de JA (Hou *et al.*, 2008). Por otro lado, muchas de las dianas directas identificadas en este trabajo no solo están reguladas por GAs, sino que también están implicadas en otras rutas hormonales, como *NAC1* que se induce por auxinas (Henanff *et al.*, 2013), *bZIP58* que interactúa con *ABI3* en la maduración de la semilla por ABA (Ehlert *et al.*, 2006), o *TZF3* implicado en respuesta a ABA y JA (Lee *et al.*, 2012).

Además, hemos realizado una primera aproximación experimental para conocer la implicación biológica de las dianas directas PIL2 y RBE en la respuesta a GAs. Hemos comprobado que PIL2 es diana e interactor de DELLA. Además hemos comprobado la interacción proteína-proteína de las isoformas PIL2- $\alpha$  y PIL2- $\gamma$  con RGL1, lo que sugiere que la unión con la DELLA es a través del extremo C-terminal de PIL2. Previamente Gallego-Bartolomé *et al.* (2010) mostró una interacción de PIL2 con RGA y RGL2, si bien en este trabajo no se realizó una distinción entre las 3 isoformas. Nuestros datos indican que *PIL2* está implicado en la germinación mediada por GAs. En un estudio previo se mostró que *PIL5* es un regulador negativo de la germinación en *Arabidopsis* (Oh *et al.*, 2004). De hecho, los dos genes forman parte del grupo *PIF3* de la familia de los PIL, por lo que es probable que participen en procesos biológicos similares. Su función en fructificación no se ha podido evidenciar utilizando mutantes simples, debido posiblemente a la redundancia génica de la familia PIL, lo que hace necesario utilizar mutantes con lesiones en varios genes de la familia.

Finalmente, hemos realizado una primera aproximación para conocer la implicación biológica de RBE en el desarrollo del fruto. Se ha reportado que RBE reprime la transcripción de *AG* y *miR164c*, reguladores de la expresión de *CUC1* y *CUC2* responsables de la organogénesis de pétalos y sépalos (Huang *et al.*, 2012; Takeda *et al.*, 2014). Nuestros datos indican que RBE está implicado en la germinación mediada por GAs y en el desarrollo del fruto de una forma indirecta, es decir, por su implicación en la ontogenia del óvulo y por tanto en la fertilidad.

# 5- Conclusiones



Las conclusiones de esta Tesis son:

1. La expresión de los genes de biosíntesis de GAs, de los receptores GID1 y de las proteínas DELLA son diferenciales en los pistilos y frutos de *Arabidopsis*.
2. Existe una correlación entre los patrones de expresión espacial de los genes de biosíntesis, GID1s y DELLAs en los pistilos.
3. Los datos de co-expresión son consistentes con estudios *in vitro* de la afinidad de las interacciones entre GA-GID1-DELLA, lo que sugiere la existencia de una co-evolución entre la afinidad y la expresión de los genes de este complejo, al menos en el fruto.
4. Los receptores GID1A y GID1B participan en la formación y desarrollo de la semilla, mientras que los receptores GID1A y GID1C están implicados en la elongación de la valva dependiente de GAs.
5. El análisis transcriptómico revela la alta complejidad de la red regulatoria que define la fructificación y el desarrollo temprano del fruto de *Arabidopsis*.
6. *RBE* es una diana directa de DELLA, que se regula positivamente por GAs. La caracterización del mutante nulo sugiere su implicación en la fructificación, específicamente en procesos relacionados con la ontogenia del óvulo, así como en germinación mediada por GAs.
7. *PIL2* es una diana directa de DELLA, que se regula negativamente por GAs. *PIL2* interacciona físicamente con *RGL1* a través del dominio C-terminal. Los datos de los alelos mutantes sugieren una función de *PIL2* en germinación mediada por GAs, mientras que su función en fructificación no pudo ser confirmada, debido posiblemente a la redundancia génica.



# **6-Materiales y Métodos**



## 6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col0) y Landsberg erecta (*Ler*). También se utilizó el mutante androestéril condicional *cer6-2* (Preuss *et al.*, 1993, Fiebig *et al.*, 2000) en el fondo *Ler*, obtenido del Stock Center del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC).

Los mutantes simples de los genes *GID1* utilizados fueron los descritos previamente por Griffiths *et al.* (2006): *gid1a-1* (SALK\_142767), *gid1b-1* (SM\_3\_30227) y *gid1c-1* (SALK\_023529), en fondo Col0 y mencionados en el texto como *gid1a*, *gid1b* y *gid1c*, respectivamente. Los dobles mutantes *gid1a-1 gid1b-1*, *gid1a-1 gid1c-1* y *gid1b-1 gid1c-1* se generaron por cruzamiento genético, y se confirmaron por genotipado usando los oligos descritos en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1. Oligos usados en el genotipado de los mutantes *gid1* con DNA genómico\***

Gen	Código	Oligo (5' - 3')	Secuencia oligo	Referencia
<i>GID1A</i>	<i>At3g05120</i>	<i>GID1a-F</i> <i>GID1a-R</i> LBA1	GGGTTAACTCGAGATCTTGGC CGCCGAAATCTCATCCATAACA TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	En este trabajo En este trabajo Griffiths <i>et al.</i> , 2006
<i>GID1B</i>	<i>At3g63010</i>	<i>GID1b-F</i> <i>GID1b-R</i> SALT-3	TCTCCTGTCCACCAACATTG CTGGGTTTTGGAGACTATGGC CTTATTTACAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG	Griffiths <i>et al.</i> , 2006 Griffiths <i>et al.</i> , 2006 Griffiths <i>et al.</i> , 2006
<i>GID1C</i>	<i>At5g27320</i>	<i>GID1c-F</i> <i>GID1c-R</i> LBA1	ACCACCACCTCTTATTAGCTC CAGGGGAACCTATACACAAACACAAC TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	En este trabajo En este trabajo Griffiths <i>et al.</i> , 2006

\*Para el genotipado del locus silvestre, el oligo directo fue combinado con el correspondiente oligo reverso. Para el genotipado de los alelos mutantes, se utilizó el correspondiente oligo reverso y el oligo correspondiente a los T-DNAs, LBA1 para *gid1a* y *gid1c* y SALT-3 para *gid1b*.

Para los estudios de degradación del endocarpo y la caracterización de la expresión de las dianas primarias de las proteínas DELLA se utilizaron los 4 mutantes *3xdella* (*gaiT6 rgaT2 rgl1-1*, *gaiT6 rgaT2 rgl2-1*, *rgaT2 rgl1-1 rgl2-1* y *gaiT6 rgl1-1 rgl2-1*) y el mutante *4xdella* (*rgaT2 gaiT6 rgl2-1 rgl1-1*) (Cheng *et al.*,

2004), todos ellos en el fondo *cer6-2* y ecotipo *Ler*. También se utilizó el mutante cuádruple de pérdida de función (*4xdella*) *rgaT2 gaiT6 rgl2-1 rgl1-1* (Cheng *et al.*, 2004) introgresado igualmente en el fondo *cer6-2*.

Para la identificación de dianas primarias de DELLA se utilizó la línea GAI (*pGAI:gai-1-GR*) (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011) introgresada en el fondo *cer6-2 4xdella*. Estos cruzamientos fueron genotipados con la lista de oligos de la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2. Oligos usados en el genotipado de la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR***

Alelo	Oligo (5' - 3')	Secuencia oligo	Producto PCR	Referencia
<i>gai-T6</i>	300-F 302-R T6-304	CTAGATCCGACATTGAAGCA AGCATCAAGATCAGCTAAAG TCGGTAGGGGATTTTCGCAT	wt: 1100 bp mutante: 600 bp	Este trabajo Este trabajo Este trabajo
<i>rga-T2</i>	906-F 2076-R T2-DS3-2	GCCGGAGCTATGAGAAAAGTGG AAGAATTTTAAACAAGTGAACG CCGGTATATCCCGTTTTTCG	wt: 1200 bp mutante: 1000 bp	Este trabajo Este trabajo Este trabajo
<i>rgl1-1</i>	1670-F 2295-R 1-DS5-P1	AAGCTAGCTCGAAACCCAAAT CCACAGAGCGCGTAGAGGATAAC CATGGGCTGGGCCTCAGTG	wt: 650 bp mutante: 400 bp	Este trabajo Este trabajo Este trabajo
<i>rgl2-1</i>	856-F 1883-R 1-DS3-2	GCTGGTGAAACGCGTGGAACA ACGCCGAGGTTGTGATGAGTG CCGGTATATCCCGTTTTTCG	wt: 1100 bp mutante: 650 bp	Este trabajo Este trabajo Este trabajo
<i>cer6-2</i>	dcer6-F dcer6-2-R	TCGTGTCCCCTTCGCAACTTTCAT GTCCATGGTTGGTGTGGGAGGAATCTAA	wt: 163 bp mutante: sitio corte dde-I 1100 bp	Este trabajo Este trabajo
<i>pGAI:gai-1-GR</i>	FV320-GR GAI609	TGCTGAATCCCTTTGATTTTTTC CGGAGCTATGAGAAAAGTCGCT	1100 bp	Este trabajo Este trabajo

\*Para el genotipado del locus silvestre, el oligo directo fue combinado con el correspondiente oligo reverso. Para el genotipado de los alelos mutantes, se combinó el oligo directo con el correspondiente oligo del alelo mutante.

