



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

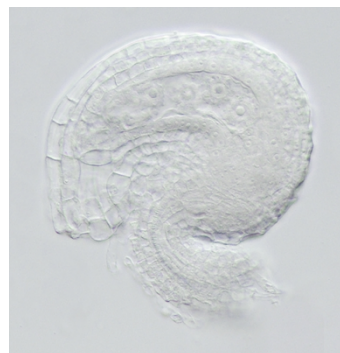
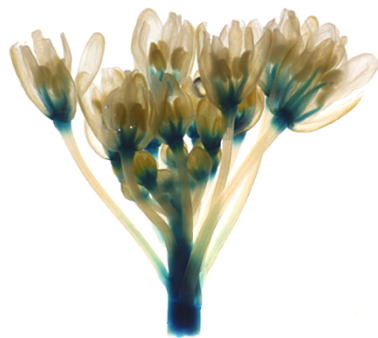


**Interacción entre SPATULA y giberelinas en la  
determinación del número de óvulos en  
*Arabidopsis thaliana***

Trabajo Final de Máster

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Valencia, enero 2020



**Autor:** María Agustina Alejandre

**Tutor:** María Dolores Gómez Jiménez

**Director experimental:** Miguel Ángel Pérez Amador

**Tutor UPV:** José Miguel Mulet Salort

## Resumen

La determinación del número de óvulos en las plantas es un proceso de desarrollo complejo en el que participan varias redes génicas y las fitohormonas auxinas, brasinoesteroides y citoquininas (CKs). Por un lado, resultados obtenidos en el laboratorio indican que las giberelinas (GAs), junto con sus reguladores negativos de señalización, las proteínas DELLA, están también implicadas en la iniciación de los óvulos determinando tanto el número como su forma. Por otro lado, en *Arabidopsis thaliana* el factor de transcripción SPTAULA (SPT) se encuentra implicado en el desarrollo del gineceo ya que su mutante nulo *spt-2* presenta una reducción en la cantidad de óvulos. Además, se ha descrito como SPT posibilita la señalización de las CKs en el dominio medio del gineceo. El objetivo de este Trabajo de Fin de Máster es estudiar la interacción entre SPT y las rutas metabólicas de GAs en la determinación del número de óvulos. Para ello, se estudiaron los niveles de GAs en los pistilos de *spt* y se describió el efecto de las alteraciones en la ruta de señalización de las GAs en los mutantes *spt*. Asimismo, se caracterizó el número y morfología de los óvulos y semillas de *spt*. Finalmente, se estudió la interacción entre SPT, CKs y GAs en la determinación del número de óvulos. En base a los estudios realizados en el presente trabajo, y la falta de futuros ensayos, se propone un mecanismo molecular por el cual SPT, a través de la represión de la biosíntesis de GAs en los pistilos, regula la cantidad de GAs y la estabilidad de las proteínas DELLA, participando de esta forma en el mecanismo molecular por el cual se determina el número de óvulos.

**Palabras claves:** *Arabidopsis*; giberelinas; citoquininas, óvulos; SPT; DELLA.

## Tabla de contenidos

<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
1.1. Desarrollo de los óvulos en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
a. Estructura del gineceo.....	4
b. Control molecular del número de óvulos.....	5
c. Control hormonal del número de óvulos.....	7
1.2. Giberelinas.....	9
a. Estructura y biosíntesis.....	9
b. Las proteínas DELLA y la señalización de GAs.....	9
1.3. Factor de transcripción SPATULA.....	11
<b>2. Antecedentes y objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
3.1 Material vegetal.....	15
a. Líneas genéticas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
b. Manipulación de <i>Arabidopsis</i> : condiciones de crecimiento y medios de cultivo.....	17
c. Tratamientos químicos exógenos.....	18
d. Recuento de óvulos.....	18
e. Medición del tamaño del ovario, óvulos y semillas.....	18
f. Cuantificación de GAs.....	19
3.2 Ensayos de expresión génica.....	19
a. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	19
b. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	19
3.3 Ensayo Western Blot.....	21
a. Extracción y cuantificación de proteínas.....	21
b. SDS-PAGE y Western Blot.....	21
3.4 Técnicas de microscopía.....	22
a. Ensayo histoquímico de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	22
b. Técnica de tinción Pseudo-Schiff (mPS)-Propidium Iodine (PI).....	22
c. Localización de las proteínas RGA y GAI.....	23
d. Visualización de los sensores de giberelinas PHD3 y PHD6.....	24
e. Observación de óvulos mediante la técnica de Nomarski.....	25

<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>26</b>
4.1. SPT inhibe la síntesis de GAs en el pistilo .....	26
4.1.1. SPT regula positivamente el número de óvulos .....	26
4.1.2. Efecto de la inhibición de la señalización de GAs en el número de óvulos de <i>spt</i> .....	27
4.1.3. Efecto de tratamientos exógenos con GAs en mutantes <i>spt</i> .....	28
4.1.4. Cuantificación de los niveles de GAs en <i>spt</i> .....	30
4.1.5. Regulación por SPT de la expresión de los enzimas de biosíntesis de GAs .....	31
4.1.6. Efecto de <i>spt</i> en los niveles de GAs en placenta.....	32
4.1.7. Estabilidad de las proteínas DELLA en <i>spt</i> .....	33
4.1.8. Señalización de GAs en los mutantes <i>spt</i> .....	35
4.1.9. Regulación transcripcional de <i>SPT</i> y <i>DELLA</i> .....	36
4.2. Caracterización morfológica de los óvulos y semillas en los mutantes <i>spt</i> .....	38
4.2.1. Estudio morfológico de los óvulos de los mutantes <i>spt</i> .....	38
4.2.2. Estudio morfológico de las semillas de los mutantes <i>spt</i> .....	39
4.3. Interacción entre SPT, CKs y GAs en el control del número de óvulos.....	42
4.3.1. Niveles de CKs en mutantes <i>spt</i> .....	42
4.3.2. Efecto de tratamientos con CKs en mutantes <i>spt</i> .....	43
4.3.3. Efecto de las CKs en los mutantes <i>gai-1</i> y <i>4xdella</i> .....	44
4.4. Discusión general e hipótesis de trabajo.....	47
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>49</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>50</b>

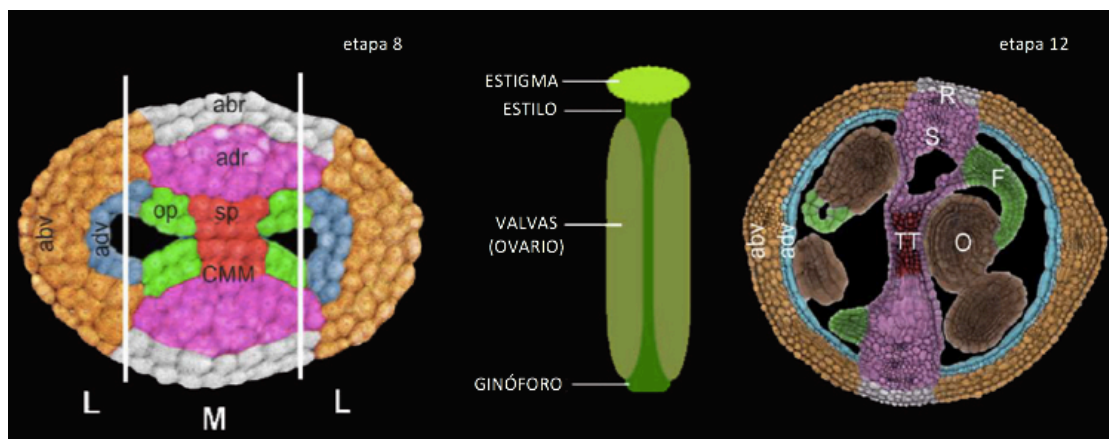
## 1. Introducción

### 1.1. Desarrollo de los óvulos en *Arabidopsis thaliana*

#### a. Estructura del gineceo

En las plantas Espermatofitas las semillas derivan de los óvulos fertilizados. Dentro de ellas, el subgrupo de las Angiospermas, comúnmente conocidas como las plantas con flores, ha evolucionado y ha adquirido la posibilidad de desarrollar frutos, órganos fundamentales en la protección y dispersión de las semillas. Generalmente el fruto se genera a partir de la fecundación y madurez del órgano reproductor femenino llamado gineceo o pistilo, aunque en algunos casos otros órganos florales pueden formar parte del mismo (Knapp, 2002; Cucinotta *et al.*, 2014).

En *Arabidopsis* el gineceo está compuesto por dos carpelos fusionados que convergen en una estructura tubular, unida verticalmente a través de los márgenes. En esta estructura es posible identificar dos dominios: el medio y el lateral (Fig. 1). En el dominio medio se encuentra un tejido con propiedades meristemáticas conocido como meristemo marginal del carpelo (CMM). El CMM da origen tejidos fundamentales para el éxito reproductivo de la planta: el *septum*, la placenta, los óvulos y el tracto de transmisión (Reyes-Olalde *et al.*, 2013; Reyes-Olalde *et al.*, 2017).



**Figura 1. Esquema del gineceo de *Arabidopsis*.** Se representan dos secciones transversales del gineceo en la etapa 8 y 12 del desarrollo. En la etapa 8 (izquierda) se muestra el dominio medial (M), el lateral (L) y el meristemo marginal del carpelo (CMM). En la etapa 12 (derecha) se pueden observar las estructuras que derivan del CMM: S, *septum*; R, *replum*; TT, tracto de transmisión; O, óvulo; F, funículo. Otras abreviaturas: abv, valva abaxial; adv, valva adaxial; abr, *replum* abaxial; adr, *replum* adaxial; op, primordio de óvulo; sp, primordio de *septum*. Adaptación de Reyes-Olalde, *et al.* (2017).

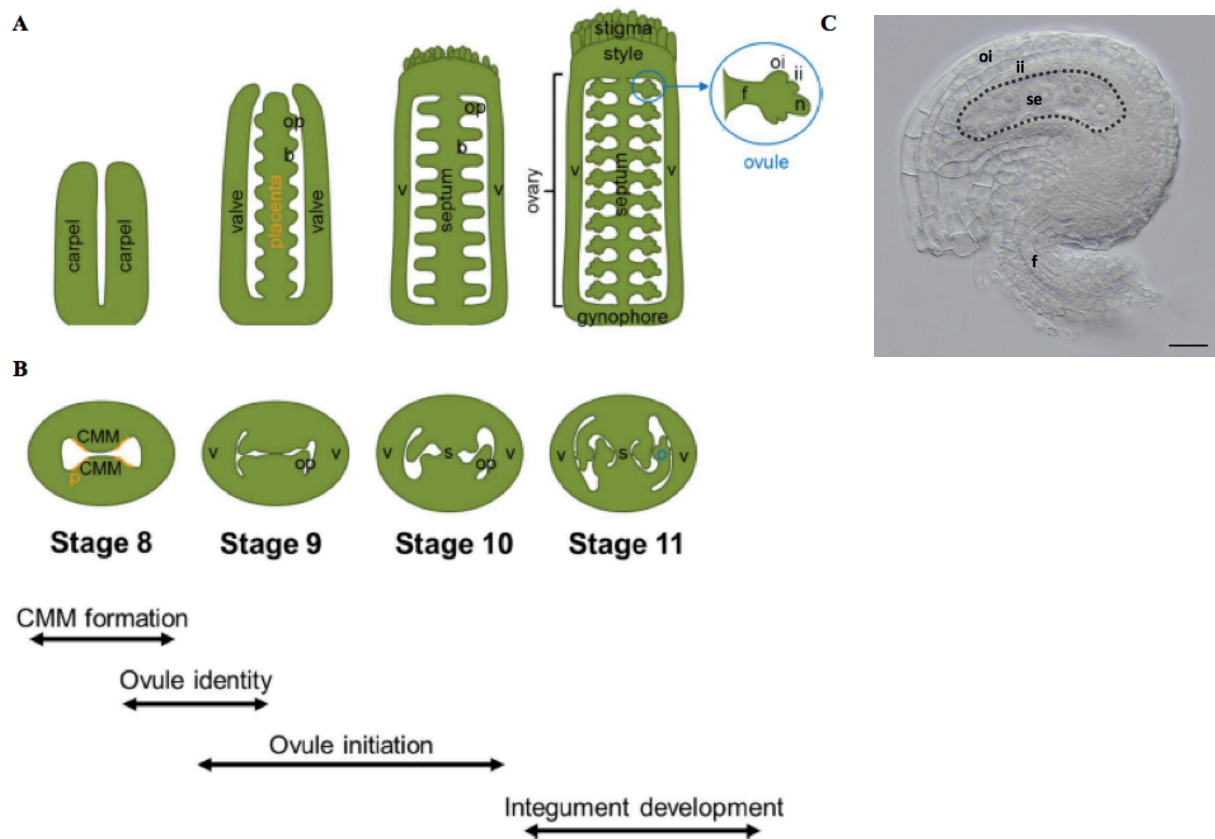
El desarrollo de los óvulos comienza con la formación de la placenta a partir del CMM. A continuación, se definen las regiones que darán lugar a los primordios de los óvulos para que luego, a través de divisiones periclinales y anticlinales de las células subepidérmicas de la placenta, emerjan los primordios. Posteriormente, comienza una diferenciación y organización de las células del primordio en tres regiones diferentes a lo largo del eje proximal-distal: funículo, chalaza y nucela. El funículo conecta el óvulo con la placenta. La nucela contiene la célula madre de la megaspora y es donde tiene lugar la megagametogénesis (Battaglia *et al.*, 2009; Cucinotta *et al.*, 2014). A partir de la chalaza emergen los integumentos internos y externos, que cubrirán completamente a la nucela dejando solo una apertura denominada micrópilo, a través de la cual entrará el tubo polínico con el gametofito masculino durante la fecundación. Tras la fecundación, los óvulos se transforman en semillas, el ovario en el fruto y los integumentos darán lugar a la cubierta de la semilla o testa (Cucinotta *et al.*, 2014).

Todo el proceso de desarrollo de los óvulos se encuentra controlado por intrincadas redes génicas y hormonales que se describen a continuación.

#### **b. Control molecular del número de óvulos**

En primer lugar, para que se produzca un correcto desarrollo de los óvulos, es necesaria la **formación del CMM**. Los genes involucrados en su regulación son principalmente factores de transcripción, aunque también participan co-reguladores transcripcionales y otros componentes de las vías hormonales de auxinas, citoquininas (CKs) y brasinoesteroides. Estos genes fueron estudiados, principalmente, mediante el análisis de mutantes de pérdida de función. A pesar de no haberse encontrado ninguna mutación que resulte en un gineceo carente de todos los tejidos marginales, algunas combinaciones de mutaciones reducen fuertemente su desarrollo (Reyes-Olalde *et al.*, 2013). De esta forma fue posible identificar a AINTEGUMENTA (ANT) como uno de los principales factores de transcripción que controla el inicio, el crecimiento y la regionalización de los meristemas. A su vez, ANT junto con los factores de transcripción SEUSS (SEU), LUENING (LUG) y FILAMENTOUS FLOWER (FIL) forman un complejo proteico esencial para el desarrollo del CMM (Azhakanandam, 2008; Reyes-Olalde *et al.*, 2013). Otros genes que se expresan en el CMM son los *COTYLEDON CUP-SHAPED1 y 2* (*CUC1* y *CUC2*), *CRABS CLAW* (*CRC*) y *SPTAULA* (*SPT*) que, entre otras funciones, intervienen en la correcta fusión del *septum* (Battaglia *et al.*, 2009; Reyes-Olalde *et al.*, 2013; Nahar *et al.*, 2012). En general, los genes que controlan la formación

del CMM forman una robusta red reguladora y esto se debe, posiblemente, a las importantes funciones biológicas de los tejidos que derivan del mismo.



**Figura 2. Desarrollo del gineceo y morfología de óvulos de *Arabidopsis*.** A y B. Esquema de cortes longitudinales (A) y transversales (B) del desarrollo del gineceo en estadios de desarrollo floral del 8 al 11. Tomado de Cucinotta *et al.* (2014). C. Imagen de microscopía de contraste interferencial del óvulo. Abreviaturas: v, valva; b, región fronterera; op, primordio de óvulo; s, septum; f, funículo; ii, integumento interno; n, nucela; o, óvulo; oi, integumento externo; p, placenta; se, saco embrionario. Barra= 20  $\mu$ m.

Posteriormente, para el correcto desarrollo de los óvulos son necesarios genes que confieran **identidad de óvulo** y definan qué células de la placenta deben diferenciarse en primordios de dichos órganos. Los responsables principales de esta especificación son los factores de transcripción SHATTERPROOF1 y 2 (SPH1 y SHP2) y SEEDSTICK (STK), que actúan de forma redundante ya que solo el triple mutante *stk shp1 shp2* presenta un fenotipo alterado, donde los óvulos son reemplazados por estructuras carpelares (Cucinotta *et al.*, 2014). *AGAMOUS* (*AG*) es otro gen de la misma familia que colabora en el mismo proceso. Todos ellos poseen patrones de expresión superpuestos en placenta y en los primordios de óvulos (Pinyopich *et al.*, 2003). Se ha determinado también que

otros factores de transcripción como SEPALLATA1, 2 y 3 (SEP1, SEP2 y SEP3) contribuyen al establecimiento de la identidad del óvulo (Cucinotta *et al.*, 2014).