Las construcciones de fusión traduccional *pGID1A:GID1A-GUS*, *pGID1B:GID1B-GUS* y *pGID1C:GID1C-GUS* (Suzuki *et al.*, 2009) fueron proporcionadas por el Dr. Nakajima de la Universidad de Tokio. Las semillas de las construcciones traduccionales de *pGA20ox1:GA20OX1-GUS* (Hay *et al.*, 2002) y *pGA20ox2:GA20OX2-GUS* (Frigerio *et al.*, 2006) fueron cedidas por el Dr. Hedden de Rothamsted Research Center. Las semillas de las construcciones transcripcionales *pGA30x1:GA3ox1-GUS*, *pGA30x3:GA3ox3-GUS* y

*pGA30x4:GA3ox4-GUS* (Hu *et al.*, 2008) fueron proporcionadas por la Dra. Tai-ping Sun de la Universidad de Duke (NC, EEUU).

Para la caracterización biológica de PIL2 se usaron las líneas *35S:PIL2- $\alpha$*  y *35S:PIL2- $\beta$*  (Penfield *et al.*, 2010) y el mutante *pil2-2* (SALK\_147579) aislada de una colección de inserción de T-DNA (Alonso *et al.*, 2003). Para los estudios biológicos de RBE se usó el mutante *rbe-2* (SALK\_037010C) de inserción de T-DNA. Para los estudios de crecimiento partenocárpico de los mutantes de óvulo se utilizaron los mutantes *bel-1* (Robinson-Beers *et al.*, 1992) y *ant-4* obtenidos del ABRC.

Las semillas se esterilizaron superficialmente con etanol (EtOH). Para ello se incubaron en EtOH 70% y Tritón X-100 0,05% como agente mojante durante 15 min en agitación, seguido de una incubación de 10 min en EtOH 96%. Las semillas se depositaron sobre un papel de filtro estéril y se dejaron secar en la cabina de flujo laminar. Una vez secas, las semillas se distribuyeron en placas petri con medio nutritivo MS ½ (Murashige y Skoog, 1965), se incubaron a 4°C durante 4 días para su estratificación y finalmente se transfirieron a cabinas de crecimiento, con fotoperiodo de día largo (16/8h) y temperatura media de 22°C, donde permanecieron 10-14 días. A continuación, las plántulas se transfirieron a substrato sólido, consistente en una mezcla de compost, vermiculita y perlita en relación 2:1:1 y se cultivaron en cámaras de crecimiento con fotoperiodo de día largo (16/8h) y temperatura media de 22°C. Para poner de manifiesto el fenotipo *cer6-2* de androesterilidad condicional, las plantas se crecieron en cabinas provistas de un deshumidificador para mantener la humedad relativa menor de 50-60%. Para la obtención de semillas, las plantas se crecieron en alta humedad relativa. Las plantas se regaron durante todo su ciclo de vida con una solución nutritiva estándar (5 mM KNO<sub>3</sub>, 2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

## 6.2. Generación de líneas transgénicas DELLA-GUS

Las construcciones de las fusiones transcripcionales de los promotores de GAI, RGA y RGL1 con el gen GUS (*pGAI:GUS*, *pRGA:GUS* y *pRGL1:GUS*) se

realizaron por el Dr. Jianhong Hu en el laboratorio de la Dra. Tai-ping Sun en la Universidad de Duke (NC, EEUU). Para el gen RGL2 se utilizó el alelo *rgl2-5* que corresponde con la línea de 'gene trap' SGT11937 en la cual el elemento Ds-GUS se inserta en el extremo N-terminal de RGL2 (Lee *et al.*, 2002). El procedimiento de generación de estas construcciones se describe en Gallego-Giraldo *et al.* (2014). Se generaron las líneas transgénicas correspondientes durante una estancia de tres meses en dicho laboratorio. Se transformaron plantas de *Arabidopsis* Col0 con los plásmidos DELLA-GUS y se llevaron a homocigosis aquellas que portaban un único locus de inserción según el patrón de segregación de la resistencia a kanamicina, y siguiendo la metodología descrita en Hu *et al.* (2008). Posteriormente se realizó un testado de estas líneas para seleccionar aquellas con mayor consistencia e intensidad de señal en los perfiles de expresión. Se partió de un total de 32 líneas para las tres construcciones, de las cuales se seleccionaron las líneas *pRGA:RGA-GUS* # 1-3-1, *pGAI:GAI-GUS* # 4-10-1 y *pRGL1:RGL1-GUS* #1-1-2 para los estudios de expresión espacio-temporal de los genes correspondientes.

### 6.3. Ensayos de fructificación

La fertilidad de los mutantes de los receptores *GID1*, y de las dianas *PIL2* y *RBE* se determinó en frutos autopolinizados o frutos provenientes de flores emasculadas, cuyos pistilos fueron polinizados con polen parental. En este caso, las flores se emascularon manualmente (eliminación de sépalos, pétalos y anteras) un día antes de la antesis, y la polinización manual se realizó al día siguiente. Los frutos se recolectaron en el momento de maduración, alrededor de 12-15 dpa. Se determinó el número de semillas y la longitud de la silicua, medida con un calibrador digital. La ratio entre el número de semillas y la longitud se determinó para cada fruto de forma individual.

#### 6.4. Inducción de partenocarpia

Para inducir la partenocarpia se realizaron aplicaciones de la hormona GA<sub>3</sub> en pistilos no polinizados en antesis. Para ello las flores se emascularon un día antes de antesis y se trataron al día siguiente pulverizando la parte aérea de la planta con una solución de 330 µM de GA<sub>3</sub> (Fluka) y 0,01% (v/v) Tween 80, pH 7. La evaluación del crecimiento partenocárpico se realizó recolectando los frutos y los pistilos 10 días después del tratamiento y se escanearon para medir su longitud a partir de la imagen mediante el software Image J. Se realizaron 3 réplicas biológicas en cada experimento con resultados similares.

#### 6.5. Análisis de expresión génica por qPCR

Para los ensayos de expresión de transcritos por qPCR se recolectaron muestras de pistilos y plántulas, según se indica en cada caso, congelándolas inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Todas las recolecciones se realizaron a la misma hora del día para limitar los efectos del ciclo circadiano y/o fotoperiodo.

Para analizar la expresión específica de tejido de los receptores GID1 y las proteínas DELLA, se extrajeron por separado los óvulos-funículos y valvas de pistilos no fecundados de 1, 2 y 3 dpa del mutante androestéril *cer6-2* crecido en condiciones restrictivas para evitar la fecundación. Para ello los pistilos se diseccionaron manualmente usando cuchillas y agujas de acupuntura bajo un estéreo-microscopio. Además se recolectaron pistilos enteros en antesis como control.

El ARN total se extrajo usando el kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). El ADN genómico fue eliminado usando 50 unidades de DNaseI (RNase-free DNase set, Qiagen) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la síntesis de cDNA, se partió de 1 µg de ARN total utilizando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System para qPCR (Invitrogen). Las muestras de cDNA se diluyeron en un volumen total de 80 µl (30 µl para las muestras de óvulos y valvas). Las qPCR

fueron realizadas utilizando el SYBR<sup>®</sup> GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas, se utilizaron placas *MicroAmp<sup>™</sup> Optical 96 Fast-well reaction plate* (Applied Biosystems). Las mezclas de reacción en cada pocillo tuvieron un volumen final de 20 µl (1 µl de cDNA, 10 µl de SYBR<sup>®</sup> GREEN y oligos a una concentración final de 0,5 µM). Las condiciones generales de PCR usadas para la amplificación del ADN fueron de 2 minutos a 50°C, desnaturalización durante 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de amplificación (cada uno consistía en una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una elongación de 1 minuto a 60°C). La reacción fue llevada a cabo en un termociclador *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Los oligos usados para los genes *GID1* y *DELLA* (Tabla 6.3) y para los genes candidatos dianas directas de *DELLA* (Tablas 6.4 y 6.5) se diseñaron con el software Primer Express<sup>™</sup> v2.0 (Applied Biosystems), testando previamente el grado de eficiencia de los oligos para cada gen.

**Tabla 6.3. Oligos usados en qPCR de los genes *GID1* y *DELLA*.**

Gen	Código	Oligo (5' to 3')	Secuencia oligo	Referencia
<i>GID1A</i>	<i>At3g05120</i>	G1DA-qF GID1A-qR	AAACGCTAAAGCTTGTGGAAGAA CCTTTCCAAGTCTCTAAACGCCT	En este trabajo En este trabajo
<i>GID1B</i>	<i>At3g63010</i>	GID1B-qF GID1B-qR	TTCTGTGAGGTCTTGGTTGCGC TCGCGATAACCGAAGTGGTCTCTC	En este trabajo En este trabajo
<i>GID1C</i>	<i>At5g27320</i>	GID1C-qF GID1C-qR	ACAAACGGGTGATATCCACCA AAAACGAGAATCTCGGGCTTTC	En este trabajo En este trabajo
<i>GAI</i>	<i>At1g14920</i>	GAI-qF GAI-qR	CCTCCGTCGTCTAACGCC GTTGACTCAGCCGTCGCTGTAG	En este trabajo En este trabajo
<i>RGA</i>	<i>At2g01570</i>	RGA-qF RGA-qR	AGAAGCAATCCAGCAGA GTGTACTCTCTTCTTACCTTC	En este trabajo En este trabajo
<i>RGL1</i>	<i>At1g66350</i>	RGL1-qF RGL1-qR	GAGTTCATCAATGACGACGGT GTACTCTGAGTCAGGCTT	En este trabajo En este trabajo
<i>RGL2</i>	<i>At3g03450</i>	RGL2-qF RGL2-qR	CACCAAACCCTACCAGC CTATCCACACAACCTTCGGG	En este trabajo En este trabajo
<i>UBQ10</i>	<i>At4g05320</i>	UBQ10-qF UBQ10-qR	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAG	Czechowski <i>et al.</i> , 2005

Tabla 6.4. Oligos usados en qPCR para la identificación de dianas rápidas de DELLA

Gen	Código	Oligo (5' - 3')	Secuencia oligo	Referencia
<i>MYB13</i>	<i>At1g06180</i>	MYB13-F MYB-13R	GGCAACAGATGGTCTGCGATA GTGTGCCAAACATTTTAAATTTTCG	En este trabajo En este trabajo
<i>bZIP58</i>	<i>At1g13600</i>	bZIP58-F bZIP58-R	CACGAAACAAATCAAAGCAAAGA CTCCATGATTGGTGTGGTTATTAT	En este trabajo En este trabajo
<i>ERF38</i>	<i>At2g35700</i>	ERF38-F ERF38-R	CTCACGACGTGGCAGCTTTA AAGCGAGCTCCGGGAAGT	En este trabajo En este trabajo
<i>ERF110</i>	<i>At5g50080</i>	ERF110-F ERF110-R	CGGAGATGTCTGCCATGGT GTGAGCACCTTCAGCCTCAGT	En este trabajo En este trabajo
<i>MYB10</i>	<i>At3g12820</i>	MYB10-F MYB10-R	TGGATGCACCACAATCACTAGA TGGGTTTGTAGTGAGTCTGGTTTAGA	En este trabajo En este trabajo
<i>MYB106</i>	<i>At3g01140</i>	MYB106-F MYB106-R	TCGCTTCCACAGGACAATCAA CGAGTCTTGCACTCTCCATT	En este trabajo En este trabajo
<i>RBE</i>	<i>At5g06070</i>	RBE-F RBE-R	GATGTTAGGGTTGGTCATTGGAA CTAGCCTTAGCTCAAGATCCAACCTC	En este trabajo En este trabajo
<i>NAC1</i>	<i>At1g53160</i>	NAC1-F NAC1-R	CCGAAGGACGATGAGCTTGT GCATGCCATTTTGGGATGT	En este trabajo En este trabajo
<i>SCL3</i>	<i>At1g50420</i>	SCL3-F SCL3-R	CATGGTGGTCACTGAGCAAGA AAACAATGCTGCGTAGGTGTAAAG	En este trabajo En este trabajo
<i>WIP3</i>	<i>At1g08290</i>	WIP3-F WIP3-R	CGGCTGCCATGCTATTGC GCTTACGTTTGTAAATGTGCTGAAGTG	En este trabajo En este trabajo
<i>MYB-Like</i>	<i>At1g31310</i>	31310-F 31310-R	GCAACCTGTTTTGTTACCACTTCA CTATCCTTTGTGGGCAGTATTGG	En este trabajo En este trabajo
<i>MYB-Like</i>	<i>At3g11280</i>	11280-F 11280-R	CGAGCCACGCCAAAAG GATACTTGGCCTGCGTTTGTGTC	En este trabajo En este trabajo
<i>3H49/TZF3</i>	<i>At4g29190</i>	TZF3-F TZF3-R	TGGGTTTCAGTCTCTGCCTACA GGGTTCTTCCCTCAAACCATACT	En este trabajo En este trabajo
<i>MYB-Like</i>	<i>At2g35640</i>	35640-F 35640-R	CTTCGCCGCCTCAACCT GATGTACCTACTGTGGGCGGTATA	En este trabajo En este trabajo
<i>SPL4</i>	<i>At1g53160</i>	SPL4-F SPL4-R	CAAGAAAGATCAAGGGTAGAGATGACA CACTCCTTACTCGTATAGCTTCTCTATCTAAT	En este trabajo En este trabajo
<i>PIL2</i>	<i>At3g62090</i>	<i>PIL2-F</i> <i>PIL2-R</i>	AAAACCTCTGCACCTTTCATTCCA TTGACAAAAGAGTTGGGATTTGGT	En este trabajo En este trabajo
<i>GA2ox8</i>	<i>At4g21200</i>	Forward Reverse	CATGGAGCAATGGCATGTACA GGTTCGTATCACACGGTGT	Gallego-Bartolome J, 2011
<i>PAP1</i>	<i>At1g56650</i>	Forward Reverse	TTGGTTCCCTGAAGCGACGAC GTCAAAGCCAAGGTGTCCC	Gallego-Bartolome J, 2011

**Tabla 6.5. Oligos usados en qPCR para la identificación de las isoformas de *PIL2***

Gen	Código	Oligo (5' - 3')	Secuencia oligo	Referencia
<i>PIL2<math>\alpha</math></i>	At3g62090	<i>PIL2<math>\alpha</math>-F</i> <i>PIL2<math>\alpha</math>-R</i>	CACCTGAGAGAAATCAAAGAAATGATA TGTCGTCCTTGTGAGAGTTAGGTAGT	En este trabajo En este trabajo
<i>PIL2<math>\beta</math></i>	At3g62090	<i>PIL2<math>\beta</math>-F</i> <i>PIL2<math>\beta</math>-R</i>	GGCCACAAGTTCCTGCAAGA TCGATTGTTGTCGTCTCTCA	En este trabajo En este trabajo
<i>PIL2<math>\gamma</math></i>	At3g62090	<i>PIL2<math>\gamma</math>-F</i> <i>PIL2<math>\gamma</math>-R</i>	GGCCACAAGTTCCTGCAAGA CGATTGTTGTCGTCTCTCTCA	En este trabajo En este trabajo

Los valores de expresión génica se calcularon mediante la cuantificación de la fluorescencia en un punto de la fase exponencial de la reacción de amplificación (umbral) asociado a un número de ciclos concreto para cada gen (Ct). A partir del parámetro Ct se calcularon los valores de expresión relativa de los genes de interés en las distintas muestras respecto a la muestra control, normalizados en referencia al nivel de expresión del gen constitutivo *ubiquitina10* (*UBQ10*, *At4g05320*) (Czechowski *et al.*, 2005). La expresión constitutiva de este gen fue confirmada en nuestras muestras. El cálculo de la expresión relativa se realizó usando el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Applied Biosystems), donde la  $\Delta\Delta\text{Ct}$  fue calculada para cada muestra como la diferencia de Ct entre el gen de interés y el gen constitutivo, con respecto a una muestra control. El nivel relativo de expresión se determinó como la inversa del  $\log_2$  del  $\Delta\text{Ct}$  (Muestra) –  $\Delta\text{Ct}$  (Muestra referencia). El tipo de normalización se indica en la leyenda de las figuras y en el texto correspondiente a cada experimento.

Para la cuantificación del número de copias de cada gen, el cDNA correspondiente se clonó en el vector pGEM-T Easy vector (Promega), usando los oligos de la Tabla 6.5. La cuantificación de los valores absolutos de expresión de los genes *GIDI* y *DELLA* se realizó como se describe en Whelan *et al.* (2003). Se generaron curvas estándar usando una dilución seriada del plásmido de ADN purificado de cada gen, en un rango de  $10^{-7}$  a  $10^{-10}$ . El número de copias de cada plásmido en cada dilución fue calculado en base al peso molecular y a la concentración inicial de cada construcción (Whelan *et al.*, 2003). El  $\log_{10}$  del número de copias de cada transcrito se determinó a partir de la curva estándar y

el valor umbral del ciclo Ct de los datos de la qPCR. El número de copias de cada gen fue normalizado usando el número de copias de *UBQ10* en cada muestra.

## 6.6. Análisis Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para el estudio de degradación del endocarpo se recolectaron frutos autopolinizados de 7, 8, 9 y 10 dpa de los mutantes simples y dobles *gid1*, así como frutos de 6 y 9 dpa de los mutantes *3xdella* y *4xdella*. Para el estudio de los defectos en el óvulo y semillas del mutante *rbe-2* se utilizaron flores en antesis y semillas maduras, respectivamente. Las muestras se montaron en un sistema de soporte de criotransferencia CT-1000C (Oxford Instruments) interconectado con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410. A continuación las muestras se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente se fracturaron para observar la estructura interna. El agua superficial condensada se sublimó controlando el calentamiento a -85°C y las muestras se cubrieron con oro mediante pulverización para ser observadas con energía de electrón incidente de 10 keV.

## 6.7. Ensayos histoquímicos con β-glucuronidasa (GUS)

Para realizar el ensayo de la actividad β-glucuronidasa, los pistilos y los frutos se fijaron durante 30 minutos en acetona fría al 90% y se lavaron posteriormente con solución de ensayo sin el sustrato (50 mM fosfato sódico pH 7.0, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y 0.2% Triton X-100). Las muestras se transfirieron a la solución de ensayo con sustrato (2 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronidasa ciclohexilamonio (X-GLcA), Duchefa) y se infiltraron a vacío durante 10 minutos seguidos de una incubación durante 24 horas a 37°C. Las concentraciones de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> se ajustaron en función de los niveles de actividad GUS en cada línea transgénica con el fin de obtener la señal óptima (5 mM para GID1A-GUS y GID1B-GUS, 10 mM para GID1C-GUS, 0,2 mM para GA20OX-GUS, 2,5 mM para GA3OX-GUS, 5 mM para pGAI-GUS y pRGA-GUS, 2

mM para pRGL1-GUS y 3 mM para RGL2-GUS). Después de la tinción las muestras se deshidrataron en series crecientes de etanol al 20, 35, 50 y 70% (v/v) y se aclararon durante 7 días en hidrato de cloral (Across Organics) en glicerol:agua en proporciones 8:1:2 (g:ml:ml). Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments) acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y un ordenador con el software de análisis de imagen AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System) y NIS –Element F3.0.

### **6.8. Procedimientos histológicos en resina y parafina**

Los pistilos y frutos se recolectaron y se infiltraron en vacío durante 10 minutos en 4% (p/v) paraformaldehído (Sigma) en 100 mM fosfato sódico pH 7,2 con 0,05% (v/v) de Tween 20 (Sigma) y se fijaron toda la noche a 4°C. Las muestras se deshidrataron en series crecientes de etanol al 20, 35, 50, 70 y 100% (v/v) y posteriormente se embebieron en resina Technovit 7100 (Kulzer). Las muestras se colocaron en cápsulas de gelatina para su polimerización y se obtuvieron secciones de 2  $\mu$ m con un microtomo MicromHM330, seguido de su tinción con 0,02% (p/v) de azul de toluidina. Las muestras se observaron y fotografiaron en el microscopio Nikon Eclipse E600.