Una vez establecida la identidad de óvulo, es necesario determinar los **márgenes y las zonas de crecimiento** de los primordios emergentes. Morfológicamente, las regiones frontera que separan los primordios adyacentes se caracterizan por presentar divisiones y expansiones celulares reducidas, mientras que las células del centro del primordio tienen una alta actividad meristemática que da lugar a los nuevos óvulos (Aida & Tasaka, 2006). Los ya mencionados genes *CUC1* y *CUC2* junto con *CUC3* están implicados en la definición de las regiones frontera entre los primordios de óvulo. Se expresan en los tejidos de la placenta, entre los óvulos en desarrollo, posiblemente promoviendo la separación de los mismos de una forma parcialmente redundante (Gonçalves *et al.*, 2015). Otro elemento principal de este proceso es AINTEGUMENTA (ANT) encargado de controlar también la iniciación de los primordios de óvulos, una vez establecida su identidad. Los análisis genéticos permitieron deducir cómo ANT y CUC funcionan de forma sinérgica en el establecimiento del número de óvulos: mientras que los CUCs determinan las zonas fronteras, ANT promueve el crecimiento de los primordios (Galbiati *et al.*, 2013; Cucinotta *et al.*, 2014).

Finalmente, una vez determinada su identidad e iniciado su crecimiento, existen otros genes implicados en el **desarrollo del óvulo** como *HUELLENLOS (HLL)* y *APETALA2 (AP2)*. *HLL* se encarga junto con *ANT* del crecimiento del primordio y de promover divisiones celulares durante el desarrollo de los integumentos y la gametogénesis (Skinner *et al.*, 2001). En cambio *AP2* afecta negativamente a la formación del óvulo y otros órganos florales, y se encuentra ligeramente reprimido por los brasinoesteroides (Battaglia *et al.*, 2009; Cucinotta *et al.*, 2014)

### c. Control hormonal del número de óvulos

Además de ser una de las hormonas fundamentales en el desarrollo de las plantas, las **auxinas** se encuentran involucradas también en la formación del primordio del óvulo. Se ha demostrado cómo la existencia de un gradiente de auxinas es necesario para la correcta formación del primordio y, por consiguiente, para la obtención de un número normal de óvulos. La direccionalidad del flujo de auxinas se genera a través de la reorganización de las proteínas transportadoras PINFORMED (PIN), estableciendo de esta forma el transporte polar de auxinas (TPA) (Benková *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, la proteína PIN1 se localiza tanto en las células de la placenta como en los primordios de



los óvulos, mientras que PIN3 se encuentra exclusivamente en los primordios (Ceccato *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que el gen *AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (ARF5)/MONOPTEROS (MP)* activa a los genes *ANT*, *CUC1* y *CUC2* (Galbiati *et al.*, 2013).

Por otro lado, *CUC1* y *CUC2* son capaces de controlar la expresión de *PINI* mediante el incremento de los niveles de otra hormona, la **citoquinina** (CK), en los estadios tempranos del desarrollo de los óvulos (Bencivenga *et al.*, 2012). Mutantes de la respuesta a CKs muestran una significativa reducción en el número de óvulos, mientras que mutantes con la capacidad de degradación de CKs comprometida o bien plantas que fueron tratadas con CK sintéticas (como 6-benzylaminopurina, BAP), presentan un aumento en la formación de primordios y en el número de óvulos (Cucinotta *et al.*, 2014). De acuerdo a lo presentado por Bencivenga *et al.* (2012), estos fenotipos son consecuencia de una alteración en la expresión de *PINI*. De esta forma quedó demostrada la importancia del *crossstalk* entre las CKs y auxinas en la formación de los primordios de óvulos.

La función de los **brasinoesteroides** en la iniciación y desarrollo del óvulo fue descrito por Huang *et al.* (2013). A través del factor de transcripción BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) los brasinoesteroides pueden influir en el número de óvulos y semillas. En estado desfosforilado, BZR1 se encuentra activo y es capaz de regular positivamente la expresión de *ANT* y reprimir la de *AP2*, promoviendo de esta forma el desarrollo del óvulo (Huang *et al.*, 2013; Cucinotta *et al.*, 2014).

Por último, resultados experimentales obtenidos en nuestro grupo de investigación han demostrado la función reguladora de las **giberelinas** (GAs) en los procesos de iniciación y desarrollo de los óvulos, y por consiguiente en la determinación del número de óvulos (Gomez *et al.*, 2016; Gomez *et al.*, 2018; Barro-Trastoy *et al.*, 2020). Contrariamente a lo observado con las otras fitohormonas, las GAs se correlacionan de forma negativa con el número de óvulos. Por el contrario, son las DELLA, las proteínas reguladoras de las GAs, las que actúan como un factor positivo en la iniciación de los óvulos.

## 1.2. Giberelinas

### a. Estructura y biosíntesis

Las GAs son hormonas vegetales esenciales para las plantas ya que regulan procesos claves de su crecimiento y desarrollo como son la germinación de las semillas, la elongación del tallo y de la raíz, la transición floral, la determinación del número de óvulos y el desarrollo del fruto, entre otros (Sun, 2011; Gupta, 2013; Gomez *et al.*, 2018). Se identificaron por primera vez en 1926 en el hongo *Gibberella fujikuroi*, agente causal de la enfermedad *bakanae* en arroz. Los cultivos afectados por este hongo presentaban una elongación excesiva y una baja producción de semillas. Tras cultivar extractos del hongo, los científicos pudieron identificar el compuesto causante de dicha elongación al que llamaron “Giberelina A” (Sun, 2011). Actualmente, se han identificados más de 130 nuevas moléculas de GAs en plantas, hongos y bacterias. Sin embargo, solo algunas poseen actividad biológica como GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>; el resto actúan como precursores metabólicos de las formas bioactivas o son productos de su inactivación (Yamaguchi, 2008).

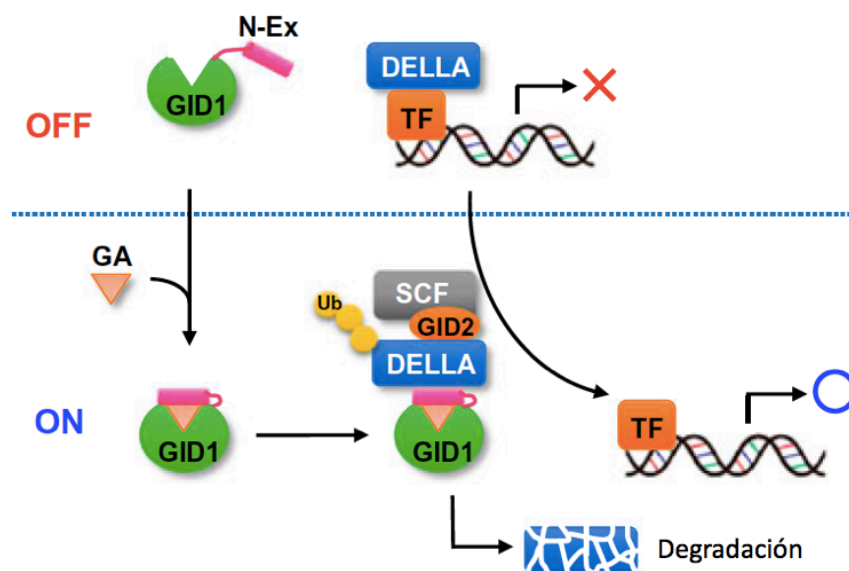
Desde el punto de vista químico las GAs son diterpenoides tetracíclicos (Gupta, 2013). Su nivel de acumulación en *Arabidopsis* se encuentra determinado por la expresión de enzimas de biosíntesis y catabólicas. Entre las primeras, se encuentran las enzimas GA 20-oxidasa (GA20ox) y GA 3-oxidasa (GA3ox) que catalizan los últimos pasos de la biosíntesis de GAs hacia a la producción GAs bioactivas (Yamaguchi, 2008; Sun, 2011; Gupta, 2013). Con lo que respecta su inactivación, las enzimas GA 2-oxidasa (GA2ox) catalizan una 2β-hidroxilación que convierte a las GAs bioactivas (y/o sus precursores) en formas inactivas. Además, existe un mecanismo de retroalimentación negativa que juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de GAs. Mientras que la expresión de los genes de biosíntesis como *GA20ox* y *GA3ox* se regula negativamente en respuesta a un aumento en la señalización de GAs o a niveles elevados de GAs bioactivas, lo contrario sucede para la expresión del gen de catabolismo *GA2ox* (Yamaguchi, 2008; Sun, 2011; Fuentes *et al.*, 2012).

### b. Las proteínas DELLA y la señalización de GAs

Las proteínas DELLA son componentes centrales en la ruta de señalización de GAs, actuando como reguladores negativos. Forman parte de la familia de factores de transcripción GRAS y se caracterizan por tener un motivo DELLA (Asp-Glu-Leu-Leu-

Ala) en su extremo N-terminal y dominio GRAS conservado en el extremo C-terminal (Peng *et al.*, 1997; Vera-Sirera *et al.*, 2015). Se localizan en el núcleo y carecen de dominio canónico de unión al DNA, por lo que deben interactuar de forma directa con otros factores de transcripción y proteínas para regular la transcripción de los genes dianas implicados en la respuesta a las GAs (Davière & Achard, 2013; Vera-Sirera *et al.*, 2015). En *Arabidopsis* se han identificado cinco proteínas DELLA diferentes: GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESOR DE GA1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGA-LIKE2 (RGL2) y RGA-LIKE3 y (RGL3) (Peng *et al.*, 1997; Sun, 2011).

La ruta de señalización de las GAs comienza con la percepción de una GA bioactiva por parte del receptor soluble GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1 (GID1) que se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Esta unión induce un cambio conformacional en el receptor que promueve la interacción del complejo GA-GID1 con el dominio DELLA de proteínas DELLA (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Posteriormente, el complejo GID1-GA-DELLA es reconocido por la proteína F-box SLEEPY1 (SLY1) en *Arabidopsis*. SLY1 es la subunidad F-box del complejo SCF (SKP1, CULLIN, F-BOX) E3 ubiquitina-ligasa que media la poliubiquitinación de las proteínas DELLA (Sun, 2011). La marca de ubiquitina señala a las proteínas DELLA para su degradación a través del proteosoma 26S, permitiendo la transcripción de genes de respuesta a GAs (Sasaki *et al.*, 2003; Davière & Achard, 2013; Sun, 2011).



**Figura 3. Esquema de la ruta de señalización de GAs.** Arriba OFF: en ausencia de GAs bioactivas. Abajo ON: en presencia de GAs bioactivas. Tomado de Miyakawa, et a. (2017).

Utilizando mutantes de las proteínas DELLA es posible estudiar las funciones de éstas y su implicación en la regulación hormonal de las GAs. Por un lado, una completa pérdida de función de DELLA produce una respuesta constitutiva a GAs, generando plantas con fenotipo *slender* y menor número de óvulos, entre otras características (Feng *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2018). Un efecto similar se observa en plantas silvestres tras tratamientos de GAs. Por otro lado, plantas con versiones DELLA dominantes (proteínas estables que no se degradan) presentan un bloqueo constitutivo de la respuesta a GAs, con fenotipo *dwarf* y mayor número de óvulos. Tal es el caso del mutante dominante *gai-1*, en el que la proteína GAI posee una modificación en su motivo DELLA que impide que impide su unión al complejo GA-GID1 (Peng *et al.*, 1997; Gomez *et al.*, 2018). Además, mediante tratamientos exógenos con paclobutrazol (PCB), un inhibidor de la síntesis de GAs, es posible generar un fenotipo similar.

Recientemente, datos recogidos en la bibliografía y ensayos realizados en el laboratorio sugieren una posible interacción entre la función que ejercen las GAs en el desarrollo de los óvulos y el factor de transcripción SPATULA (SPT).

### **1.3. Factor de transcripción SPATULA**

Entre los factores de transcripción pertenecientes a la familia bHLH (hélice-bucle-hélice básica), asociado a la organogénesis floral e involucrado en la señalización por GAs se encuentra el factor SPT (Heisler *et al.*, 2001). Una de sus primeras funciones identificadas fue la estimulación del crecimiento y diferenciación de los tejidos específicos de los márgenes del carpelo (Alvarez & Smyth, 1998). La interrupción de la función de SPT da como resultado una reducción en el crecimiento de los márgenes del carpelo y de los tejidos que surgen de ellos como el *septum*, el estilo, el estigma y el tejido de transmisión del polen. El estilo es hueco y los carpelos no se fusionan correctamente, especialmente en la parte superior. Además, el gineceo es más plano, se expande lateralmente y sus regiones apicales se ven más severamente afectadas que las regiones basales (Alvarez & Smyth, 1998; Alvarez & Smyth, 1999). A pesar de presentar estas alteraciones, la fecundación y desarrollo de semillas tiene lugar, generando frutos más anchos en el plano medio/apical, lo que da como resultado una apariencia similar a una espátula (Heisler *et al.*, 2001).

El gen *SPT* (*At4g36930*) se localiza en el cromosoma 4 de *Arabidopsis* (Alvarez & Smyth, 1999). Consta de siete exones que codifican una proteína de 373 aminoácidos, con un dominio bHLH y una señal de localización nuclear bipartida putativa (Heisler *et al.*, 2001). *SPT* se expresa en hipocótilos y cotiledones de plántulas en germinación, en hojas, pétalos en desarrollo, en el gineceo y en las raíces. En estos tejidos *SPT* tendría distintas funciones, como la represión de la germinación de semillas, la reducción del largo de los hipocotíleos, la inhibición de la expansión de cotiledones, hojas y pétalos, y la represión del crecimiento y tamaño de las raíces (Penfield *et al.*, 2005; Groszmann *et al.*, 2010; Ichihashi *et al.*, 2010; Makkena & Lamb, 2013). A través de un estudio de hibridación *in situ*, Heisler *et al.* (2001) pudieron detectar como *SPT* se expresa en las regiones medias del gineceo durante su elongación, después en el *septum* y en el estigma durante su desarrollo (especialmente en las células del tejido de transmisión) y finalmente en subregiones de óvulos en desarrollo. Los mutantes *spt* presentan un menor número de óvulos, especialmente en la región apical del gineceo. No obstante, poco se conoce sobre los mecanismos que causan esta reducción (Alvarez & Smyth, 1999).

Recientemente se ha demostrado como, durante el desarrollo temprano del gineceo, *SPT* posibilita la señalización por CKs en el dominio medio del gineceo. Esta señalización es necesaria para la actividad y crecimiento del CMM, por lo que su carencia en los mutantes nulos *spt* explicaría la reducción en la cantidad de células del CMM y del *septum* en las etapas tempranas del desarrollo del gineceo (Reyes-Olalde *et al.*, 2017). Posiblemente, y a pesar de no haber sido estudiado en profundidad, la menor cantidad de células del CMM explicaría la menor cantidad de óvulos del mutante *spt*. Al mismo tiempo, *SPT* y las proteínas ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) de tipo B, encargadas de activar los genes de respuesta a CKs, trabajan de forma conjunta activando genes de biosíntesis y transporte de auxinas en el dominio medio y, por ende, estimulando la formación de un gradiente de auxinas (Reyes-Olalde *et al.*, 2017). Se ha demostrado también que ARR1 puede interactuar directamente con proteínas DELLA (Marín-de la Rosa *et al.*, 2015), integrando señales de diferentes vías hormonales durante el desarrollo del gineceo. ARR1 no es el único punto de conexión entre *SPT* y las GAs, en el siguiente apartado se describen diferentes evidencias experimentales que sugieren la posible participación e interacción de ambos elementos en algunos procesos de desarrollo de la planta.

## 2. Antecedentes y objetivos

Tal y como se ha indicado en el apartado anterior, el mutante *spt* produce un número inferior de óvulos. Por otro lado, las GAs están involucradas en la iniciación de los primordios de óvulo y, por lo tanto, en la determinación del número final de óvulos en *Arabidopsis* y en otras especies como tomate y colza (Gomez *et al.*, 2018). Ambas afirmaciones sumadas a diferentes resultados experimentales que ponen de manifiesto una posible interacción entre SPT y la ruta de señalización de GAs, permiten hipotetizar que la reducción en la cantidad de óvulos en *spt* podría ser debida, en parte, a un aumento en la biosíntesis de GAs el gineceo y a la consecuente desestabilización de las proteínas DELLA. Además, se ha descrito que las CKs participan en la formación del número de óvulos y su señalización en el dominio medio del gineceo está regulada por SPT.

A continuación, se explican más detalladamente los **antecedentes** experimentales que apoyan esta hipótesis:

- a. En recientes pruebas experimentales realizadas en nuestro grupo de investigación se ha observado un aumento de los niveles de GAs bioactivas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>) en plántulas de *spt-2*, así como un aumento en la expresión del gen de biosíntesis *GA20ox3* (datos no publicados).
- b. SPT reprime la expresión de genes de biosíntesis *GA3ox1* y *GA3ox2* en semillas de *Arabidopsis* en dormición (Penfield, *et al.*, 2005).
- c. SPT es capaz de interactuar, en ensayos de doble híbrido en levadura, con las proteínas DELLA RGA, GAI y RGL2 (Gallego-Bartolomé, *et al.*, 2010; Josse, *et al.*, 2011).
- d. SPT y las DELLA RGA y GAI actúan de forma análoga restringiendo el crecimiento de los cotiledones en plántulas de *Arabidopsis* (Josse, *et al.*, 2011).
- e. SPT posibilita la señalización por CKs en el dominio medio del gineceo (Reyes-Olalde *et al.*, 2017) y las CKs regulan positivamente el número de óvulos (Cucinotta *et al.*, 2016; Cucinotta *et al.*, 2018).

Partiendo de estas premisas, el presente trabajo tiene como **objetivo** general evaluar si la regulación en el número de óvulos en SPT está mediada por GAs. Para ello abordaremos tres objetivos concretos:

1. Conocer los niveles de GAs en los pistilos de *spt* y describir el efecto de alteraciones en la ruta de señalización de GAs en el mutante *spt*.
2. Caracterizar el número y morfología de los óvulos del mutante *spt*.
3. Estudiar la interacción entre SPT, CKs y GAs en la determinación del número de óvulos.

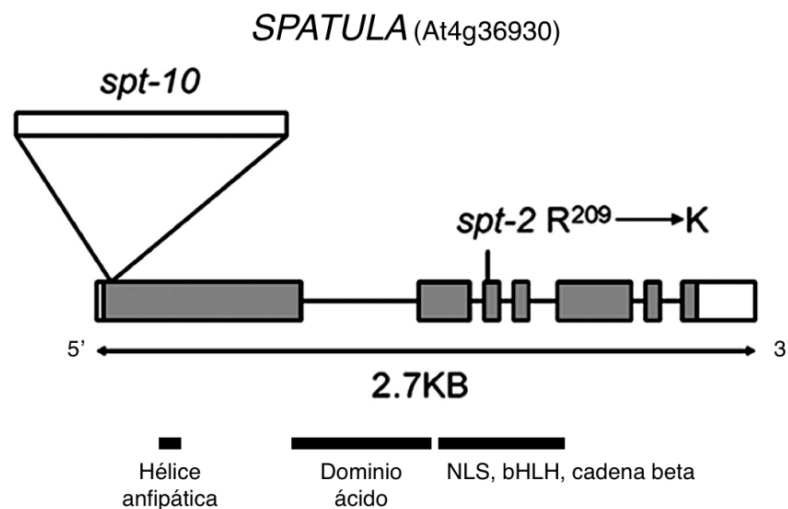
### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Material vegetal

##### a. Líneas genéticas de *Arabidopsis thaliana*

Para llevar a cabo este trabajo se ha utilizado el organismo modelo *Arabidopsis* de los ecotipos *Landsberg erecta* (*Ler*) y Columbia-0 (*Col-0*) con diferentes mutaciones y líneas transgénicas, descritas en la Tabla 1.

Se trabajó mayoritariamente con los mutantes simples *spt-2* y *spt-10*. Como se ha mencionado anteriormente, SPT pertenece a la familia de las proteínas bHLH que se caracterizan por unirse al DNA a través de un tramo de aproximadamente 13 aminoácidos conocido como la región "básica" (Groszmann *et al.*, 2008). El alelo *spt-2* posee un cambio de arginina a lisina justamente en esta región, resultando en la pérdida de especificidad de unión al DNA y por ende en un fenotipo más fuerte (Alvarez & Smyth, 2002). Por otro lado, *spt-10* contiene una inserción estable de un transposón en el primer exón (Penfield *et al.*, 2005).



**Figura 4. Esquema de la región genómica del gen *SPT* y la posición de las mutaciones en los alelos *spt-2* y *spt-10*.** Los exones están representados con cajas grises, 5'UTR y 3'UTR con cajas blancas, los intrones con una línea, las barras indican los dominios estructurales conservados. La región de bHLH extendida incluye una región bipartida NLS (secuencia de localización nuclear), la región bHLH propiamente dicha y la cadena beta C-terminal. Adaptación de Penfield *et al.* (2005) e Ichihashi *et al.* (2010).



El mutante *spt-10* presenta una reducción en el período de dormición de las semillas y su germinación puede ocurrir con luz y en ausencia de tratamiento con frío (Penfield *et al.*, 2005). El mutante *spt-2* exhibe un fenotipo más fuerte en el desarrollo de gineceo y fruto que *spt-10* (Penfield *et al.*, 2005; Heisler *et al.*, 2001). Es posible observar un gineceo aplanado, especialmente en el ápice, que a veces suele no estar fusionado, con un estilo y estigma reducido. Estudios previos han demostrado una disminución de la cantidad de óvulos por gineceo en mutantes *spt-2* (Alvarez & Smyth, 1999).

Se utilizaron también mutantes en la señalización de giberelinas: el mutante dominante *gai-1* y el mutante de pérdida de función de cuatro de los genes DELLA *4xdella*. Además, se dispuso de plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *pGAI:GAI-3xYPet*, realizada previamente en el laboratorio, así como plantas *pRGA:GFP-RGA*, *pGA3ox1-GUS* y *pSPT-6253:GUS*.

Los dobles mutantes PHD3 *spt-2* y PHD6 *spt-2* fueron obtenidos mediante cruce genético. Las poblaciones en heterocigosis fueron sembradas en placas con kanamicina cuya resistencia la aporta la construcción PHD3 o PHD6. Mediante un análisis visual del fenotipo aportado por la mutación en el alelo *spt*, se seleccionaron las plantas F2.

**Tabla 1.** Líneas genéticas de *Arabidopsis*.

	Genotipo	Ecotipo	Referencia
Línea silvestre	-	<i>Ler</i>	Reddei (1962)
Líneas mutantes	<i>spt-2</i>	<i>Ler</i>	Alvarez & Smyth (1999)
	<i>spt-10</i>	<i>Ler</i>	Penfield <i>et al.</i> (2005)
	<i>4xdella (rgaT2 gaiT6 rgl2-1 rgl1-1)</i>	<i>Ler</i>	Cheng <i>et al.</i> (2004)
	<i>gai-1</i>	<i>Ler</i>	Koorneef <i>et al.</i> (1985)
Líneas reporteras	<i>pRGA:GFP-RGA</i>	<i>Ler</i>	Silverstone <i>et al.</i> (2001)
	<i>pGAI:GAI-3xYPet</i>	<i>Ler</i>	En el laboratorio
	<i>pGA3ox1-GUS</i>	Col-0	Hu <i>et al.</i> (2008)
	<i>pSPT-6253:GUS</i>	<i>Ler</i>	Groszmann <i>et al.</i> (2010)
	PHD3	Col-0	Khakhar <i>et al.</i> (2018)
	PHD6	Col-0	Khakhar <i>et al.</i> (2018)

**Tabla 2.** Cruces genéticos.

Genotipo	Referencia
<i>spt-2 gai-1</i>	En el laboratorio
<i>spt-10 gai-1</i>	En el laboratorio
<i>pRGA:GFP-RGA spt-2</i>	En el laboratorio
<i>pGAI:GAI-3xYPet spt-2</i>	En el laboratorio
<i>pGA3ox1-GUS spt-2</i>	En el laboratorio
<i>PHD3 spt-2</i>	En este trabajo
<i>PHD6 spt-2</i>	En este trabajo

### **b. Manipulación de *Arabidopsis*: condiciones de crecimiento y medios de cultivo**

Las semillas, antes de ser sembradas, se esterilizaron superficialmente en una solución de EtOH 70% (v/v) y Triton X-100 0,01% (v/v) durante 15 min en agitación. Luego, se sometieron a un lavado en EtOH 96% (v/v) durante 10 min también en agitación. Posteriormente, en una cabina de flujo laminar se dejaron secar sobre papel de filtro estéril y fueron depositadas sobre medio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962) con 2% de sacarosa en placas Petri. En caso de ser necesario ejercer una presión de selección, se suplementó el medio MS con el agente selectivo correspondiente (glufosinato para las líneas GUS y 3xYPet, o kanamicina para las líneas marcadoras PHD3, PHD6, y GFP). Seguidamente, para su estratificación, se incubaron las placas Petri 7 días a 4°C en oscuridad, para luego ser transferidas a una cámara con fotoperiodo largo (16 h de luz /8 h de oscuridad) a 22°C durante otros 7 días. A continuación, las plántulas fueron trasplantadas a alvéolos con sustrato de una mezcla de turba, vermiculita y perlita (2:1:1), donde crecieron bajo un fotoperiodo de día largo (16 h de luz /8 h de oscuridad) a 22°C de temperatura en invernadero. El riego se realizó con una solución Hoagland número1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

En el caso de ser necesario recolectar las semillas, las plantas adultas y fructificadas se dejaron secar eliminando los riegos unos días previos a la recolección. Se cosecharon los tallos con los frutos en bolsas de papel que fueron conservadas por 7 días en una cámara de 28°C. Por último, se separaron las semillas de los frutos con un tamiz para luego ser almacenadas en tubos Eppendorf.

Para realizar los cruces genéticos, se emascularon flores un día antes de antesis y sus pistilos fueron frotados con anteras maduras del otro parental. Una vez maduros los frutos, pero antes de producirse la dehiscencia de las valvas, se recogieron en tubos

Eppendorf. Se secaron en estufas a 28°C durante 4 días y, finalmente, se separaron las semillas de las cápsulas con ayuda de pinzas.

### **c. Tratamientos químicos exógenos**

Para realizar los tratamientos de GAs se preparó una solución *stock* 10 mM de GA<sub>4</sub>+GA<sub>7</sub> en 100% EtOH. Tras la aparición del meristemo floral, se iniciaron los tratamientos aplicando la solución de la hormona en 1 L de solución nutritiva de riego para llegar a una concentración final de 20 µM. Los riegos se realizaron tres veces por semana. Como control *Mock* se aplicó una cantidad equivalente de EtOH a la solución de riego.

Para realizar los tratamientos con el inhibidor de la biosíntesis de GAs, paclobutrazol (PCB), se preparó una solución *stock* 5 mM en acetona. De forma similar a los tratamientos con GAs, la solución de PCB se aplicó junto con el riego tres veces por semana en dos concentraciones 0,5 µM y 1,5 µM. En este caso, los tratamientos se iniciaron tras el *bolting* y como control *Mock* se aplicó una cantidad equivalente de acetona a la solución de riego.

Para realizar los tratamientos con la CK BAP (6-benzylaminopurina, Duchefa Biochemie) se preparó una solución *stock* 30 mM en 100% EtOH. Una vez iniciado el *bolting*, se sumergieron las inflorescencias del tallo principal de las plantas en 100 µM de BAP con 0.01% Tween 20 en agua destilada. Los tratamientos se realizaron una vez por día durante cuatro días sucesivos y las mediciones se tomaron a los 6 días posteriores del cuarto riego.

### **d. Recuento de óvulos**

Con el objetivo de determinar el número de óvulos por pistilos, se recogieron flores en anthesis, entre las posiciones 13 y 18 del tallo floral principal. Los pistilos fueron aislados y diseccionados bajo la lupa binocular, y con la ayuda de un bisturí se realizaron cortes longitudinales por la zona de las valvas para dejar a los óvulos expuestos y poder contarlos de forma manual.

### **e. Medición del tamaño del ovario, óvulos y semillas**

Para medir el tamaño del ovario, se recogieron flores en anthesis, entre las posiciones 13 y 18 del tallo floral principal. Los pistilos fueron aislados en la lupa binocular para luego ser fotografiados en el macroscopio Leica DMS 1000 (modelo MSV266).

Posteriormente, utilizando el programa ImageJ versión 1.52 a (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EE.UU.) se procesaron las imágenes y se obtuvieron las medidas de longitud de ovario.

Para medir el tamaño de las semillas, se tomaron fotografías de las mismas en el macroscopio Leica DMS 1000. Nuevamente, utilizando el programa ImageJ se procesaron y midieron los perímetros y las áreas de las semillas.

#### **f. Cuantificación de GAs**

Se recogieron inflorescencias de los tallos principales de plantas, eliminando las flores en anthesis. Las muestras fueron trituradas en morteros de cerámica con N<sub>2</sub> líquido y se utilizaron cuatro réplicas con 50 mg de tejido en polvo de cada uno de los mutantes *spt-2* y *spt-10* y *Ler*. La cuantificación se realizó en el Servicio de Metabolómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV).

### **3.2 Ensayos de expresión génica**

#### **a. Extracción de RNA y síntesis de cDNA**

Se recogieron inflorescencias tanto de la línea silvestre *Ler* como de los mutantes *spt-2*, *spt-10*, *gai-1* y *4xdella*. Las muestras de material vegetal se trituraron en morteros de cerámica con ayuda de N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80°C. Se realizaron las extracciones de RNA a partir de 100 mg de muestra usando el kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant Macherey-Nagel, según las instrucciones del fabricante.

Tras la extracción, se utilizó el kit DNA-free<sup>™</sup> Kit (Ambion, Austin, TX, EE.UU.) para eliminar el DNA genómico residual. Posteriormente, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1.000 (Nanodrop Technologies, Rockland, DE, EE.UU.) se determinaron la concentración y calidad del RNA.

Por último, utilizando el kit PrimeScript<sup>™</sup> 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Kyoto, Japón) se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de RNA total. El producto final se diluyó a 50 µL.

#### **b. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

La reacción de PCR cuantitativa se preparó en una placa MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-Well Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) utilizando el kit TB Green<sup>™</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa, Kyoto, Japón). En cada pocillo se colocó 10 µL de

la mezcla Premix 2x, 1 µL de cDNA y 1,2 µL de cada uno de los pares de cebadores a 5 µM y 6,6 µL de agua libre de RNA (Tabla 3).

Para el estudio de la expresión relativa de los genes de biosíntesis de GAs y de los genes DELLA GAI, RGA, RGL1, y RGL2 se utilizaron las muestras vegetales de *Ler*, *spt-2* y *spt-10*. Para el análisis de la expresión relativa del gen *SPT* se utilizaron las muestras vegetales de *Ler*, *gai-1* y *4xdella*. Se realizaron tres réplicas experimentales por muestra, y para cada pareja de cebadores se incluyeron como control tres réplicas sin cDNA.

Se utilizó el termociclador de PCR cuantitativa ABI 7500 Fast-Real Time (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE.UU.) con las condiciones de reacción de PCR descritas en Dorcey *et al.* (2009). Los datos de Cq obtenidos con el programa 7.500 Software v2.04 (Applied Biosystems) fueron analizados en Excel mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Schmittgen & J Livak, 2008). Los niveles de expresión obtenidos se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo *UBQ10* (*At4g05320*).

**Tabla 3.** Cebadores empleados en los ensayos de qRT-PCR.

Gen	Hebra	Secuencia (5' - 3')	Referencia
<i>GA20ox1</i>	Fw Rv	CTTCCATCAACGTTCTCGAGC GGTTTTGAAGGTCGATGAGAGG	Dorcey <i>et al.</i> (2009)
<i>GA20ox2</i>	Fw Rv	CGAGCAGTTTGGGAAGGTGTATC CCTAAACTTAAGCCAGAAGCTCC	Dorcey <i>et al.</i> (2009)
<i>GA3ox1</i>	Fw Rv	TCACTGGCTCGCCTCTCAA ACTCTTCAACGATATCGCAGTAG	Dorcey <i>et al.</i> (2009)
<i>GA3ox2</i>	Fw Rv	GCCACCACCTCAAATACTGTGAA GGCTGCCAACTTTTGCCATATGT	Curaba <i>et al.</i> (2004)
<i>GA2ox1</i>	Fw Rv	CCGGGAACCTTCAGAAACGC GATCCCTAGCCCATCTGTGATC	Thomas <i>et al.</i> (1999)
<i>GA20ox3</i>	Fw Rv	TTC GTG GAC AAC AAA TGG CA CCATTCGTTAGGCCATGAAGG	Rieu <i>et al.</i> (2007)
<i>CUC2</i>	Fw Rv	TCCTGTTTCTCCACTGTCCCTAC CAAAGTCAAACCCTAGCGGCGG	Escoms (2017)
<i>GAI</i>	Fw Rv	CCTCCGTCGTCTAACGCC GTTGACTCAGCCGTCGCTGTA	Gallego-Bartolomé <i>et al.</i> (2012)
<i>RGA</i>	Fw Rv	AGAAGCAATCCAGCAGA GTGFACTCTCTTCTTACC TTC	Gallego-Bartolomé <i>et al.</i> (2012)
<i>RGL1</i>	Fw Rv	GAGTTCATCAATGACGGT GTACTCTGAGTCAGGCTT	Gallego-Bartolomé <i>et al.</i> (2012)
<i>RGL2</i>	Fw Rv	CACCAAAACCACTACCAGC CTATCCACACAACCTTCGGG	Gallego-Bartolomé <i>et al.</i> (2012)
<i>SPT</i>	Fw Rv	CTTCACCCGTGGAGATGAGTCGGG GAGCTTGTTCCCGTTATGTTTGC	En este trabajo
<i>GFP</i>	Fw Rv	CGACGGGAACCTACAAGACAC TTAAGCTCGATCCTGTTGACG	En este trabajo
<i>UBQ10</i>	Fw Rv	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG AAAGAGATAACACGAACCGAAACATA	Czechowski <i>et al.</i> (2005)

Fw = Forward. Rv = Reverse.