Para la observación de la actividad GUS en cortes de resina, las muestras tras la tinción con X-GlcA se deshidrataron en series crecientes de etanol de 20, 35 y 50% (v/v), y posteriormente se fijaron durante 30 minutos en solución FAE (50% (v/v) etanol, 5% (v/v) formaldehído, 10% (v/v) ácido acético), seguido de una deshidratación final con 100% (v/v) de EtOH las muestras se embebieron en resina Technovit 7100.

### **6.9. Hibridaciones *in situ* de ARN**

Los pistilos y frutos se recolectaron en viales de cristal que contenían el fijador FAE. A continuación se infiltraron en vacío durante 20 minutos, tras lo cual

se realizó un cambio del fijador por otro fresco, continuando la fijación o/n a 4°C. A continuación, las muestras se deshidrataron en series crecientes de etanol 50%, 70% y 95% (v/v), 30 minutos cada una, seguido de una tinción del tejido con EocinY en EtOH 95% (v/v) a temperatura ambiente durante 2 horas. Esta solución se dejó durante toda la noche a 4°C.

### **6.9.1. Imbibición y montaje de bloques**

Las muestras se incubaron durante 1-2 horas en EtOH 100% y en concentraciones crecientes de histoclear (National Diagnostic) en EtOH (25%, 50% 75%, y 100 % v/v). Posteriormente se añadió un volumen igual de lentes de parafina Paraplast- Plus (Sherwood Medical) y se incubó o/n a 58-60°C. Al día siguiente se sustituyó la mezcla por parafina al 100% y se realizaron cambios consecutivos con parafina nueva cada 3 horas hasta la completa eliminación del histoclear. Por último se montaron las muestras en una placa caliente a 55°C, con moldes metálicos y bases desechables para el microtomo. Tras enfriarse los bloques a 4°C, se realizaron secciones con el microtomo de 8 µm de espesor, y con la ayuda de una lupa binocular se determinó la zona de interés para depositar los cortes correspondientes en los portaobjetos. Para ello, las tiras se cortaron en trozos de más o menos 1,5 cm y se dejaron flotar en un baño a 45°C para eliminar las arrugas del tejido. Las tiras se recogieron con un portaobjeto y se dejaron secar horizontalmente en una placa a 45°C durante toda la noche.

### **6.9.2. Preparación de la sonda**

Mediante PCR se amplificó el cDNA de los genes *GID1* con los oligos indicados en la Tabla 6.6, los productos resultantes se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy (Promega). Se linearizaron de 5 a 10 µg de plásmido mediante digestión con *XbaI*. Los fragmentos digeridos se precipitaron con EtOH y se resuspendieron en agua. El plásmido lineal se utilizó como molde para la transcripción *in vitro* y generar así las ribosondas antisentido. A esta reacción le fue añadido el tampón de reacción de transcripción correspondiente al 1X, 40 unidades (1 µl) RNasin (Protector Inhibidor RNasa), DIG RNA-labeling mix (10X, Roche), 20 unidades (2 µl) de ARN polimerasa SP6 (Roche Diagnostics) y 2 µg de ADN molde. La reacción se incubó en un termobloque durante 90 minutos a

37°C. Tras la incubación se añadieron 10 unidades (1 µl) de DNasa libre de RNasa (Amersham) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Para comprobar la transcripción se cargó 1 µl en un gel de agarosa al 1,5%.

Posteriormente, se precipitaron las sondas con 1 µl de tRNA de levadura 10 µg/µl, 25 µl de 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc (acetato amónico), 220 µl de EtOH absoluto y 36,5 µl de agua miliQ estéril, a -80°C durante 1 hora. El sedimento se re-suspendió en 10 µl de agua miliQ estéril. La sonda se guardó a -80°C hasta su cuantificación.

### **6.9.3. Cuantificación de la sonda mediante 'dot blot'**

Se prepararon diluciones 1/20, 1/50, 1/1000 y 1/2500 a partir de 1 µl de la sonda. Se aplicó 1 µl de cada dilución a una membrana de nilón y unió covalentemente mediante luz UV. El revelado de la membrana se realizó con una tira control con distintas concentraciones de ARN marcado con digoxigenina (*RNA Scripts Test*, Roche Diagnostics). Las tiras se humedecieron en 1X TBS (100 mM Tris-HCl pH 7,5 y 400 mM NaCl) durante 10 minutos y en TBS con el anticuerpo Anti-DIG-Ab (1/3000) durante 15 minutos. La membrana se lavó en tampón de detección sin sustrato durante 1 minuto y finalmente se reveló con tampón de detección con sustrato (150 µl de NBT (100 mg/ml) y 150 µl de BCIP (50 mg/ml)) por cada 100 ml de tampón hasta que se visualizó en la tira control la aparición de la señal para la última dilución. La concentración de sonda a utilizar en cada caso fue la que más se aproximó al penúltimo punto de la tira. La concentración final en el tampón de hibridación que corresponde a cada punto es 1/2, 1/25, 1/100 y 1/250.

### **6.9.4. Pre-hibridación**

Se realizó una desparafinación de los cortes con dos lavados en histoclear 100% durante 10 minutos. Los cortes se hidrataron en series crecientes de EtOH de 2 minutos cada uno (100%, 95%, 70%, 50%, 35% v/v), y finalmente se realizaron dos lavados de 2 minutos con agua miliQ. A continuación se realizó la hidrólisis de las proteínas mediante un tratamiento de 20 minutos en 0,2 M HCl a temperatura ambiente. Seguidamente, se sometió el tejido a una incubación con proteinasa K (1 µg/ml) durante 15 minutos a 37°C. Los portaobjetos se lavaron en 1X PBS (Tabla 6.7) durante 2 minutos y la proteinasa K se bloqueó con 2

mg/ml de glicina en 1X PBS durante 2 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados de dos minutos en PBS y el tejido se fijó con 4% de formaldehído en PBS (30 ml del FA 37% en 270 ml de PBS) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se llevaron a cabo dos lavados de 5 minutos en PBS y nuevamente se deshidrató el tejido en series de EtOH de 2 minutos cada una (30%, 50%, 70%, 95% y 2X 100% v/v). Finalmente se escurrieron y secaron los portaobjetos mediante un vacío de 20 minutos o bien se dejaron secar en la campana durante al menos 1 hora.

**Tabla 6.6. Lista de oligos usados en las sondas de hibridación *in situ* de los receptores *GID1* y para el clonaje de los genes *GID1* y *DELLA* en el plásmido pGEM-T para la cuantificación absoluta por qPCR.**

Gen	Código	Oligo (5' to 3')	Secuencia oligo	Producto PCR	Referencia
<i>GID1A</i>	<i>At3g05120</i>	G1DA-ISF GID1A-ISR	CAGAAATGGCTGCGAGCGATG CGCCGAAATCTCATCCATAAC	841bp	En este trabajo En este trabajo
<i>GID1B</i>	<i>At3g63010</i>	GID1B-ISF GID1B-ISR	GAATAAGTTTGTGCACTCCATAG GGAAGTGAGAACTACAACCAC	488bp	En este trabajo En este trabajo
<i>GID1C</i>	<i>At5g27320</i>	GID1C-ISF GID1C-ISR	CCAATGAGAACACTCTTATC GAAATAAGATCACTTTTAGG	428bp	En este trabajo En este trabajo
<i>GAI</i>	<i>At1g14920</i>	GAI-ISF GAI-ISR	TAAGCAGTCCCTAACCGATCCC TAAATCCGCCGCGCGAGAG	743bp	En este trabajo En este trabajo
<i>RGA</i>	<i>At2g01570</i>	RGA-ISF RGA-ISR	CTTCATCATCCCCAACACAC TCGATTCAAGTTCGGTTTAGGTC	1947bp	En este trabajo En este trabajo
<i>RGL1</i>	<i>At1g66350</i>	RGL1-ISF RGL1-ISR	CAATTATTATGACACTCCCGTG CATTTTCATTGGCCTGACCCCTGA CG	1697bp	En este trabajo En este trabajo
<i>RGL2</i>	<i>At3g03450</i>	RGL2-ISF RGL2-ISR	CCTTACCAACCCATGAAGTAAAG CTCAAAGATACGCACAAGGTCC	1850bp	En este trabajo En este trabajo

### 6.9.5. Hibridación y lavados

La sonda se diluyó a la concentración adecuada (según la cuantificación descrita previamente) en tampón de hibridación y se desnaturalizó a 80°C durante 2 minutos. Se aplicaron 300 µl de la sonda sobre cada portaobjetos. Las muestras se incubaron toda la noche en una caja húmeda sellada a temperatura de hibridación (50-54°C). Al día siguiente se separaron los portaobjetos en solución de lavado (formamida al 50% en 2X SSC) y se hicieron dos lavados de 90 minutos con TBS a la temperatura de hibridación.

### **6.9.6. Inmunodetección**

Los portaobjetos se lavaron en TBS durante 5 minutos. A continuación se pasaron a jarras coplin y se incubaron en solución bloqueante (0,5% Roche blocking en TBS) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se lavaron en 1% BSA y 0,3% (v/v) Triton X-100 en TBS durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron entre 90-120 minutos en la solución anterior con el anticuerpo anti-DIG-ab (dilución 1:3000) (AP conjugated anti-DIG, Fab fragment, Roche), y se hicieron tres lavados de 20 minutos en 1% BSA y 0,3% (v/v) Triton X-100 en TBS y un lavado de 5 minutos en tampón de detección sin sustrato (el tampón de detección está formulado por el tampón de detección A y B (Tabla 6.7) en proporciones iguales 1:1). Pasado ese tiempo el tampón se substituyó por el tampón de detección con sustrato. Por cada 100 ml de solución de detección se añadieron 150  $\mu$ l de NBT (100 mg/ml) y otros 150  $\mu$ l de BCIP (50 mg/ml). Las muestras se incubaron en esta solución durante un periodo que oscilaba entre una noche y varios días (dependiendo la intensidad de señal de cada sonda) a 37°C.