### 3.3 Ensayo Western Blot

#### a. Extracción y cuantificación de proteínas

Con el fin de realizar por Western Blot las líneas *pRGA:GFP-RGA*, *pRGA:GFP-RGA spt-2*, *pGAI:GAI-3xYPet* y *pGAI:GAI-3xYPet spt-2* se recogieron inflorescencias con flores totalmente cerradas procedentes de plantas con flores en anthesis en día 10-15. Las muestras fueron trituradas en morteros de cerámica con N<sub>2</sub> líquido y conservadas en el congelador a -80°C. Las proteínas totales se extrajeron con el tampón desnaturizante 2x Laemli (4x Laemli = 10 ml de 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 8 ml de 20% SDS, 20 ml de glicerol, 1 ml de 1,5% de azul de bromofenol, 1 ml ddH<sub>2</sub>O y 40 mg DTT/mL). A cada una de las muestras se le añadieron 150 µL del tampón de extracción, se incubaron por 5 minutos a 95°C, se centrifugaron a 13000 g durante 15 min a 4°C y se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos.

Posteriormente los extractos resultantes de la extracción se cuantificaron utilizando el kit RC DC™ Protein Assay Reagents Package (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Por último, se midió la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro y se calculó la concentración de proteínas totales comparando los datos obtenidos con una recta estándar realizada del mismo modo para concentraciones conocidas de sero-albúmina bovina (BSA). Los extractos se conservaron a -80°C.

#### b. SDS-PAGE y Western Blot

Para realizar el Western Blot, 20 µg de proteínas de cada muestra procedentes de la extracción fueron separadas en una electroforesis en gel de 12,5% SDS-PAGE de 1,5 mm de grosor. Luego, las proteínas se transfirieron mediante electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU.). Posteriormente, con el fin de confirmar la cantidad de proteínas por carrera era equivalente, las bandas de proteínas de las membranas fueron detectadas mediante la tinción con Ponceau S (Serva, Heidelberg, Alemania). Seguidamente, las membranas se lavaron TBST (200 mM Tris HCl pH 7,6, 0,01% Tween 20 y 1,5 mM NaCl), se bloquearon con un agente bloqueante (2% de leche en polvo diluida en TBST) y se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes (Tabla 4).

Por último, para revelar las membranas se utilizó el kit Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Con el

equipo Fujifilm LAS-3000 Imager (Biocompare, South San Francisco, CA, EE.UU.) y utilizando el programa Fujifilm LAS-3000 (Biocompare) se detectó la señal.

**Tabla 4.** Anticuerpos Western Blot.

Anticuerpo	Dilución de uso	Casa comercial
<b>Primario</b> =anti-GFP Living Colors® A.v. Monoclonal Antibody (JL-8)	1:5000	Takara
<b>Secundario</b> =anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Whole Antibody (from sheep)	1:10000	GE Healthcare

### 3.4 Técnicas de microscopía

#### a. Ensayo histoquímico de la $\beta$ -glucoronidasa (GUS)

Se recolectaron 6 inflorescencias de cada línea de *Arabidopsis* a analizar en viales con acetona al 70% y se conservaron en hielo. Siguiendo el protocolo de Carbonell-Bejerano *et al.* (2010), se lavaron las muestras con tampón fosfato al 50 mM, se infiltraron con la solución de reactivo GUS (50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,2; ferrocianida (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>); ferricianida (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), 0,1% Triton X-100; 1 mM X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido ciclohexilamonio, 20mg/80 $\mu$ L DMF)) y se sometieron a vacío durante 20 minutos. Para obtener una señal óptima, las concentraciones de ferrocianida y ferricianida fueron ajustadas según la línea, empleando 10 mM para *pSPT-6253:GUS* y 0 mM para *pGA3ox1-GUS* Los viales se incubaron un *overnight* en oscuridad a 37°C. Seguidamente, se lavaron las muestras con concentraciones crecientes de EtOH hasta alcanzar el 100%, para luego transferirlas a una solución de hidrato de cloral (hidrato de cloral:glicerol:agua, 8g/1mL/2mL) en la cual se conservaron a temperatura ambiente y oscuridad durante cuatro días.

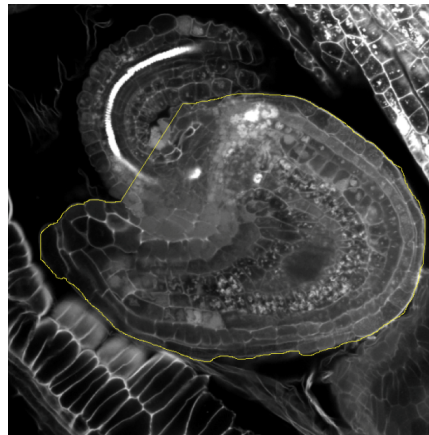
Finalmente, para visualizar la señal en placenta o en óvulos en formación, se montaron los pistilos en un portaobjetos en una solución de glicerol:agua (1:2) y se observaron en condiciones de contraste interferencial (Nomarski) en un microscopio óptico Nikon E600.

#### b. Técnica de tinción Pseudo-Schiff (mPS)-Propidium Iodine (PI)

Con el objetivo de realizar la caracterización fenotípica de los óvulos se recogieron 15 pistilos de flores en estadio de anthesis de *Ler*, *spt-2* y *spt-10*. Las flores se recolectaron

en tubos Eppendorf con una solución 50% metanol + 10% ácido acético y se conservaron siempre en frío hasta el momento de la tinción. Posteriormente se siguieron los pasos del protocolo Pseudo-Schiff (mPS)-Propidium Iodine (PI) (Truernit *et al.*, 2008) adaptado para óvulos de modo que las paredes celulares de los óvulos queden teñidas.

Pasada una semana, se observaron los pistilos en el microscopio confocal LSM 780 (Zeiss), excitando las muestras con un haz láser de Kr/Ar de 561 nm, y se tomaron fotografías de los óvulos. Posteriormente se procesaron y analizaron las imágenes con el software ImageJ. Para obtener el perímetro y el área de los óvulos se tomó como punto de referencia el lugar en donde se ensancha el funículo realizando una línea recta para completar el recorrido tal como muestra la Figura 5.



**Figura 5. Imagen de óvulo teñido mediante la técnica mSI-PI.** La línea amarilla muestra un ejemplo del criterio empleado para la medición del área.

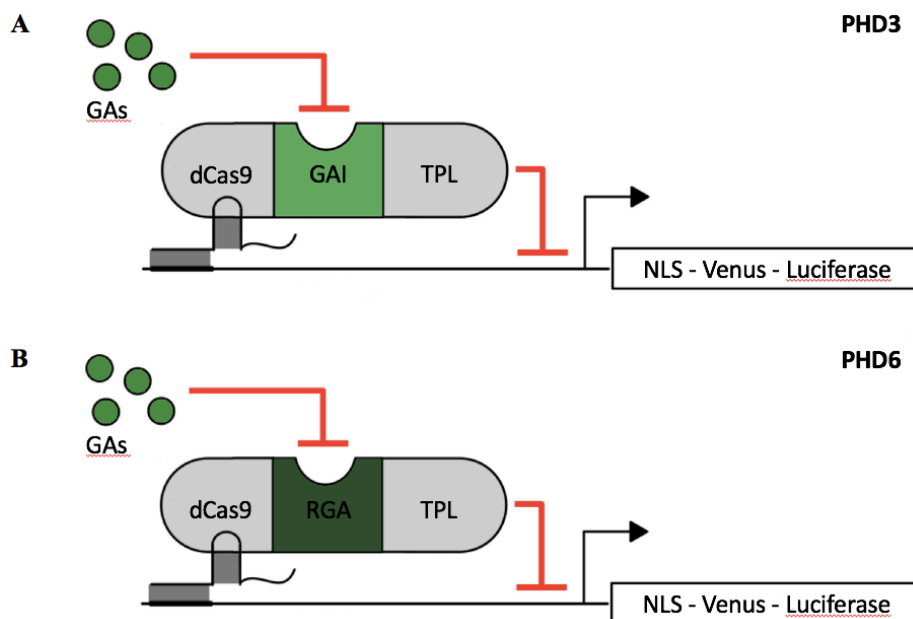
### c. Localización de las proteínas RGA y GAI

Para estudiar la distribución de las proteínas DELLA RGA y GAI en placentas durante la iniciación de los primordios de óvulos, se detectó la fluorescencia de las proteínas GFP/YPet de las líneas *pRGA:GFP-RGA*, *pRGA:GFP-RGA spt-2*, *pGAI:GAI-3xYPet* y *pGAI:GAI-3xYPet spt-2* con un microscopio confocal LSM 780 (Zeiss). Para ello se identificaron los pistilos de los botones florales más jóvenes de la inflorescencia en la lupa binocular, y se les realizó un corte longitudinal con el objetivo de exponer los óvulos en formación y la placenta. Las imágenes obtenidas se editaron con el software ImageJ.



#### d. Visualización de los sensores de giberelinas PHD3 y PHD6

Khakhar *et al.* (2018) diseñaron represores transcripcionales sintéticos llamados HACRs (por las siglas en inglés de *hormone activated Cas9-based repressors*) (Khakhar *et al.*, 2018). Estos HACRs, reprimen la síntesis de la proteína fluorescente Venus. Los HACRs son expresados constitutivamente en todos los tejidos de la planta (están controlados por el promotor constitutivo *UBQ10*), de forma que no se observa fluorescencia. Sin embargo, cuando la hormona, en este caso la GA, está presente, ya sea debido a tratamientos hormonales exógenos o bien a diferencias locales en los niveles hormonales endógenos, la hormona se une al dominio *degron* de la construcción, los HACRs se degradan, el gen *VENUS* se expresa y aparece la señal de fluorescencia correspondiente (Fig. 6). De esta forma, utilizando un microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) se observaron los niveles de fluorescencia (equivalentes a presencia de GAs) en placentas y óvulos en formación en plantas WT y *spt-2*. Se utilizaron dos HACRs diferentes, uno basado en la DELLA GAI (PHD3) y otro en RGA (PHD6). Las imágenes obtenidas se editaron con el software ImageJ.



**Figura 6. Esquema general de las construcciones HACRs para GAs.** Las construcciones presentan un dominio con una Cas9 desactivada (dCas9), un dominio con el *degron* para la hormona (en verde) y un dominio represor TOPLESS (TPL). El *cassette* reportero regulado por el HACR contiene una proteína fluorescente amarilla (Venus) fusionada traduccionalmente a una secuencia de localización nuclear en su N-terminal y a Luciferasa en su C-terminal. **A.** PHD3: el *degron* contiene el cDNA de *GAI*. **B.** PHD6: el *degron* contiene el cDNA de *RGA*. Adaptación de Khakhar *et al.* (2018).

**e. Observación de óvulos mediante la técnica de Nomarski**

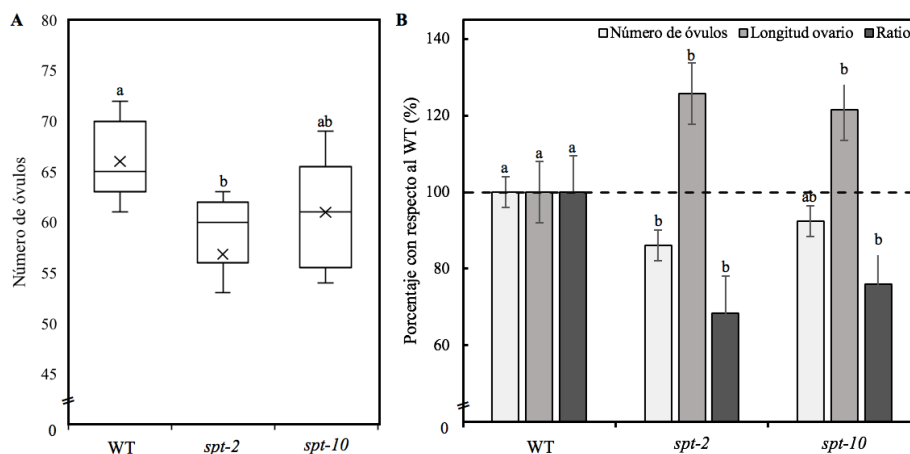
Con el objetivo de visualizar diferencias fenotípicas en la morfología de los óvulos de distintas líneas genéticas se recolectaron pistilos de flores en antesis en tampón fijador FAE (10% formaldehído, 50% de etanol y 5% de ácido acético). Tras una incubación *overnight* a 4°C, los pistilos se lavaron y se deshidrataron hasta alcanzar una concentración de 100% etanol. Se transfirieron los pistilos a hidrato de cloral (hidrato de cloral:glicerol:agua, 8g/1mL/2mL) y se conservaron en dicha solución durante 3 días a 4°C. Finalmente, los óvulos clarificados se observaron en campo claro en un microscopio óptico Nikon Eclipse E600.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. SPT inhibe la síntesis de GAs en el pistilo

#### 4.1.1. SPT regula positivamente el número de óvulos

En primer lugar, para confirmar la reducción en el número de óvulos en mutantes nulos *spt* observada por Álvarez & Smyth (1999) se contaron los óvulos por ovario de plantas silvestres (*wild type*, WT), *spt-2* y *spt-10* y, a la vez, se midió la longitud de los ovarios para comprobar que las mutaciones no causaban una disminución del tamaño que justificara la disminución del número de óvulos. Como podemos observar en la Figura 7A, en el mutante *spt-2* se produce un descenso estadísticamente significativo de alrededor del 15% en el número de óvulos con respecto a las plantas WT, mientras que *spt-10* presenta un fenotipo intermedio con una reducción del 10%. Además, tanto *spt-2* como *spt-10* presentaron ovarios más largos que superaban en más de un 20% al WT y, consecuentemente, una reducción del ratio (calculado como el número de óvulos en relación a la longitud del ovario) (Fig. 7B). Estos datos confirman que SPT regula positivamente el número de óvulos. Por otro lado, la elongación del ovario apoya, junto con los antecedentes previamente indicados, la hipótesis de que en los mutantes *spt* se produce un aumento de GAs en los pistilos, que sería en parte la causa de una disminución del número de óvulos.



**Figura 7. Número de óvulos en los mutantes nulos *spt*.** A. Número de óvulos en WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*. La X representa la media. B. Número de óvulos, longitud de ovario y ratio (número de óvulos/longitud del ovario) en WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*. Letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza 90% (test LSD Fisher).

Si *SPT* esta involucrada en la determinación del número de óvulos, su expresión debería observarse en determinados tejidos del gineceo. Para comprobar esto se llevaron a cabo ensayos GUS en donde efectivamente se observa cómo *SPT:GUS* se expresa, además de en la parte distal del pistilo, en la placenta en estadios tempranos del desarrollo del pistilo (Fig. 8).



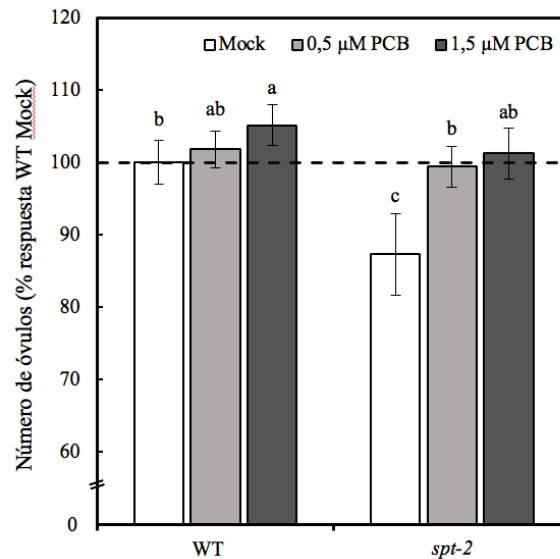
**Figura 8. Expresión de *SPT* en los pistilos.** Expresión de *pSPT-6253:GUS* en pistilos en estadios tempranos de desarrollo.

Considerando que un pistilo más elongado podría deberse a un aumento en los niveles de GAs de los mutantes *spt*, y que la señal ofrecida por los ensayos GUS permite ver cómo *SPT:GUS* se expresa en placenta, podríamos suponer que *SPT* podría estar implicado en los mecanismos de regulación de las GAs y, consecuentemente, en la regulación del número de óvulos.