### **6.9.7. Observación de los resultados**

La reacción se detuvo lavando las muestras con abundante agua. En aquellos casos en los que había mucho fondo o señal el tejido se deshidrató en series de EtOH crecientes de forma rápida (2 minutos cada una), para eliminar precipitados inespecíficos. Posteriormente se realizaron los montajes con cubreobjetos y se procedió a su observación en el microscopio Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments Europe) acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y un ordenador con el software de análisis de imagen AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System) y NIS –Element F3.0. Las muestras se observaron con iluminación de campo claro, utilizando la técnica Nomarski.

**Tabla 6.7. Listado de reactivos usados para la realización de la hibridación *in situ*.**

Solución	Compuesto	Concentración	Volumen o peso total
FAE	EtOH	50%	50ml
	Ácido Acético	5%	5ml
	Foraldehido	3,7%	10ml
	H2O dd		35ml
Tampón de Hibridación	SSC	6X	3ml
	SDS	3%	1,5ml
	Formamida	50%	5ml
	tRNA	100µg	0,1ml
	H2O dd		1,4ml
SSC 20x	NaCl		175,3g
	Na Citrato		88,2g
	H2O dd		800ml
PBS 20X (autoclavado)	NaCl		160g
	KCl		4g
	Na2HPO4		28,8g
			4,8g 700ml
TBS 10X (autoclavado)	Tris (pH 7.5)	1M	121,1g
	NaCl	4M	233,6g
	H2O dd		
Tampón proteínasa K 5X (autoclavado)	Tris	0,5M	60,55g
	EDTA	0,25M	93,06g
	H2O dd		700ml
	pH 8		
Tampón detección A 10X (autoclavado)	Tris (pH 9.5)	1M	121,1g
	NaCl	1M	58,4g
	H2O dd		
Tampón de detección B 10X (autoclavado)	MgCl2 MgCl2-6H2O H2O dd	0,5M	101,1g

## 6.10. Análisis transcriptómico mediante micromatrices

Los perfiles transcriptómicos se obtuvieron usando la plataforma de micromatrices de Agilent *Arabidopsis* v4 Gene Expression 4x44K, que contiene 43.803 sondas en forma de oligonucleótidos de 60-mer. Se utilizó un diseño de un único color (Agilent Single Color 21169), distribuyendo las muestras completamente al zar y teniendo como única restricción que 2 réplicas biológicas no coincidieran en el mismo cristal, designada acorde con una información mínima acerca de las guías de experimentos de micromatrices (Brazma *et al.*, 2001). Se realizaron 4 réplicas biológicas para cada uno de los

tratamientos (*4xdella*, GAs, Polinizado, mock) a diferentes tiempos (Figura 4.4), para un total de 72 muestras en 18 cristales.

El ARN total se extrajo usando el kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). La integridad del ARN total fue ensayada usando el Bioanalyzer 2100 (Agilent). Se tomó una cantidad de 0,5 µg de ARN por muestra que fue amplificada y marcada con el fluoróforo Cy5 con el Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit. El Agilent Spike-In Kit fue usado para ensayar el etiquetado y la eficiencia de hibridación. La hibridación y el lavado de cristales fueron realizados con el kit de hibridación de expresión génica y el buffer de lavado de expresión génica de Agilent.

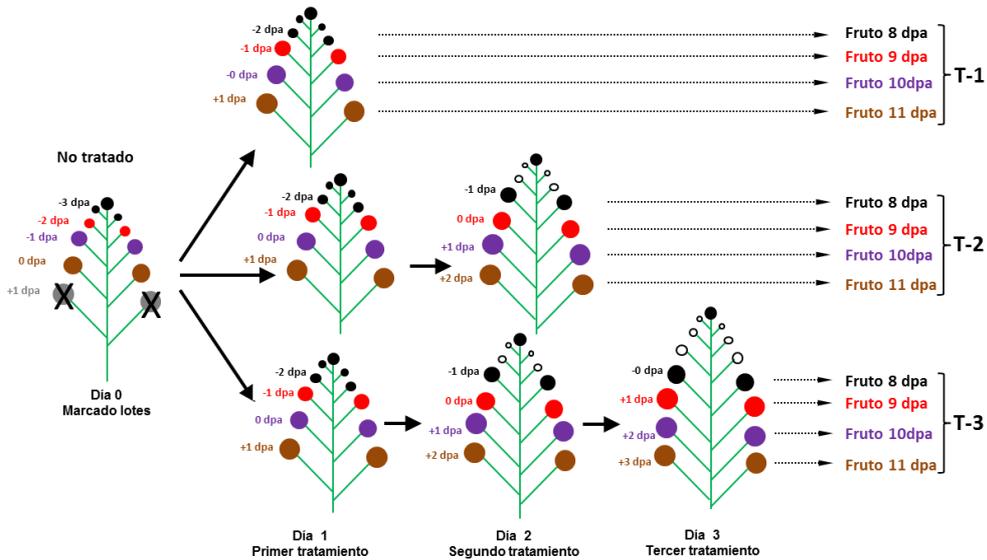
Después de lavar y secar los cristales, éstos fueron escaneados en el escáner de Agilent G2565AA, a una resolución de 5 µm, realizando un doble escaneado a alta y abaja intensidad de PMT, para ampliar el rango dinámico de detección. Los archivos de la imágenes fueron analizadas con el software Feature Extraction 9.5.1 (Agilent). Los análisis entre matrices fueron realizados con el software GeneSpring 11.5 siendo las micromatrices normalizadas por cuantiles. Para garantizar una alta calidad de los datos, solamente se consideraron aquellos que cumplieran con los parámetros de "glsWellAboveBG" con valor igual a 1 en al menos 3 de las 4 réplicas biológicas, en al menos una muestra. Tras este filtrado se consideraron para subsiguientes análisis 34.537 sondas que superaron dichos controles de calidad. Para identificar genes diferencialmente expresados en cada comparación, se realizó un análisis de t-test con un False Discovery Rate (FDR) ajustado de acuerdo al método de Benjamin y Hochberg. Solo se seleccionaron aquellos datos con valores P por debajo de 0,05, después de la corrección por test múltiple, y si el cambio de expresión era de al menos dos veces.

Finalmente las sondas diferenciales fueron convertidas en sus respectivos genes, basándonos en un análisis de BLAST extraído de la pagina web <ftp://ftp.arabidopsis.org/Microarrays/Agilent/>, siendo eliminadas aquellas sondas que no se correspondían con ningún gen y aquellas que hacían referencia a mas de un gen.

Los análisis de Ontología Génica de los procesos Biológicos fueron realizados con la herramienta web AgriGO (Du Z *et al.*, 2010).

### **6.11. Ensayos con Dex de los pistilos de la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR***

Se diseñó un experimento de respuesta de los pistilos de la línea *cer6-2 4xdella pGAI:gai-1-GR* a tratamientos con Dex para identificar el número mínimo de tratamientos para abolir el fenotipo partenocárpico del *4xdella* al expresar *gai-1* en el núcleo. Las plantas se marcan eliminando los frutos más jóvenes, dejando solo 2 flores en antesis junto al resto de la inflorescencia. Al día siguiente las plantas se dividen en 4 lotes, dejando un lote sin tratar como control (Figura 6.1). Los restantes 3 lotes se trataron sumergiendo por completo las inflorescencias en una solución de 10  $\mu$ M de Dex (Sigma) con 10 mM Triton X-100 como agente mojante. Un día después se trata del mismo modo dos de los lotes, y el tercer día se trata un solo lote. Los frutos se recolectan 10 días después del primer tratamiento, y se determina la longitud mediante escaneado y análisis de la imagen correspondiente, como se describe anteriormente. Sólo se determinan los frutos de 11, 10, 9 y 8 dpa que provienen de pistilos que estaban en los estadios -2, -1, 0 y +1 dpa en el primer día, respectivamente. Así, en el tratamiento 1 (T-1) los frutos provienen de pistilos que se trataron solo una vez a -2, -1, 0 y +1 dpa. En el tratamiento 2 (T-2) los frutos provienen de pistilos tratados a -2 y -1, -1 y 0, 0 y +1, y +1 y +2 dpa. Por último en el tratamiento 3 (T-3) los frutos provienen de pistilos tratados a -2, -1 y 0, -1, 0 y +1, 0, +1 y +2, y +1, +2 y +3 dpa.



**Figura 6.1. Diseño experimental del tratamiento con Dex en la línea *cer6-2 4xdella pGAI-gai-1-GR*.** El día 0 se marcó las plantas, eliminando frutos y dejando 2-3 flores en antesis, y se dividieron en 4 lotes. Uno de los lotes permanecía sin tratar como control (no mostrado). Los otros tres lotes se trataron al día siguiente (Día 1, primer tratamiento). Dos lotes se trataron de nuevo en el segundo día (Día 2 segundo tratamiento), y un solo lote se trató una tercera vez (Día 3 tercer tratamiento). Los frutos se recolectaron 10 días después del primer tratamiento, pero solo aquellos que provinieron de pistilos que tenían -2, -1, 0 y +1 dpa en el momento del primer tratamiento. Se analizaron más de 30 pistilos/frutos por tratamiento/día.

## 6.12. Ensayos de germinación y tratamientos con Dex y Chx en plántula

Las semillas esterilizadas se sembraron en placas de medio MS al 0,8% (p/v) y agar al 1% (p/v) complementado con las diferentes concentraciones de PCB y GAs (Duchefa). Las semillas fueron estratificadas durante 4 días a 4°C. La germinación tuvo lugar en cámaras de crecimiento con fotoperiodo de día largo (16/8h) y temperatura media de 22°C. La evaluación del porcentaje de germinación se realizaba cada 24 horas tras la estratificación.

Se realizaron tratamientos a corto plazo con Dex en plántula de la línea *pGAI:gai-1-GR* para la identificación de dianas primarias de DELLA. Las plántulas se incubaron en oscuridad sumergidas en agua suplementada con 10  $\mu$ M Dex y/o 10  $\mu$ M Chx según la condición (Sigma) durante 6 horas. Posteriormente se recolectaba el material en oscuridad depositándolo en tubos Eppendorf y congelándolo en N<sub>2</sub> líquido. El material era guardado a -80°C para la posterior extracción de ARN y síntesis de cDNA.

### 6.13. Ensayo de doble híbrido de levadura

Los tres cDNAs de las isoformas de *PIL2* fueron amplificados por PCR a partir de cDNA de pistilos, usando los oligos que se describe en la Tabla 6.8, distinguiendo cada isoforma según el tamaño de banda esperado. Los fragmentos se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se transformaron en células termocompetentes de *E. coli*, confirmándose cada isoforma mediante secuenciación. Posteriormente los insertos se subclonaron fusionados al dominio de activación Gal4 en el vector de levadura pGADT7 (Clontech) mediante clonaje clásico con los enzimas de restricción *XhoI-EcoRI*. Una vez confirmado el clonaje por restricción y secuenciación, se transformó la cepa de levadura Y187. Como cebo se utilizaron las versiones truncadas M5 de las proteínas DELLA fusionadas al dominio de unión a DNA Gal4 en la cepa Y2HGold, proporcionadas por la Dra. Salomé Prat (CNB, Madrid). Para seleccionar los transformantes primarios con pGBKT7 o pGADT7 se emplearon placas de medio mínimo sin triptófano o sin leucina, respectivamente. Los híbridos se generaron mediante cruce, mezclando las dos cepas correspondientes en 500  $\mu$ L de 2xYPDA y permitiendo el apareamiento o/n a 28°C en agitación. Los híbridos se seleccionan en placas de medio mínimo sin triptófano ni leucina (DDO) durante 2-3 días a 28°C hasta la aparición de colonias individuales.

A continuación se inoculó 1 colonia única de cada híbrido en 1 ml de DDO líquido y se incubó o/n a 28°C. Al día siguiente se dispusieron las combinaciones en una placa multipocillo y se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000) en 0,9% NaCl con la ayuda de una pipeta multicanal. Posteriormente se procedió al goteo de 3  $\mu$ l de las distintas diluciones en placas DDO y QDO (medio DDO sin adenina ni histidina). Comparando el crecimiento de la levadura en ambos tipos de placas al cabo de 3-5 días se pudo observar en qué combinaciones se producía la interacción y en qué intensidad según el crecimiento de las diferentes diluciones. Además se utilizaron los plásmidos vacíos como control en todos los ensayos. Para confirmar que todas las levaduras estaban sintetizando las dos proteínas correspondientes se realizaron ensayos 'western blot', mediante procedimientos estándar. La presencia de las

proteínas fusionadas a los BD y AD se detectó mediante los anticuerpos GAL4DBD y GAL-TA (Santa Cruz), respectivamente.

**Tabla 6.8. Oligos usados en el clonaje de las isoformas de *PIL2* en el plásmido pGEM-T para los ensayos de doble híbrido.**

Gen	Código	Oligo (5' - 3')	Secuencia oligo	Tamaño banda	Referencia
<i>PIL2<math>\alpha</math></i>	At3g62090	<i>PIL2Y2H-F</i> <i>PIL2Y2H-R</i>	ACAGAATTCATGGAGCTTGTGTTTGAGAATGGC CAGCTCGAGTCATCTGTTAGTTTTCCCTTGATTTCCTGT	1059 pb	En este trabajo En este trabajo
<i>PIL2<math>\beta</math></i>	At3g62090	<i>PIL2Y2H-F</i> <i>PIL2Y2H-R</i>	ACAGAATTCATGGAGCTTGTGTTTGAGAATGGC CAGCTCGAGTCATCTGTTAGTTTTCCCTTGATTTCCTGT	971 pb	En este trabajo En este trabajo
<i>PIL2<math>\gamma</math></i>	At3g62090	<i>PIL2Y2H-F</i> <i>PIL2Y2H-R</i>	ACAGAATTCATGGAGCTTGTGTTTGAGAATGGC CAGCTCGAGTCATCTGTTAGTTTTCCCTTGATTTCCTGT	993 pb	En este trabajo En este trabajo

# 7-Bibliografía



- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GT, Genschik P** (2009) Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **19**: 1188-1193
- Alabadí D, Blázquez MA, Carbonell J, Ferrándiz C, Pérez-Amador MA** (2009) Instructive roles for hormones in plant development. *Int J Dev Biol* **53**: 1597-1608
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* **223**: 315-328
- Aoyama T, Chua NH** (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**: 605-612
- Appelhagen I, Huep G, Lu GH, Strompen G, Weisshaar B, Sagasser M** (2010) Weird fingers: functional analysis of WIP domain proteins. *FEBS Lett* **584**: 3116-3122
- Ariizumi T, Lawrence PK, Steber CM** (2011) The role of two f-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in *Arabidopsis* gibberellin signaling. *Plant Physiol* **155**: 765-775
- Arnaud N, Girin T, Sorefan K, Fuentes S, Wood TA, Lawrenson T, Sablowski R, Ostergaard L** (2010) Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **24**: 2127-2132
- Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY** (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* **14**: 810-817
- Balanzá V, Navarrete M, Trigueros M, Ferrándiz C** (2006) Patterning the female side of *Arabidopsis* the importance of hormones. *J Exp Bot* **57**: 3457-3469
- Ben-Cheikh W, Perez-Botella J, Tadeo FR, Talón M Primo-Millo E** (1997) Pollination Increases Gibberellin Levels in Developing Ovaries of Seeded Varieties of Citrus. *Plant Physiol* **114**: 557-564
- Bernardo-García S, de Lucas M, Martínez C, Espinosa-Ruiz A, Davière JM, Prat S** (2014) BR-dependent phosphorylation modulates *PIF4* transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth *Genes Dev* **28**: 1681-1694
- Blanco F, Garretón V, Frey N, Dominguez C, Pérez-Acle T, Van der Straeten D, Jordana X, Holuigue L** (2005) Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **59**: 927-944
- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoecker C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FCP, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Shulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M** (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genetics* **29**: 365-371
- Cao D, Cheng H, Wu W, Soo HM, Peng J** (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 509-525
- Carbonell-Bejerano P, Urbez C, Carbonell J, Granell A, Perez-Amador MA** (2010) A fertilization-independent developmental program triggers partial fruit development and senescence processes in pistils of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**: 163-172

- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P** (1999) Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* **237**: 91-104
- Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LE, Atares A, Garcia-Martinez JL** (2012) Characterization of the procerato tomato mutant shows novel functions of the SlDELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiol* **160**: 1581-1596
- Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A, Elena SF** (2009) Reverse-engineering the *Arabidopsis thaliana* transcriptional network under changing environmental conditions. *Genome Biol* **10**: R96
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP, Peng J** (2004) Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Dev* **131**: 1055-1064
- Cheng H, Song S, Xiao L, Soo HM, Cheng Z, Xie D, Peng J** (2009) Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of *MYB21*, *MYB24*, and *MYB57* to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **5**: e1000440
- Claeys H, De Bodt S, Inze D** (2014) Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci* **19**: 231-239
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P** (2014) The role of gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol* **217**: 67-75
- Cox CM, Swain SM** (2006) Localised and non-localised promotion of fruit development by seeds in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biol* **33**: 1-8
- Daviere JM y Achard P** (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147-1151
- De Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484
- D'haeseleer K, Den Herder G, Laffont C, Plet J, Mortier V, Lelandais-Brière C, De Bodt S, De Keyser A, Crespi M, Holsters M, Frugier F, Goormachtig S** (2011) Transcriptional and post-transcriptional regulation of a *NAC1* transcription factor in *Medicago truncatula* roots. *New Phytol* **191**: 647-661
- Dorcey E, Urbez C, Blázquez MA, Carbonell J, Perez-Amador MA** (2009) Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J* **58**: 318-332
- Du Z, Zhou X, Ling Y, Zhang Z, Su Z** (2010) agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* **38**: 64-70
- Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R** (2011) The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701-715
- Ehlert A, Weltmeier F, Wang X, Mayer CS, Smeekens S, Carbajosa JV, Droge-Laser W** (2006) Two-hybrid protein-protein interaction analysis in *Arabidopsis* protoplast: establishment of a heterodimerization map of group Bzip transcription factors. *Plant J* **46**: 890-900