#### **4.1.2. Efecto de la inhibición de la señalización de GAs en el número de óvulos de *spt***

Para comprobar si el fenotipo de número de óvulos del mutante *spt* está relacionado con un aumento en los niveles de GAs, se realizaron ensayos de riego con distintas dosis de PCB, un inhibidor de la síntesis de GAs. En las plantas WT tratadas con 0,5  $\mu$ M y 1,5  $\mu$ M de PCB se observa un aumento significativo del número de óvulos (Fig. 9). Del mismo modo, este tratamiento logra revertir el efecto de la mutación *spt-2* en el número de óvulos, aumentando su cantidad hasta valores similares al WT (Fig. 9). Estos resultados sugieren que, efectivamente, la disminución en el número de óvulos de los mutantes nulos *spt* podría deberse a un aumento en el contenido de las GAs. El

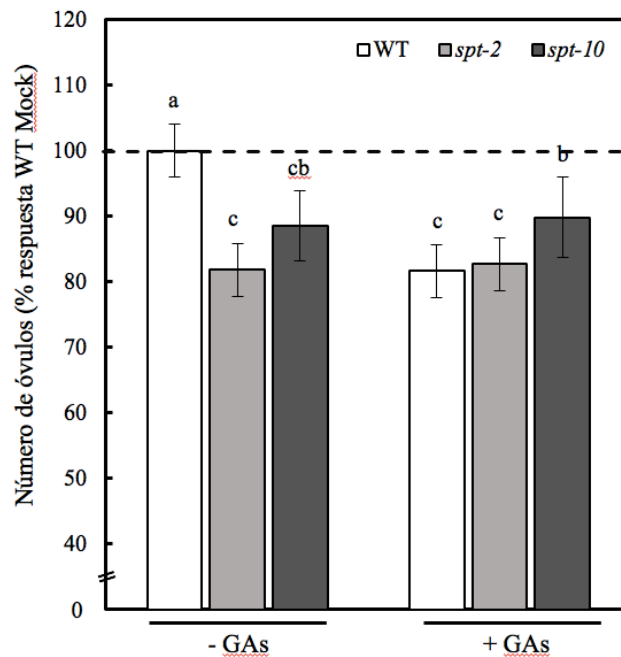
tratamiento con PCB provocaría una reducción de los niveles endógenos de GAs, con la consecuente estabilización de las proteínas DELLA, y por tanto revertir el fenotipo de número de óvulos de *spt-2*



**Figura 9. Efectos del tratamiento con PCB en el número de óvulos del mutante *spt-2*.** Número de óvulos en WT (*Ler*) y *spt-2* tras un tratamiento con 0.5 μM y 1.5 μM de PCB. Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados a WT Mock. Letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 90% (test LSD Fisher).

#### 4.1.3. Efecto de tratamientos exógenos con GAs en mutantes *spt*

Con el fin de intentar elucidar si la respuesta a GAs se encuentra saturada en los mutantes nulos *spt*, es decir, averiguar si las plantas *spt* todavía eran capaces de responder a GAs disminuyendo todavía más el número de óvulos, se realizó un ensayo de tratamiento con GAs a una concentración de 20 μM. En estudios previos realizados por el laboratorio se comprobó que a esta concentración se degradan las proteínas DELLA, y las GAs son capaces de reducir el número de óvulos de plantas WT al mismo nivel que en los mutantes nulos *global* y *4xdella* (Gomez *et al.*, 2018).

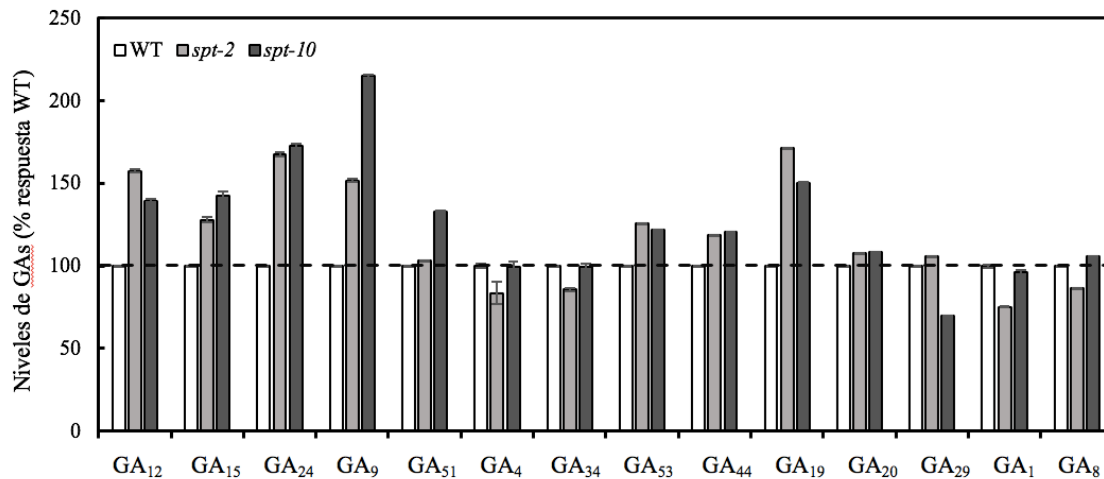


**Figura 10. Número de óvulos en WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10* tras el tratamiento exógenos con GAs.** Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados a WT Mock. Letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 90% (test LSD Fisher).

En primer lugar, se observa una reducción significativa en el número de óvulos tras el tratamiento con GAs en las plantas silvestres (WT +GAs) de entorno al 20%, tal y como habíamos observado con anterioridad en el laboratorio (Gomez *et al.*, 2018). Esto sirve como control de que los tratamientos han sido efectivos. En segundo lugar, observamos como la reducción en la cantidad de óvulos del WT +GAs hace que alcance un valor similar al de *spt-2* sin tratamiento (*spt-2* -GAs). No obstante, el resultado más relevante es que en el mutante *spt-2* no se detectan cambios en la cantidad de óvulos entre el tratamiento con *Mock* (*spt-2* -GAs) y el tratado con GAs (*spt-2* +GAs). Del mismo modo, el mutante *spt-10* tampoco responde significativamente a los tratamientos. Esto indicaría que los niveles de GAs estarían suficientemente incrementados en los mutantes *spt-2* y *spt-10* como para saturar el mecanismo molecular que controla el número de óvulos a través de las GAs. En su conjunto, los datos sugieren que SPT inhibiría la síntesis o acumulación de GAs en los pistilos y su mutación implicaría un aumento endógeno de éstas.

#### 4.1.4. Cuantificación de los niveles de GAs en *spt*

Con el objetivo de confirmar si, efectivamente, SPT modifica niveles de GAs, se cuantificaron las distintas formas de GAs presentes en inflorescencias de plantas silvestres, de *spt-2* y *spt-10*.



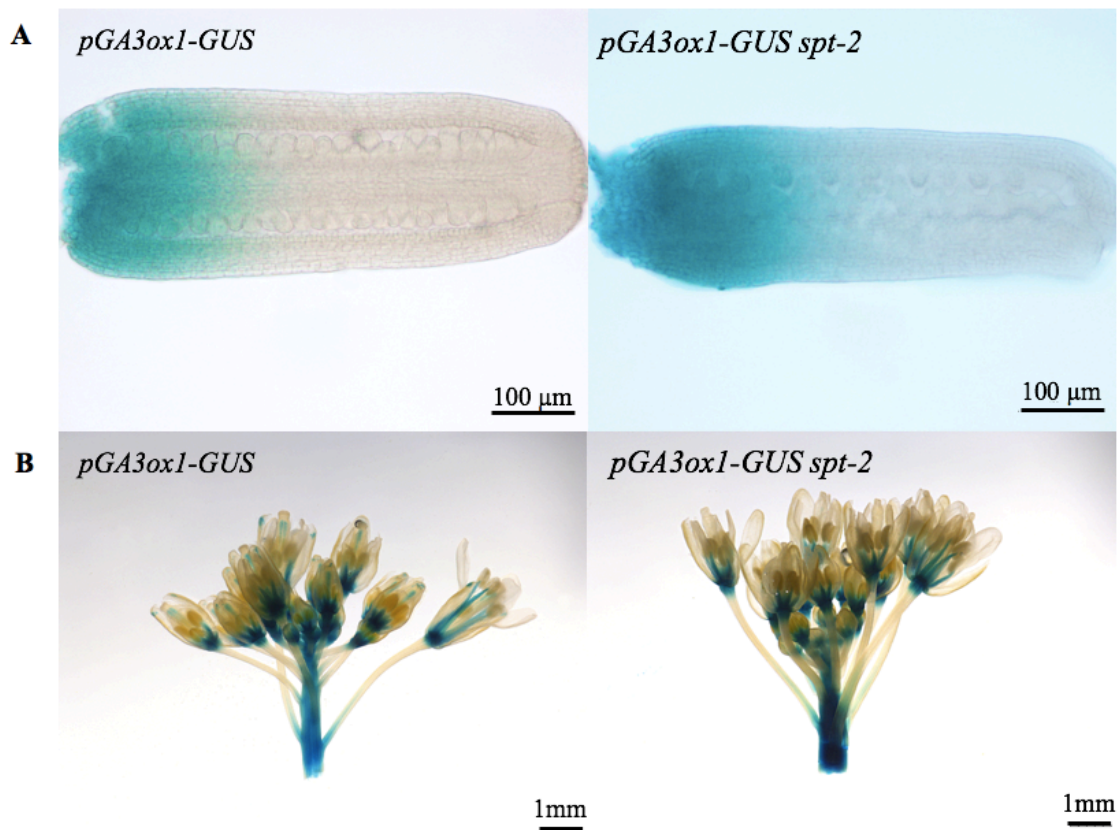
**Figura 11. Niveles de GAs en los mutantes nulos *spt*.** Cuantificación de GAs en inflorescencias de WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*. Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados con respecto a WT (*Ler*).

Como podemos observar en la Figura 11, hay un incremento significativo en algunas GAs (GA<sub>12</sub>, GA<sub>15</sub>, GA<sub>24</sub>, GA<sub>9</sub> y GA<sub>19</sub>) en los mutantes *spt-2* y *spt-10*. No obstante, no se detectaron cambios en los niveles de las GAs bioactivas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>). Estos datos no coinciden con el aumento del nivel de GAs bioactivas en *spt* determinados con anterioridad en el laboratorio (Heres Gozables, 2018). Una posible explicación para esta discordancia es la oscilación circadiana de los niveles de las GAs. Los niveles de GAs se alteran a lo largo del día alcanzando un pico máximo hacia el final de la noche lo que coincide con el período de máximo crecimiento, a partir del cual comienzan a descender al mismo tiempo que los niveles de las proteínas DELLA aumentan (Arana *et al.*, 2011). Es por este motivo que el momento de la toma de muestras puede influir notablemente la cantidad de GAs bioactivas en la planta. Además, cabe mencionar que las muestras recogidas corresponden a inflorescencias por lo que los niveles de GAs no son solo los encontrados exclusivamente en pistilos sino también en otros órganos de desarrollo en estadios muy diferentes de desarrollo.

#### 4.1.5. Regulación por SPT de la expresión de los enzimas de biosíntesis de GAs

A pesar de no haber identificado cambios en los niveles de GAs bioactivas en las inflorescencias de *spt* pero, teniendo en cuenta que previamente Penfield *et al.* (2005) habían descrito un aumento en la expresión de genes de biosíntesis de GAs en semillas en algunos alelos de *spt*, se procedió realizar un análisis de expresión de los genes de biosíntesis en los mutantes *spt-2* y *spt-10*.

En primer lugar, se realizó un ensayo GUS para comparar los niveles de expresión de *GA3ox1* en pistilos en estadios tempranos de desarrollo y en inflorescencias. Cabe mencionar que se ha realizado el ensayo solo con esta enzima de la ruta de biosíntesis dado que es la única que muestra expresión en los pistilos.

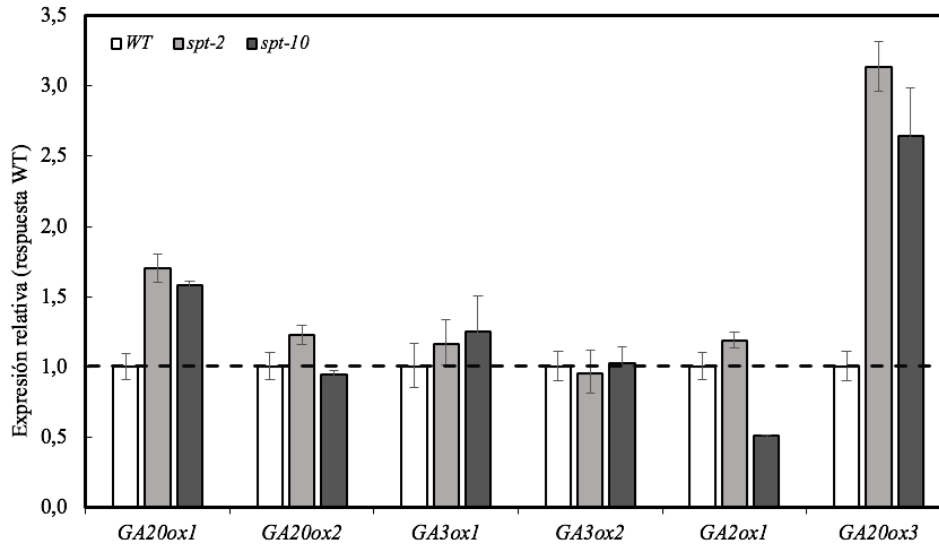


**Figura 12. Expresión de *GA3ox1* en los mutantes *spt*.** A. Expresión de *GA3ox1-GUS* en pistilos en estadios tempranos de desarrollo . B. Expresión de *GA3ox1-GUS* en inflorescencias de plantas WT y *spt-2*.

Como podemos observar en las imágenes, no se detectaron cambios significativos en la actividad del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa en los pistilos (Fig. 12A) ni en otros órganos florales de *spt-2* (Fig. 12B). Tras no observar cambios en la expresión de *GA3ox1* se



analizó mediante RT-qPCR la expresión de diversos genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis de GAs en mutantes *spt-2* y *spt-10* ya que podrían ser otras las enzimas del metabolismo de GAs activadas en los mutantes *spt*.

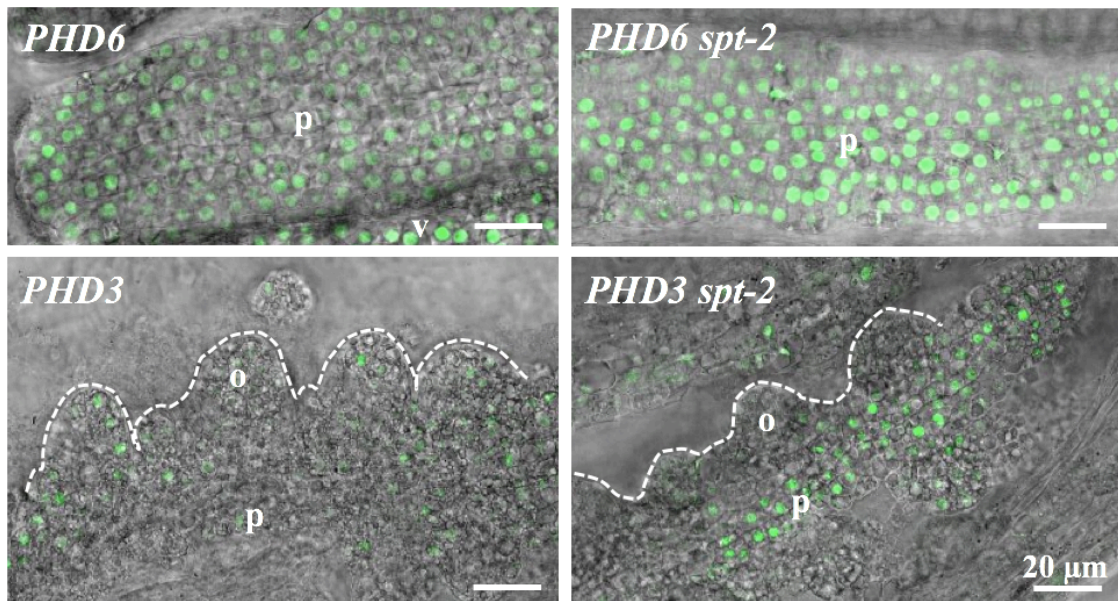


**Figura 13. Niveles de expresión de enzimas GA oxidasas.** Cuantificación de la expresión de genes de enzimas de metabolismo de GAs por RT-qPCR en inflorescencias de WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*.

Similar a lo observado previamente en el ensayo de expresión GUS, la expresión de *GA3ox1* no se ve alterada en los mutantes nulos *spt* (Fig. 13). Sin embargo, se observa un aumento significativo de *GA20ox3* y *GA20ox1*. Todos estos resultados sugieren que posiblemente SPT regula los niveles de GAs a través de la inhibición de estas dos enzimas en las inflorescencias.