- Feng S, Martínez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM, Deng XW** (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* Jan **451**: 475-479
- Fernandez-Calvo P, Chini A, Fernandez-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R** (2011) The *Arabidopsis* bHLH transcription factors *MYC3* and *MYC4* are targets of JAZ repressors and act additively with *MYC2* in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701-715
- Ferrándiz C** (2002) Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **53**: 2031-2038
- Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL, Chau S, Fischer RL, Preuss D** (2000) Alterations in *CER6*, a gene identical to CUT1, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* **12**: 2001-2008
- Fleet CM, Sun TP** (2005) A DELLAcate balance: The role of gibberellins in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 77-85
- Fos M, Nuez F, Garcia-Martinez JL** (2000) The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* **122**: 471-480
- Fos M, Proano K, Nuez F, Garcia-Martinez JL** (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol Plant* **111**: 545-550
- Frigerio M, Alabadi D, Perez-Gomez J, Garcia-Carcel L, Phillips AL, Hedden P, Blázquez MA** (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 553-563
- Fuentes S, Ljung K, Sorefan K, Alvey E, Harberd NP, Ostergaard L** (2012) Fruit growth in *Arabidopsis* occurs via DELLA-dependent and DELLA-independent gibberellin responses. *Plant Cell* **24**: 3982-3996
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Marín JA, Prat S, Blázquez MA, Alabadi D** (2010) Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* **27**: 1247-1256
- Gallego-Bartolomé J, Alabadi D, Blázquez MA** (2011) DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **6**: e23918
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadi D, Blázquez MA** (2012) Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 13446-13451
- Gallego-Giraldo C, Hu J, Urbez C, Gomez MD, Sun TP, Perez-Amador MA** (2014) Role of the gibberellin receptors GID1 during fruit-set in *Arabidopsis*. *Plant J* **79**: 1020-1032
- García-Martínez JL, Carbonell J** (1980) Fruit set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. Influence of plant growth regulators. *Planta* **147**: 451-456
- García-Martínez JL, Martí M, Sabater T, Maldonado A, Vercher Y** (1991a) Development of fertilized ovules and their role in the growth of the pea pod. *Plant Physiol* **83**: 411-416

- García-Martínez JL, Santes C, Croker SJ, Hedden P** (1991b) Identification, quantification and distribution of gibberellins in fruits of *Pisum sativum* L. cv Alaska during pod development. *Planta* **184**: 53-60
- García-Martínez JL, Lopez-Diaz I, Sanchez- Beltran MJ, Phillips AL, Ward DA, Gaskin P, Hedden P** (1997) Isolation and transcript analysis of *gibberellin 20-oxidase* genes in pea and bean in relation to fruit development. *Plant Mol Biol* **33**: 1073-1084
- Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA** (2004) affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**: 307-315
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant Cell* **5**: 1439-1451
- Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama-Nakashita A, Nakabayashi K, Li W, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K, Kiba T, Takatsuto S, Fujioka S, Asami T, Nakano T, Kato H, Mizuno T, Sakakibara H, Yamaguchi S, Nambara E, Kamiya Y, Takahashi H, Hirai MY, Sakurai T, Shinozaki K, Saito K, Yoshida S, Shimada Y** (2008) The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J* **55**: 526-542
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM** (2006) *AUXIN RESPONSE FACTOR 8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1873-1886
- Granell A, Harris N, Pisabarro AG, Carbonell J** (1992) Temporal and spatial expression of a thiolprotease gene during pea ovary senescence, and its regulation by gibberellin. *Plant Journal* **2**: 907-915
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG** (2006) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399-3414
- Gustafson FG** (1936) Inducement of Fruit Development by Growth-Promoting Chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**: 628-636
- Harberd HP, Belfield E, Yamasura Y** (2009). The angiosperm gibberellin *GID1-DELLA* growth regulatory mechanism: How an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* **21**: 1328-1339
- Hartweck LM y Olszewski NE** (2006) Rice *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *Plant Cell* **18**: 278-282
- Hartweck LM** (2008) Gibberellin signaling. *Planta* **229**: 1-13
- Hauvermale AL, Ariizumi T, Steber CM** (2012) Gibberellin signaling: a theme and variations on *DELLA* repression. *Plant Physiol* **160**: 83-92
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**: 523-530
- Hedden P, Thomas SG** (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem Journal* **444**: 11-25

- Heo JO, Chang KS, Kim IA, Lee MH, Lee SA, Song SK, Lee MM, Lim J (2011)** Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator scarecrow-like 3 in the *Arabidopsis* root. Proc Natl Acad Sci USA **108**: 2166-2171
- Hong GJ, Xue XY, Mao YB, Wang LJ, Chen XY (2012)** Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. Plant Cell **24**: 2635-2648
- Hou X, Hu WW, Shen L, Lee LY, Tao Z, Han JH, Yu H (2008)** Global identification of DELLA target genes during *Arabidopsis* flower development. Plant Physiol **147**: 1126-1142
- Hou X, Lee LY, Xia K, Yan Y, Yu H (2010)** DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. Dev Cell **19**: 884-894
- Hu J, Mitchum MG, Barnaby N, Ayele BT, Ogawa M, Nam E, Lai WC, Hanada A, Alonso JM, Ecker JR, Swain SM, Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun TP (2008)** Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. Plant Cell **20**: 320-336
- Huang P, Ju HW, Min JH, Zhang X, Chung JS, Cheong HS, Kim CS (2012)** Molecular and physiological characterization of the *Arabidopsis thaliana* Oxidation-related Zinc Finger 2, a plasma membrane protein involved in ABA and salt stress response through the ABI2-mediated signaling pathway. Plant Cell Physiol **53**: 193-203
- Huang T, López-Giráldez F, Townsend JP, Irish VF (2012)** RBE controls *microRNA164* expression to effect floral organogenesis. Development **139**: 2161-2169
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M (2002)** The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. Plant Cell **14**: 57-70
- Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I (2006)** Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. Plant J **46**: 880-889
- Iuchi S, Suzuki H, Kim YC, Iuchi A, Kuromori T, Ueguchi-Tanaka M, Asami T, Yamaguchi I, Matsuoka M, Kobayashi M, Nakajima M (2007)** Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. Plant J **50**: 958-966
- Jakoby MJ, Falkenhan D, Mader MT, Brininstool G, Wischnitzki E, Platz N, Hudson A, Hülkamp M, Larkin J, Schnittger A (2008)** Transcriptional profiling of mature *Arabidopsis* trichomes reveals that NOECK encodes the MIXTA-like transcriptional regulator MYB106. Plant Physiol **148**: 1583-1602
- Jorgensen SA, Preston JC (2014)** Differential *SPL* gene expression patterns reveal candidate genes underlying flowering time and architectural differences in *Mimulus* and *Arabidopsis*. Mol Phylogenet Evol **73**: 129-139
- Jung CJ, Hur YY, Yu HJ, Noh JH, Park K.S, Lee HJ (2014)** Gibberellin applications at pre-bloom in grapevines down-regulates the expression of *VvAA9* and *VvARF7*, negative regulators of fruit set initiation, during parthenocarpic fruit development. PLoS ONE **9**: e95634
- Klucher KM, Chow H, Reiser L, Fischer RL (1996)** The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. Plant Cell **8**:137-153

- Krizek BA, Lewis MW, Fletcher JC** (2006) RABBIT EARS is a second-whorl repressor of AGAMOUS that maintains spatial boundaries in *Arabidopsis* flowers. *Plant J* **45**: 369-383
- Lal S, Pacis LB, Smith HM** (2011) Regulation of the *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE* genes/*microRNA156* module by the homeodomain proteins PENNYWISE and POUND-FOOLISH in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **4**: 1123-1132
- Lara P, Oñate-Sánchez L, Abraham Z, Ferrándiz C, Díaz I, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J** (2003) Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J Biol Chem* **278**: 21003-21011
- Lasserre E, Jobet E, Llauro C, Delseny M** (2008) *AtERF38* (*At2g35700*), an *AP2/ERF* family transcription factor gene from *Arabidopsis thaliana*, is expressed in specific cell types of roots, stems and seeds that undergo suberization. *Plant Physiol Biochem* **46**: 1051-1061
- Le Hénanff G, Profizi C, Courteaux B, Rabenoelina F, Gérard C, Clément C, Baillieul F, Cordelier S, Dhondt-Cordelier S** (2013) Grapevine *NAC1* transcription factor as a convergent node in developmental processes, abiotic stresses, and necrotrophic/biotrophic pathogen tolerance. *J Exp Bot* **64**: 4877-4893
- Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Strnad M, Lopez-Molina L** (2010) A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 19108-19113
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J** (2002) Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* **16**: 646-658
- Lee SJ, Jung HJ, Kang H, Kim SY** (2012) *Arabidopsis* zinc finger proteins AtC3H49/AtTZF3 and AtC3H20/AtTZF2 are involved in ABA and JA responses. *Plant Cell Physiol* **53**: 673-686
- Leivar P, Quail PH** (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* **16**: 19-28
- Li J, Guo G, Guo W, Guo G, Tong D, Ni Z, Sun Q, Yao Y** (2012) miRNA164-directed cleavage of ZmNAC1 confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biol* **12**: 220-234
- Li J, Wu Z, Cui L, Zhang T, Guo Q, Xu J, Jia L, Lou Q, Huang S, Li Z, Chen J** (2014) Transcriptome comparison of global distinctive features between pollination and parthenocarpic fruit set reveals transcriptional phytohormone cross-talk in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant and Cell Physiology* **0**: 1-18
- Li QF, Wang C, Jiang L, Li S, Sun S.S, He JX** (2012) An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis*. *Sci Signal* **5**: ra72
- Lloyd AM, Schena M, Walbot V, Davis RW** (1994) Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**: 436-439
- Locascio A, Blazquez MA, Alabadi D** (2013) Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant Cell Physiol* **54**: 1229-1237
- Martí C, Orzáez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A** (2007) Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant J* **52**: 865-876

- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun TP, Steber CM** (2003) The *Arabidopsis SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120-1130
- Middleton AM, Úbeda-Tomás S, Griffiths J, Holman T, Hedden P, Thomas SG, Phillips AL, Holdsworth MJ, Bennett MJ, King JR, Owen MR** (2012) Mathematical modeling elucidates the role of transcriptional feedback in gibberellin signaling. *PNAS* **109**: 7571-7576
- Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP** (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant J* **45**: 804-818
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-463
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H** (2006) Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* **140**: 411-432
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467-475
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-1604
- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G** (2006) Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**: 124-139
- Oh E, Zhu JY, Wang ZY** (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol* **14**: 802-809
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant Cell* **14**: 61-80
- Oshima Y, Shikata M, Koyama T, Ohtsubo N, Mitsuda N, Ohme-Takagi M** (2013) MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri*. *Plant Cell* **25**: 1609-1624
- Ostergaard L** (2009) Don't 'leaf' now. The making of a fruit. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 36-41
- Ozga JA, Reinecke D** (1999) Interaction of 4-chloroindole-3-acetic acid and gibberellins in early pea fruit development. *Plant Growth Reg* **27**: 33-38
- Ozga JA, van Huizen R, Reinecke DM** (2002) Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiol* **128**: 1379-1389
- Ozga JA, Yu J, Reinecke DM** (2003) Pollination, development, and auxin-specific regulation of *gibberellin 3beta-hydroxylase* gene expression in pea fruit and seeds. *Plant Physiol* **131**: 1137-1146
- Palmer CM, Hindt MN, Schmidt H, Clemens S, Guerinot ML** (2013) MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genet* **9**: e1003953
- Penfield S, Josse EM, Halliday KJ** (2010) A role for an alternative splice variant of *PIF6* in the control of *Arabidopsis* primary seed dormancy. *Plant Molecular Biology* **73**: 89-95

- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205
- Plackett AR, Powers SJ, Fernandez-Garcia N, Urbanova T, Takebayashi Y, Seo M, Jikumaru Y, Benlloch R, Nilsson O, Ruiz-Rivero O, Phillips AL, Wilson ZA, Thomas SG, Hedden P** (2012) Analysis of the developmental roles of the *Arabidopsis* gibberellin 20-oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant paralogs. *Plant Cell* **24**: 941-960
- Plackett AR, Ferguson AC, Powers SJ, Wanchoo-Kohli A, Phillips AL, Wilso ZA, Hedden P, Thomas SG** (2014) DELLA activity is required for successful pollen development in the Columbia ecotype of *Arabidopsis*. *New Phytologist* **201**: 825-836
- Preuss D, Lemieux B, Yen G, Davis RW** (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev* **7**: 974-985
- Ravasz E, Somera L, Mongru DA, Oltvai ZN, Barabási AL** (2002) Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science* **297**: 1551-1555
- Richards DE, King KE, Ait-Ali T, Harberd NP** (2001) HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 67-88
- Rieu I, Ruiz-Rivero O, Fernandez-Garcia N, Griffiths J, Powers SJ, Gong F, Linhartova T, Eriksson S, Nilsson O, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P** (2008) The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *Plant Journal* **53**: 488-504
- Robinson R, Cantliffe D, Shannon S.** (1971) Morphactin- induced parthenocarpy in cucumber. *Science* **171**: 1251-1252
- Roeder A HK, Yanofsky MF** (2006) Fruit development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists: 1-50
- Rost TL, Barbour MG, Stocking CR, Murphy TM** (2005) *Plant Biology Book*. 624
- Sagasser M, Lu GH, Hahlbrock K, Weisshaar B** (2002) *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes Dev* **16**: 138-149
- Sairanen I, Novák O, Pěňčík A, Ikeda Y, Jones B, Sandberg G, Ljung K** (2012) Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4907-4916
- Seymour GB, Ostergaard L, Chapman NH, Knapp, S, Martin C** (2013) Fruit development and ripening. *The Annual Review of Plant Biology* **64**: 219-241
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M** (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520-523
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T** (1998) The *Arabidopsis* *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155-169

- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP** (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1555-1566
- Smith VA, Koltunow AM** (1999) Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpic in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **121**: 437-451
- Song CP, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P, Zhu JK** (2005) Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **17**: 2384-2396
- Sponsel VM** (1983) The localization, metabolism and biological activity of gibberellins in maturing and germinating seeds of *Pisum sativum* cv. *Planta* **159**: 454-468
- Stamm P, Ravindran P, Mohanty B, Tan EL, Yu H, Kumar PP** (2012) Insights into the molecular mechanism of RGL2-mediated inhibition of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **12**: 179-195
- Sun TP, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 197-223
- Sun TP** (2010) Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* **154**: 567-570
- Sun TP** (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol* **21**: 338-345
- Sun X, Jones WT, Harvey D, Edwards PJ, Pascal SM, Kirk C, Considine T, Sheerin DJ, Rakonjac J, Oldfield CJ, Xue B, Dunker AK, Uversky VN** (2010) N-terminal domains of DELLA proteins are intrinsically unstructured in the absence of interaction with GID1/gibberellic acid receptors. *J Biol Chem* **285**: 11557-11571
- Suzuki H, Park SH, Okubo K, Kitamura J, Ueguchi-Tanaka M, Iuchi S, Katoh E, Kobayashi M, Takeda S, Noguchi M, Hamamura Y, Higashiyama T** (2014) Spatial distribution of the RABBIT EARS protein and effects of its ectopic expression in *Arabidopsis thaliana* flowers. *Planta, Mar*; **239**: 707-715
- Talón M, Koornneef M, Zeevaart JA** (1990) Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7983-7987
- Talón M, Zacarias L, Primo-Millo E** (1992) Gibberellins and Parthenocarpic Ability in Developing Ovaries of Seedless Mandarins. *Plant Physiol* **99**: 1575-1581
- Thomas SG y Sun TP** (2004) Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol* **135**: 668-676
- Torti S, Fornara F, Vincent C, Andrés F, Nordström K, Göbel U, Knoll D, Schoof H, Coupland G** (2012) Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *Plant Cell* **24**: 444-462
- Tseng GC, Ghosh D, Feingold E** (2012) Comprehensive literature review and statistical considerations for microarray meta-analysis. *Nucleic Acids Research* **40**: 3785-3799

- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun TP** (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 1008-1019
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M** (2007) Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 183-198
- Vandepoele K, Quimbaya M, Casneuf T, De Veylder L, Van de Peer Y** (2009) Unraveling transcriptional control in *Arabidopsis* using cis-regulatory elements and coexpression networks. *Plant Physiology* **150**: 535-546
- Vera-Sirera F, Gomez MA, Perez-Amador MA** (2014). Book: Plant Transcription Factors. Chapter 20. DELLA Proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling. ISBN: 978-0-12-800854-6
- Voegelé A, Linkies A, Müller K, Leubner-Metzger GJ** (2011) Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Exp Bot* **62**: 5131-5147
- Yamaguchi I, Matsuoka M, Asami T, Nakajima M** (2009) Differential expression and affinities of *Arabidopsis* gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant J* **60**: 48-55
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 225-251
- Yamamoto Y, Hirai T, Yamamoto E, Kawamura M, Sato T, Kitano H, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M** (2010) A rice *gid1* suppressor mutant reveals that gibberellin is not always required for interaction between its receptor, *GID1*, and DELLA proteins. *Plant Cell* **22**: 3589-3602
- Yang DL, Yao J, Mei CS, Tong XH, Zeng LJ, Li Q, Xiao LT, Sun TP, Li J, Deng XW, Lee CM, Thomashow MF, Yang Y, He Z, He SY** (2012) Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 1192-1200
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q, Yunping S, Li Z, Xiaohui D, Jingchu L, Xing-Wang D, Zhangliang C, Hongya G, Li-Jia Q** (2006) The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* **60**: 107-124
- Yu H, Ito T, Zhao Y, Peng J, Kumar P, Meyerowitz EM** (2004) Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7827-7832
- Yu S, Galvao VC, Zhang YC, Horrer D, Zhang TQ, Hao YH, Feng YQ, Wang S, Schmid M, Wang JW** (2012) Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *Plant Cell* **24**: 3320-3332
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C** (2005) The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* **17**: 2676-2692
- Wild M, Achard P** (2013) The DELLA protein RGL3 positively contributes to jasmonate/ethylene defense responses. *Plant Signal Behav* **8**: e23891

- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C** (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209-1220
- Wu G, Poethig RS** (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* **133**: 3539-3547
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP** (2007) Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3037-3057
- Zhang Y, Mayba O, Pfeiffer A, Shi H, Tepperman JM, Speed TP, Quail PH** (2013) A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* **9**: e1003244
- Zhang ZL, Ogawa M, Fleet CM, Zentella R, Hu J, Heo JO, Lim J, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sun TP** (2011) Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2160-2165



# **8-Anexos y Tablas Suplementarias**



Los anexos y tablas suplementarias incluidos en el disco compacto que acompaña esta Tesis son los siguientes archivos:

1. **Anexo 1:** Listado de genes diferencialmente expresados en las micromatrices.
2. **Anexo 2:** Listado de categorías biológicas sobre-representadas en el análisis de Gene Ontology.
3. **Anexo 3:** Graficos jerarquicos extraídos del análisis GO.
4. **Anexo 4:** Imagen extraída de la plataforma Cytoescape que representa la sub-red de coexpresión sobre la que se aplicaron los parámetros de topología de la red.
5. **Anexo 5:** Figuras que muestran los perfiles de expresión de los 16 FTs candidatos en la 5ta réplica biológica comparados con los perfiles de expresión de las micromatrices.
6. **Anexo 6:** Búsqueda de dianas de GAI en plántula. Perfiles de expresión de los 16 FTs en tratamientos con Dex+Chx en plántula.
7. **Anexo 7:** Búsqueda de dianas de GAI en pistilo. Perfiles de expresión de los 16 FTs en tratamientos con Dex+Chx en pistilo.
8. **Anexo 8:** Verificación de la acumulación de las proteínas DELLA e isoformas PIL2 por Western blot.
9. **Tabla Suplementaria 1:** Lista de las categorías GO significativamente enriquecidas.
10. **Tabla Suplementaria 2:** Listado de los 131 FTs representativos en la red de co-expresión con posibles efectos regulatorios en fructificación.