#### 4.1.6. Efecto de *spt* en los niveles de GAs en placenta

Debido a la dificultad de cuantificar con exactitud los niveles de GAs específicamente en los pistilos, surge la necesidad de utilizar una nueva herramienta que pueda indicar si efectivamente existe una mayor cantidad de dicha hormona en la placenta de los mutantes *spt*. Recientemente se han desarrollado los sensores sintéticos de hormonas *in vivo* en *Arabidopsis* HACRs (*hormone activated Cas9-based repressors*) (Khakhat *et al.*, 2018). En concreto las líneas *PHD3* y *PHD6* actúan como detectores de cambios endógenos en los niveles de GAs. Para estudiar los posibles cambios en los niveles de GAs en *spt-2*, se generaron las líneas *PHD3 spt-2* y *PHD6 spt-2*.

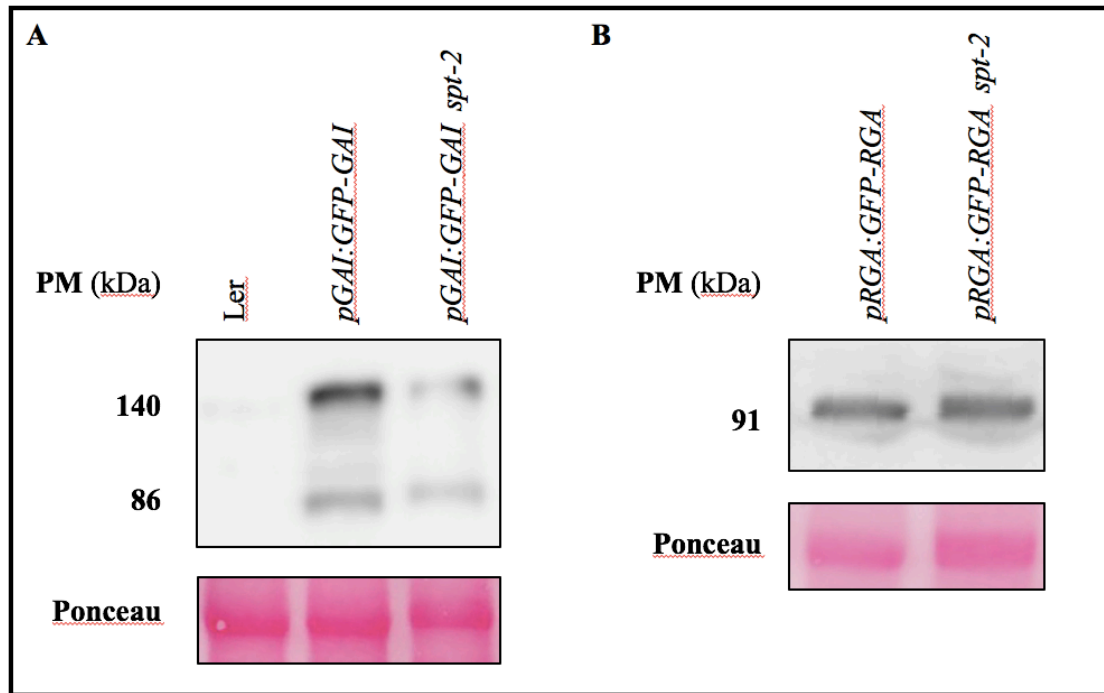


**Figura 14. Expresión de las líneas reporteras *PHD6* y *PHD3*.** Expresión de la línea reportera *PHD6* y *PHD3* en fondo WT (izquierda) y *spt-2* (derecha) en placenta y óvulos en desarrollo temprano. Abreviaturas: p, placenta; o, óvulos; v, valva.

Las imágenes de microscopía confocal muestran un aumento significativo en la cantidad de fluorescencia en placenta (Fig. 14, arriba) y en óvulos en formación (Fig. 14, abajo) en las líneas con fondo mutante *spt-2* comparado con las plantas WT. Estos datos indican que habría más GAs en la placenta del mutante *spt-2*, lo que sugiere que SPT inhibe la acumulación de GAs en la placenta de pistilos en estadios tempranos de desarrollo.

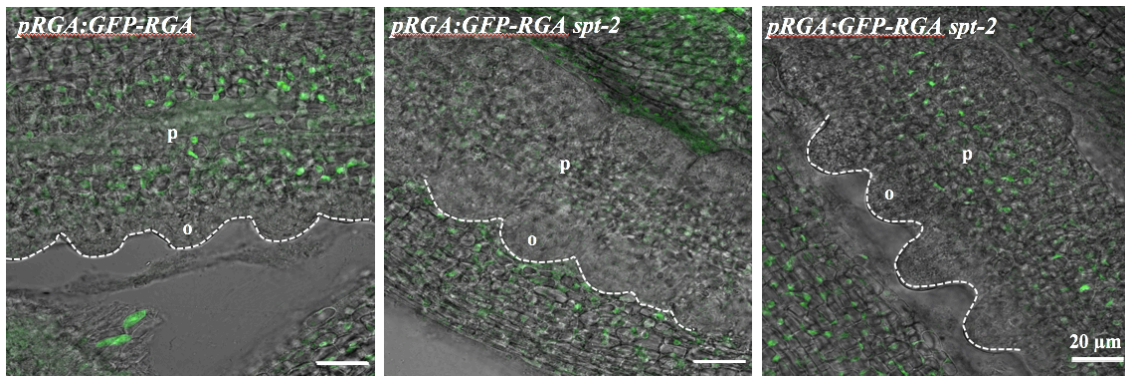
#### 4.1.7. Estabilidad de las proteínas DELLA en *spt*

Tal y como se ha indicado en la introducción, se ha comprobado que SPT y las proteínas DELLA son capaces de interactuar en ensayos de Y2H (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2010; Josse *et al.*, 2011). Ya que la placenta de los mutantes *spt-2* parece tener una mayor cantidad de GAs activas, cabría esperar que tengan también una menor cantidad de proteínas DELLA. Puesto que las proteínas GAI y RGA son las dos DELLA principales involucradas en la determinación del número de óvulos (Gomez *et al.*, 2018), se procedió a evaluar la estabilidad de dichas proteínas DELLA en los mutantes *spt-2*. Para ello se comprobó mediante Western Blots si había una reducción en la cantidad de las proteínas GAI y RGA en el mutante *spt-2* utilizando las líneas *pGAI:GAI-3xYpet* y *pRGA:GFP-RGA* (Fig. 15).



**Figura 15. Análisis de la estabilidad de las proteínas GAI y RGA en inflorescencias de *spt-2*.** **A.** Acumulación de GAI-3xYpet (140 kDa) en plantas WT (*pGAI:GAI-3xYpet*) y en el mutante *spt-2* (*pGAI:GAI-3xYpet spt-2*). **B.** Acumulación de GFP-RGA (91 kDa) en plantas WT (*pRGA:GFP-RGA*) y en *spt-2* (*pRGA:GFP-RGA spt-2*). La carrera *Ler* constituye un control negativo. La tinción con Ponceau confirma que las diferentes carreras contienen igual cantidad de proteína total.

Claramente, tal y como era de esperar, se observó una disminución de la proteína GAI en el mutante *spt-2* (Fig. 15A). Esto está en concordancia con el aumento de GAs en la placenta. En cambio, no se detectaron cambios en la acumulación de RGA (Fig. 15B). Una posible explicación a este resultado inesperado es que, dado que para realizar el Western Blot se tomaron muestras de inflorescencias y que la DELLA RGA se acumula en la mayoría de los tejidos, puede que esta técnica no sea lo suficientemente sensible para detectar pequeñas variaciones en la acumulación de una proteína en un tejido en concreto. Para resolver este problema, se procedió a estudiar la posible pérdida de estabilidad de RGA en *spt-2* utilizando la misma línea reportera pero con microscopía confocal (Fig. 16).

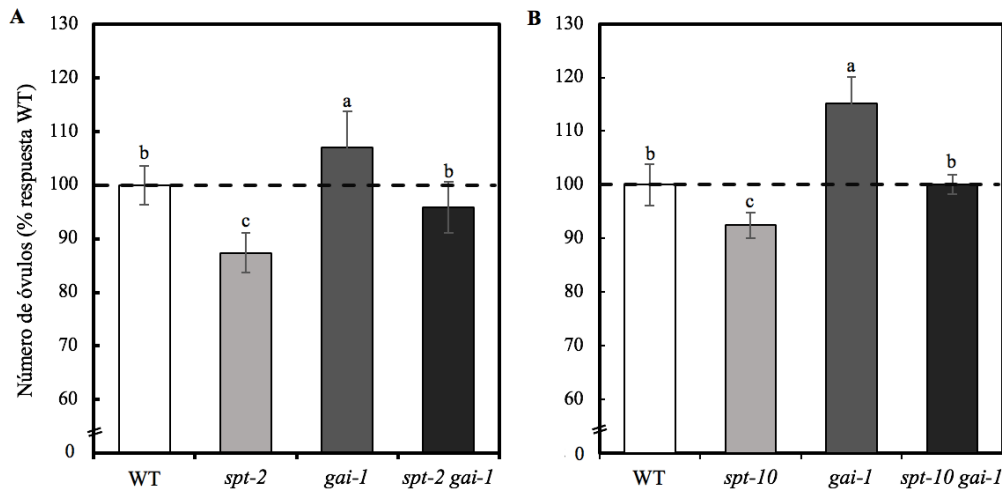


**Figura 16. Visualización de las proteínas RGA en *spt-2*.** Fotografías de óvulos en desarrollo temprano en plantas de la línea *pRGA:GFP-RGA* y plantas de dos líneas de *pRGA:GFP-RGA spt-2*. Abreviaturas: p, placenta; o, óvulos.

Las imágenes obtenidas muestran una pequeña diferencia entre la cantidad de fluorescencia observada en la línea *pRGA:GFP-RGA* y las líneas *pRGA:GFP-RGA spt-2* (Fig. 16). El conjunto de estos datos sugiere que existe una desestabilización de las DELLA, importante en el caso de la proteína GAI y menor en el de RGA, en los pistilos en estadios temprano de desarrollo de los mutantes *spt-2*, causada posiblemente por el aumento en la cantidad de GAs bioactivas. Es decir, SPT participaría en el mecanismo molecular por el cual las GAs regulan la determinación del número de óvulos, posiblemente mediante la regulación de la biosíntesis de GAs y en consecuencia de la estabilidad de las proteínas DELLA en placenta.

#### 4.1.8. Señalización de GAs en los mutantes *spt*

Con el fin de corroborar si el descenso en la cantidad de óvulos en los mutantes *spt* es, efectivamente, debido a un aumento en la síntesis de GAs que en último término provocaría un descenso en el nivel de proteínas DELLA y consecuentemente en el número de óvulos, se estudió si una proteína DELLA resistente a la degradación por GAs (*gai-1*) era capaz de impedir la disminución del número de óvulos en los mutantes *spt-2* y *spt-10* (Fig. 17).

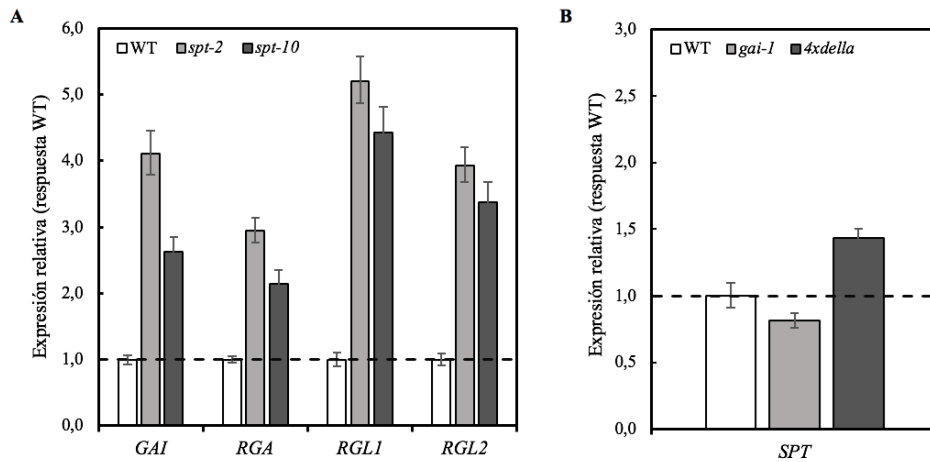


**Figura 17. Número de óvulos en los dobles mutantes *spt gai-1*.** Número de óvulos en WT (*Ler*), *gai-1*, *spt-2* y *spt-2 gai-1* (A) y WT (*Ler*), *gai-1*, *spt-10*, y *spt-10 gai-1* (B). Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados a WT. Letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 85% (test LSD Fisher).

En primer lugar observamos que en el mutante *gai-1* se produce un aumento en el número de óvulos, como ya se había estudiado en Gómez *et. al* (2018), mientras que en el mutante *spt-2* se produce un descenso significativo (Fig. 17). Sin embargo, el mutante doble *spt-2 gai-1* presenta un fenotipo intermedio. Es decir, *gai-1* es capaz de aumentar el número de óvulos en un fondo *spt-2*, alcanzando los niveles de una planta silvestre. Esta misma tendencia se observa también en los mutantes *spt-10* y *spt-10 gai-1*.

#### 4.1.9. Regulación transcripcional de *SPT* y *DELLA*

Por otro lado nos planteamos si, además, podría existir una regulación transcripcional entre *SPT* y *DELLA*, es decir, si *SPT* podría regular la expresión de los genes *DELLA*, o si las GAs podrían regular la expresión de *SPT*. Para responder esta cuestión, se estudiaron los niveles de expresión de los genes *DELLA* en mutantes nulos *spt*, y los niveles de expresión de *SPT* en mutantes que presentan alteraciones en la respuesta a GAs (*gai-1* y *4xdella*).



**Figura 18. Niveles de expresión de genes *DELLA* y *SPT* por RT-qPCR. A.** Cuantificación de la expresión de *GAI*, *RGA*, *RGL1* y *RGL2* en inflorescencias de WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*. **B.** Cuantificación de la expresión de *SPT* en inflorescencias de WT (*Ler*), *gai-1* y *4xdella*.

En primer lugar, se observa un aumento en la expresión de los genes *GAI*, *RGA*, *RGL1* y *RGL2*, tanto en plantas *spt-2* como *spt-10* (Fig. 18A). *RGL3* no fue testado en este ensayo debido a que esta proteína DELLA no participa en la regulación de la iniciación de los óvulos (Gomez *et al.*, 2018). El aumento de expresión de los genes *DELLA* podría explicarse mediante un mecanismo de *feedback*: frente a un aumento en los niveles de GAs en los mutantes *spt*, y la consecuente degradación de las proteínas DELLA, se promueve su transcripción.

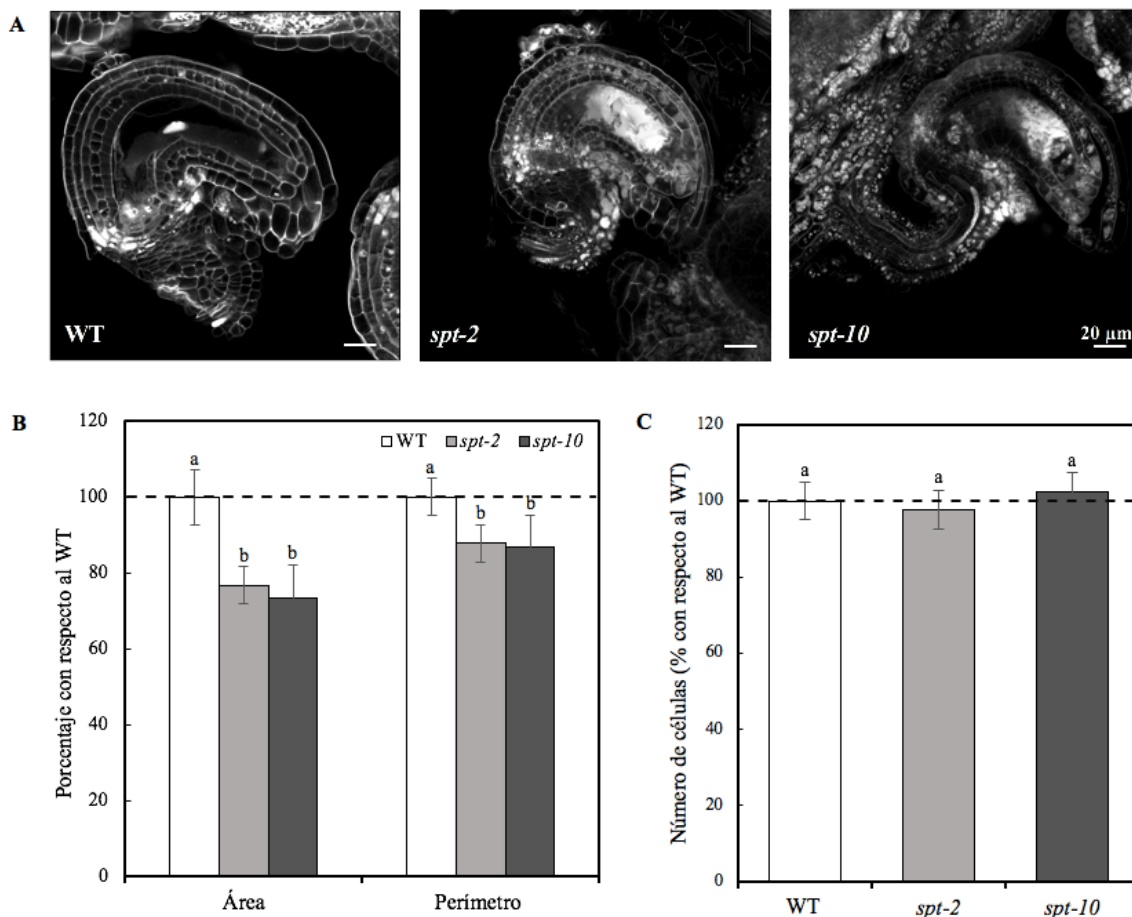
En segundo lugar, al evaluar la expresión de *SPT* en mutantes *gai-1* y *4xdella* (Fig. 18B) no se observaron cambios significativos. Es decir, una respuesta constitutiva a GAs (como como ocurre en el mutante *4xdella*) o una disminución de la respuesta a GAs (como sucede en el mutante *gai-1*) no modifica la expresión de *SPT* en inflorescencias. El hecho de que *SPT* no altere su expresión apoyaría la hipótesis de que se trata de un gen inhibidor de la síntesis o transporte de GAs, actuando por tanto aguas arriba de éstas.

En conclusión, el conjunto de los resultados obtenidos sugiere que el descenso en el número de óvulos de los mutantes nulos *spt* se debe al aumento en los niveles endógenos de GAs y a la consecuente desestabilización de las proteínas DELLA, importante en el caso de la proteína GAI y menor en el de RGA. Por lo tanto, SPT podría participar en el mecanismo molecular por el cual las GAs regulan la determinación del número de óvulos regulando los niveles de dicha hormona en la placenta de pistilos en estadios tempranos de desarrollo a través de la inhibición de las enzimas GA20ox3 y GA20ox1.

## 4.2. Caracterización morfológica de los óvulos y semillas en los mutantes *spt*

### 4.2.1. Estudio morfológico de los óvulos de los mutantes *spt*

Además de afectar al número de óvulos, la pérdida de función de SPT podría tener un efecto en la morfología de los óvulos. Con el fin de conocer si SPT tiene una función en el desarrollo de los óvulos, y no solo en la determinación de su número o en el desarrollo de otros tejidos de la zona media del pistilo, se realizó un análisis fenotípico de los óvulos de los mutantes nulos *spt*. Para ello, se fotografiaron óvulos en el microscopio confocal teñidos mediante la técnica mSI-PI y se calculó su área y perímetro.



**Figura 19. Análisis fenotípico de los óvulos de los mutantes *spt*.** **A.** Fotografía de óvulos maduros de plantas WT, *spt-2* y *spt-10* teñidos mediante la técnica mSI-PI. **B.** Área y perímetro de los óvulos WT, *spt-2* y *spt-10*. **C.** Número de células de la capa más externa del integumento externo de los óvulos WT, *spt-2* y *spt-10*. En B y en C los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados a WT. Letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 90% (test LSD Fisher).

Tal y como es posible observar en las imágenes y en el gráfico de la Figura 19A y B, los mutantes nulos *spt* producen óvulos de menor tamaño, con valores de área y perímetro significativamente inferiores al WT. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el número de células que forman la capa externa del integumento externo (oi) de los (Fig. 19C), lo que sugiere que la disminución del tamaño del óvulo es consecuencia de una disminución del tamaño de las células que los conforman.

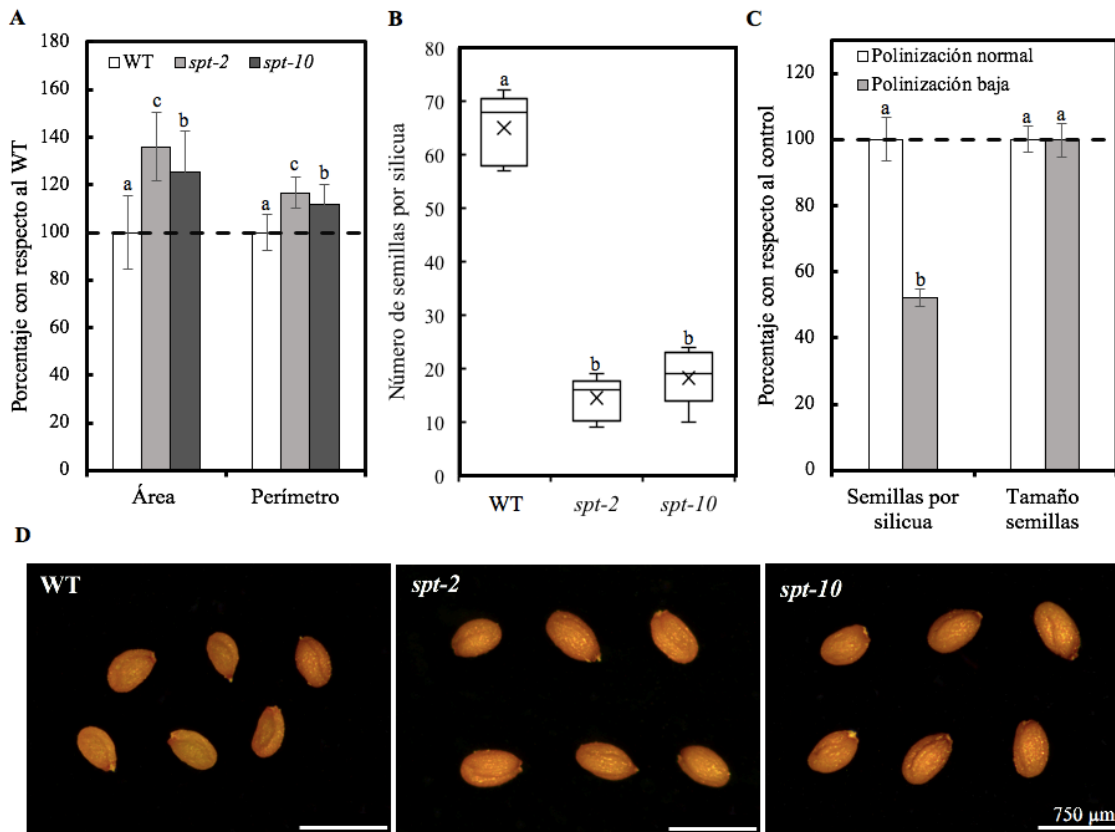
Al igual que ocurre en los mutantes *spt*, los mutantes con señalización constitutiva por GAs, *global* o *4xdella*; presentan óvulos de menor tamaño que las plantas WT (Gómez *et al.* 2016). Por lo cual, el aumento de GAs en los mutantes *spt* podría ser la causa del tamaño inferior de sus óvulos.

#### **4.2.2. Estudio morfológico de las semillas de los mutantes *spt***

Continuando con la línea de estudio, se estudió si el efecto de las mutaciones *spt* en la reducción del tamaño de los óvulos tenía consecuencias en el tamaño de las semillas, teniendo en cuenta además que previamente se había descrito que las semillas del mutante *spt* son más grandes (Liu *et al.*, 2017). Para ello se midieron los perímetros y las áreas de varios lotes de semillas de *spt-2* y *spt-10*.

Como podemos observar en la Figura 20A y D, a pesar de presentar un menor tamaño de óvulos, las semillas de los mutante *spt* resultaron ser más grandes, presentando valores de área y perímetro significativamente superiores al WT. Estas diferencias con respecto a la planta silvestre son aún mayores en el mutante *spt-2*. En este caso, un aumento de las GAs en el pistilo no puede justificar el aumento de tamaño de las semillas, ya que los mutantes con la ruta de señalización por GAs activada presentan semillas de menor tamaño (Gomez *et al.*, 2016). Estos datos sugieren que el mecanismo molecular por el cual SPT controla el tamaño de las semillas sería diferente del mecanismo responsable de la determinación del número y tamaño de los óvulos.





**Figura 20. Análisis fenotípico de las semillas de los mutantes nulos *spt*.** **A.** Área y perímetro de las semillas WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*. Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados a WT. **B.** Número de semillas por silicua en WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*. La X representa la media. **C.** Semillas por silicua y tamaño de las semillas WT (*Ler*) de pistilos polinizados con poca cantidad de polen y con abundante cantidad de polen. Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados al control Polinización normal. En A, B y C distintas letras indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 90 (test LSD Fisher). **D.** Fotografías de semillas de WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*.

Además de presentar semillas más pequeñas, *spt-2* y en *spt-10* presentan también menor cantidad de semillas (Fig. 20B), muy inferior al número de óvulos, tal y como se había descrito previamente en Álvarez *et. al* (1999). Estos autores indican que en *spt-2* solo un cuarto de los óvulos se desarrolla en semillas debido, posiblemente, a la pérdida de tejido de transmisión del pistilo de los mutantes *spt* y, consecuentemente, al crecimiento ineficiente del tubo polínico para alcanzar los óvulos. Una posible explicación al mayor tamaño de las semillas en *spt* sería un efecto compensatorio, por el cual las semillas podrían alcanzar un mayor tamaño al formarse menos semillas en el mismo espacio y por tanto tener más recursos. Para determinar si las semillas de *spt* son más grandes debido a este mecanismo, se realizó un ensayo en donde se emascularon flores de plantas silvestres (*Ler*) y se polinizaron de forma manual utilizando polen

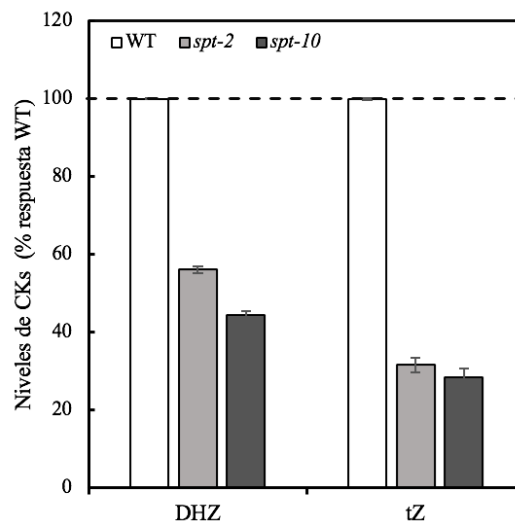
silvestres pero siguiendo dos estrategias. Por un lado, un grupo de pistilos fue polinizado intensamente para imitar la autopolinización y conseguir un elevado número de óvulos fecundados. Por otro lado, otro grupo fue polinizado de forma muy limitada, para conseguir que solo unos pocos óvulos se desarrollaran en forma de semillas. Como podemos observar en la Figura 20C, los pistilos poco polinizados presentaron una menor cantidad de semillas por silicua, lo que indicó que el diseño del ensayo de polinización había sido adecuado. No obstante, el resultado más relevante es que el tamaño de las semillas no se ve alterado (Fig. 20C). Es decir, una menor cantidad de óvulos polinizados no generan semillas de mayor tamaño. Por lo tanto, estos datos corroboran que no existe un mecanismo compensatorio entre el número de semillas y el tamaño de las mismas en *Arabidopsis*, tal y como se había sugerido previamente en Zhou *et. al* (2009). Por tanto, el aumento en el tamaño de las semillas de los mutantes nulos *spt* no se relaciona necesariamente con el menor número de semillas, sino que se debe a una función específica de SPT. Si sumamos estos resultados a los descritos previamente por Liu *et. al* (2017), en donde la pérdida de función de *SPT* en plantas de *Arabidopsis* resultó en un aumento significativo del tamaño de las semillas y en una reducción de su contenido de ácidos grasos, podríamos concluir que SPT esconde funciones que todavía no han sido descritas.

### 4.3. Interacción entre SPT, CKs y GAs en el control del número de óvulos.

#### 4.3.1. Niveles de CKs en mutantes *spt*

Los datos recogidos en la bibliografía sugieren que SPT puede estar implicado en la activación de la señalización por CKs en el dominio medio del gineceo (Reyes-Olalde *et al.*, 2017) y, por otra parte, que las CKs participan en el proceso de iniciación de los primordios de óvulos (Cucinotta *et al.*, 2014). Por tanto, nos planteamos por un lado, si la reducción en el número de óvulos de *spt* podría también ser debida a una disminución en el nivel de CKs, y por otro, si SPT podría inhibir la síntesis de GAs a través de la inducción de CKs en la placenta. De esta forma podríamos establecer un posible *crosstalk* entre SPT y las CKs y GAs en la regulación del número de óvulos.

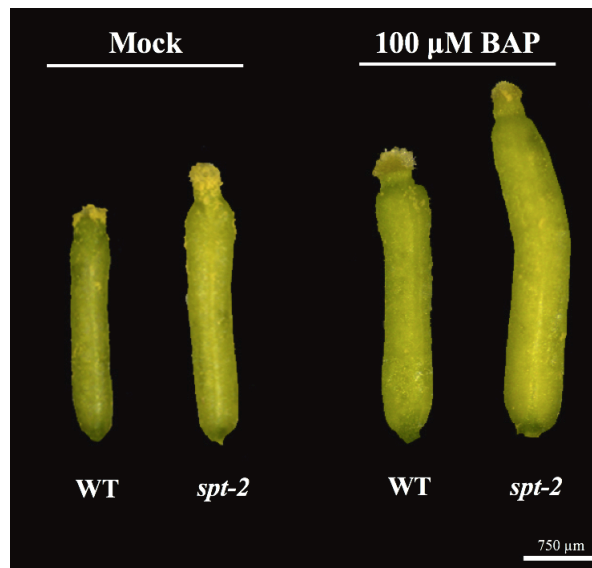
Para ello, en primer lugar, se midieron los niveles de CKs endógenos en inflorescencias de mutantes *spt-2* y *spt-10* (Fig. 21). Como podemos observar, los mutantes presentan una reducción en la cantidad de dihidrozeatina y t-zeatina, dos tipos de CKs isoprenoides. Esta bajada en los niveles de CKs observada coincide con la disminución de expresión del marcador de CKs TCS:GFP .en la zona media de los pistilos *spt* (Reyes-Olalde *et al.*, 2017).



**Figura 21. Niveles de citoquininas nulos *spt*.** Cuantificación de DHZ (dihidrozeatina) y tZ (t-zeatina) en inflorescencias de WT (*Ler*), *spt-2* y *spt-10*. Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados con respecto al WT.

#### 4.3.2. Efecto de tratamientos con CKs en mutantes *spt*

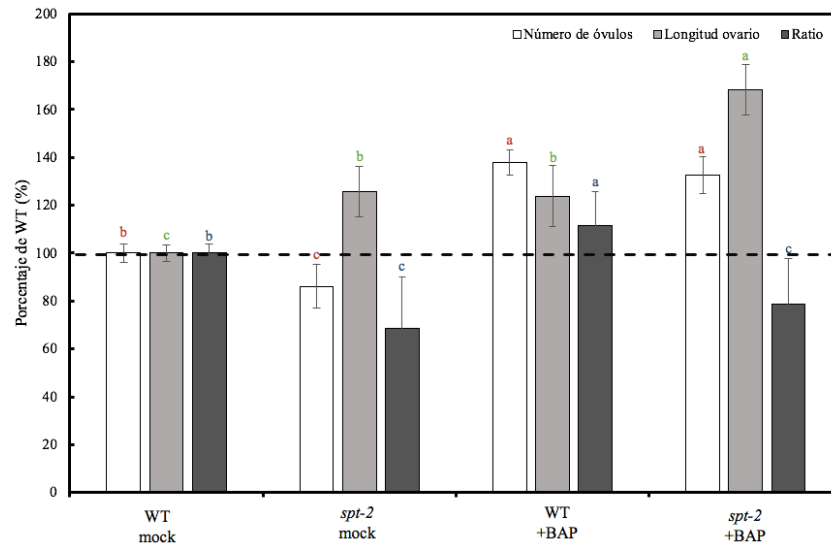
Tras confirmar una reducción de los niveles de CKs en las inflorescencias de los mutantes *spt*, tratamos de forma exógena con BAP (una CK sintética) inflorescencias de estos mutantes y determinamos el efecto en el desarrollo de los pistilos. La aplicación de 100 $\mu$ M de BAP aumentó el tamaño de los pistilos tanto del WT como de los mutantes *spt* (Fig. 22), tal como se había demostrado en plantas WT (Cucinotta *et al.*, 2016). En este mismo trabajo se había demostrado que el aumento en el tamaño del pistilo va acompañado de un aumento en el número de óvulos tras el tratamiento con BAP.



**Figura 22. Efecto de las CKs en los pistilos.** Fotografía de pistilos de WT (*Ler*) y *spt-2* con y sin tratamiento con 100  $\mu$ M de BAP.

Por lo tanto nos preguntamos, ¿el aumento observado en el tamaño del pistilo de *spt-2* va acompañado con un aumento en el número de óvulos? Para responder esta pregunta, se midieron el número de óvulos y la longitud del ovario en plantas WT y *spt-2* tratadas con BAP.

Como podemos observar en la Figura 23 la aplicación de CKs incrementa la longitud de los ovarios y el número de óvulos en los dos genotipos. No obstante, la ratio (calculada como el número de óvulos en relación a la longitud del ovario) no se altera en las plantas *spt-2* tras el tratamiento. Este dato sugiere que el incremento observado en el número de óvulos en *spt-2* puede explicarse por el incremento en la longitud del ovario y, consecuentemente, de la placenta. Por el contrario, la ratio sí se incrementa de manera significativa en el WT, aumentando la densidad de óvulos en WT +BAP.

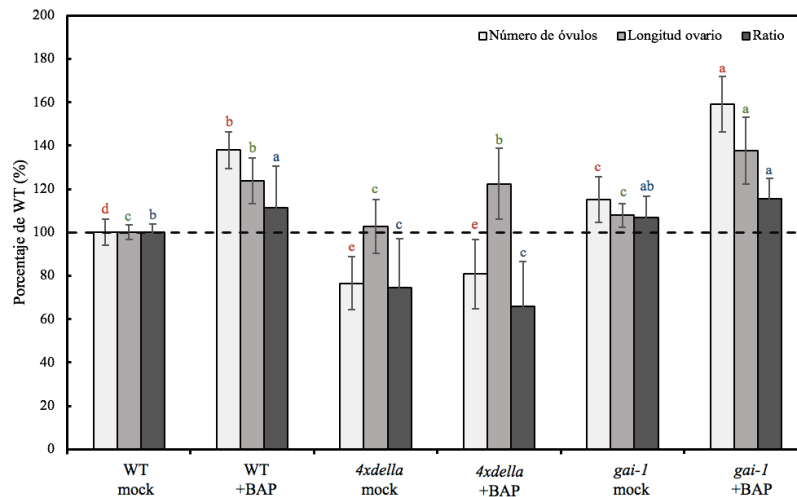


**Figura 23. Efecto de las CKs en los mutantes nulos *spt*.** Número de óvulos, longitud de ovario y ratio (número de óvulos/longitud de ovario) en WT y *spt-2* tras el tratamiento con 100  $\mu$ M de BAP. Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados a WT Mock. Letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 90% (test LSD Fisher).

Por lo tanto, en un fondo WT, las CKs participan en la determinación del número de óvulos ya que el incremento en el número de óvulos es superior al aumento en la longitud del ovario, resultando en un aumento de la densidad representada como la ratio de estos dos parámetros. De hecho, este resultado es consistente con lo descrito previamente en Bartrina *et al.* (2011), en donde las CKs estimulan la actividad meristemática y placentaria, incrementando la formación de primordios de óvulos. En cambio, en las plantas *spt-2* los tratamientos con CKs no logran aumentar la densidad de los óvulos en el ovario al aumentar de forma similar tanto el número como la longitud de ovario, es decir, no alcanzan la densidad de óvulos de una planta WT. Este dato sugeriría que la disminución en el número de óvulos de los mutantes *spt* no se deba, al menos únicamente, a una reducción en la cantidad de CKs endógenas.

#### 4.3.3. Efecto de las CKs en los mutantes *gai-1* y *4xdella*

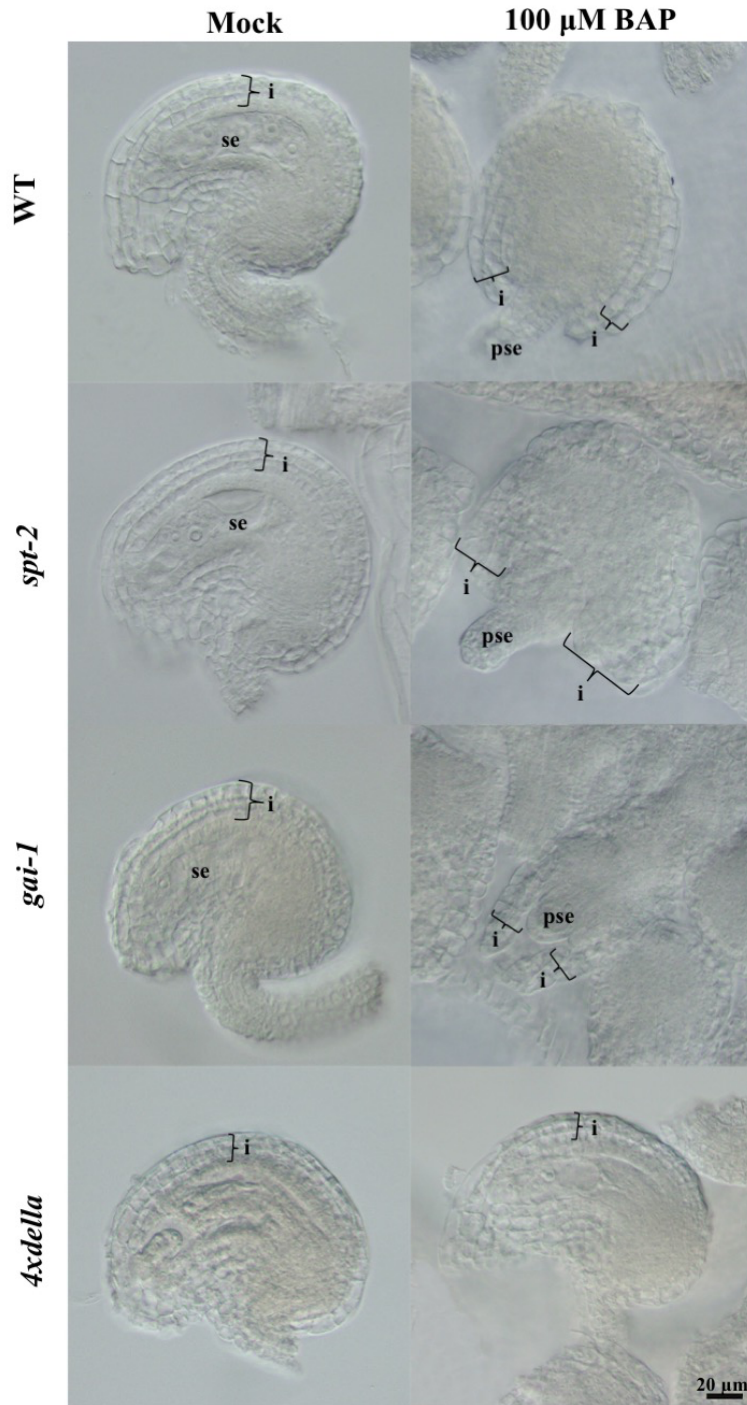
Con el fin de establecer si las rutas de señalización por GAs y CKs actúan conjuntamente o por vías paralelas en el proceso de iniciación y determinación del número de óvulos, se estudió el efecto del riego con BAP en mutantes de la ruta de señalización de GAs.



**Figura 24. Efecto de las CKs en los mutantes de GAs.** Número de óvulos, longitud de ovario y ratio (número de óvulos/longitud del ovario) en WT, *4xdella* y *gai-1* tras el tratamiento con 100  $\mu$ M de BAP. Los datos representan la media y la desviación típica. Los valores fueron normalizados a WT Mock. Letras distintas indican una diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 90% (test LSD Fisher).

La aplicación de BAP en plantas WT y *gai-1* genera un incremento significativo tanto en el número de óvulos como en la longitud del ovario, siendo mayor el primero, de modo que la densidad de óvulos aumenta en ambos genotipos (Fig. 24). En cambio, en el mutante *4xdella*, la aplicación de CKs incrementa la longitud del ovario pero no parece afectar significativamente al número de óvulos (Fig. 24). Es decir, la función de las CKs en la determinación del número de óvulos, pero no en el tamaño del pistilo, parecería ser dependiente de las proteínas DELLA, ya que en ausencia de éstas, las CKs no pueden promover un aumento en el número de óvulos. Por lo tanto, sí que parece existir un *crosstalk* entre CKs y GAs en la iniciación de los óvulos.

Por otro lado, se realizó una caracterización fenotípica de los óvulos de todos los genotipos evaluados con y sin tratamiento de CKs. Para ello se clarificaron los óvulos maduros con hidrato de cloral y se observaron con contraste interferencial en el microscopio. Como muestra la Figura 25, los tratamientos con BAP generan en los óvulos WT y *gai-1* un crecimiento deficiente en los integumentos que no logran cerrarse alrededor del saco embrionario, el cual a su vez presenta malformaciones por lo que fue señalado en las imágenes como “pseudo saco embrionario”. Un caso diferente es el del mutante *4xdella* en donde no parecen existir diferencias en la morfología de los óvulos Mock y los tratados con BAP. Por lo tanto, estos datos preliminares sugieren que el efecto de las CKs en la forma de los óvulos es también dependiente de las proteínas DELLA, al igual que ocurre con la formación de los óvulos.



**Figura 25. Efecto de las CKs en los óvulos de mutantes *spt-2*, *4xdella* y *gai-1*.** Imagen de óvulos de WT (*Ler*), *spt-2*, *4xdella* y *gai-1* con y sin tratamiento con 100 μM de BAP. Abreviaturas: i, integumentos; se, saco embrionario; pse, pseudo saco embrionario.

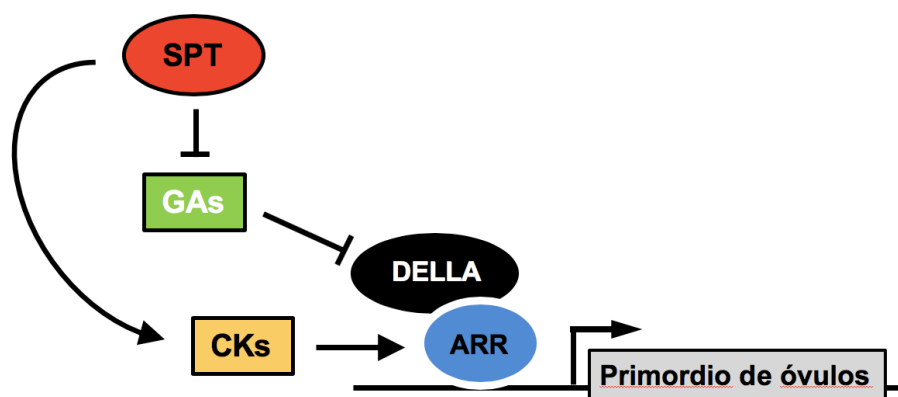
La suma de resultados de este apartado nos indica, por una parte, que el descenso de CKs endógenas en *spt-2* no es al menos el único elemento determinante de su fenotipo, dado que su aplicación exógena logra revertir el descenso en el número de óvulos pero modificando el largo del ovario. Y, por otra parte, que las CKs dependen de la presencia de proteínas DELLA para regular positivamente tanto la iniciación como el desarrollo de los óvulos.

#### 4.4. Discusión general e hipótesis de trabajo

Los resultados generados en este trabajo parecen indicar que SPT tiene una función relevante en el control de la formación de los primordios de óvulos, además de en el control del tamaño de pistilo. SPT reprimiría el crecimiento del pistilo, pero sería a su vez un activador de la formación de los óvulos; los mutantes *spt* presentan un aumento en el tamaño del pistilo y reducción del número de óvulos. El control del número de óvulos por SPT podría producirse por la represión de genes de la biosíntesis de GAs en la placenta (*GA20ox3* y *GA20ox1*), lo que conllevaría a una disminución de los niveles de GAs y la estabilización de las proteínas DELLA. Serían éstas las que finalmente regularían positivamente el número de óvulos. Por otro lado, SPT parece regular positivamente los niveles de CKs, ya que los mutantes *spt* presentan una fuerte reducción de los niveles endógenos de éstas.

Las CKs parecen regular de forma positiva tanto el tamaño del pistilo como el número de óvulos. Además, nuestros datos indicarían que las CKs requieren de las proteínas DELLA para regular tanto la iniciación como el desarrollo de los óvulos.

Con todo ello, podemos deducir un modelo de trabajo que describiría el mecanismo molecular por el cual SPT, CKs y GAs participarían de forma coordinada en la iniciación de los óvulos (Fig. 26).



**Figura 26. Modelo molecular que integra los datos experimentales de la función de SPT, CKs y GAs en la determinación del número de óvulos.**



SPT regularía la iniciación de óvulos mediante la inhibición de la biosíntesis de GAs en la placenta. Esta bajada de los niveles estabilizaría las DELLA, que en último lugar regularían positivamente la formación de primordios de óvulos en la placenta. Por otro lado, las CKs participarían a través de las proteínas DELLA en la regulación del número de óvulos. Este mecanismo podría residir en la interacción directa entre los factores transcripcionales ARR de respuesta a CKs con las proteínas DELLA. Esta interacción se ha descrito en la coordinación de otros procesos de crecimiento y desarrollo mediados por CKs y GAs (Marín-de la Rosa *et al.*, 2015). Además, los ARR participan en la regulación del número de óvulos por CKs (Reyes-Olalde *et al.*, 2017). Por último nuestros datos indican que SPT regularía positivamente los niveles de CKs en inflorescencia. Este modelo parece integrar de forma plausible todas las evidencias experimentales mostradas en este TFM y ha de ser validado en experimentos futuros.

## 5. Conclusiones

Las conclusiones alcanzadas en este Trabajo Final de Máster son:

**PRIMERA.** SPT regula los niveles de GAs de los ovarios a través de la inhibición de las enzimas GA20ox3 y GA20ox1.

**SEGUNDA.** El aumento de GAs en los mutantes *spt* ocasiona una disminución de las proteínas GAI y RGA en la placenta de los ovarios.

**TERCERA.** Los mutantes *spt* generan óvulos más pequeños.

**CUARTA.** No existe una compensación entre la menor cantidad de semillas por silicua y el mayor tamaño de las semillas.

**QUINTA.** Los resultados preliminares sugieren que el efecto de las CKs en la determinación del número y forma de los óvulos es dependiente de las proteínas DELLA.

## 6. Bibliografia

- Aida, M. & Tasaka, M.**, 2006. Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex. *Plant molecular biology*, 60(6), pp.915-28.
- Alvarez, J. & Smyth, D.R.**, 1998. Genetic Pathways Controlling Carpel Development in *Arabidopsis thaliana*. 111, pp.295-98.
- Alvarez, J. & Smyth, D.R.**, 1999. CRABS CLAW and SPATULA, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. 126(1), pp.2377-86.
- Alvarez, J. & Smyth, D.R.**, 2002. CRABS CLAW and SPATULA genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis Thaliana*. 163(1), pp.17–41.
- Arana, M.V. et al.**, 2011. Circadian oscillation of gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *PNAS*, 108(22), pp.9292–97.
- Azhakanandam, S. et al.**, 2008. SEUSS and AINTEGUMENTA mediate patterning and ovule initiation during gynoecium medial domain development. *Plant Physiology*, (146), pp.1165–81.
- Barro Trastoy, D.**, 2018. Estudio de la Función de las Giberelinas en la Determinación del Número de Óvulos en Plantas. (*Trabajo Final de Máster*) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Valencia.
- Barro-Trastoy, D. et al.**, 2020. Regulation of ovule initiation by gibberellins and brassinosteroids in tomato and *Arabidopsis*: two plant species, two molecular mechanisms. *Plant Journal*, en prensa.
- Bartrina, I. et al.**, 2011. Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23, pp.69-80.
- Battaglia, R., Colombo, M. & Kater, M.M.**, 2009. The ins and outs of ovule development. *En L. Ostergaad (Ed.), Fruit Development and Seed Dispersal*, pp.70-106.

- Bencivenga, S., Simonini, S., Benková, E. & Colombo, L.**, 2012. The Transcription Factors BEL1 and SPL Are Required for Cytokinin and Auxin Signaling During Ovule Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24, pp.2886–97.
- Benková, E. et al.**, 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), pp.591-602.
- Carbonell-Bejerano, P. et al.**, 2010. A fertilization-independent developmental program triggers partial fruit development and senescence processes in pistils of Arabidopsis. 154, pp.163–7.
- Ceccato, L. et al.**, 2013. Maternal control of PIN1 is required for female gametophyte development in Arabidopsis. *PLoS One*, 8(6), p.e66148.
- Cheng, H. et al.**, 2004. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. 131(5), pp.1055-64.
- Cucinotta, M., Colombo, L. & Roig-Villanova, I.**, 2014. Ovule development, a new model for lateral organ formation. *Frontiers in plant science*, 5(117), pp.1-12.
- Cucinotta, M. et al.**, 2016. Cytokinin response factors integrate auxin and cytokinin pathways for female reproductive organ development. *Development*, 143, pp.4419-24.
- Cucinotta, M. et al.**, 2018. CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 69(21), pp.5169–76.
- Curaba, J. et al.**, 2004. AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136, pp.3660–69.
- Czechowski, T. et al.**, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. 139(1), pp.5-17.
- Davière, J.M. & Achard, P.**, 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), pp.1147-1151.
- Dorcey, E. et al.**, 2009. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in Arabidopsis. 58(2), pp.318-3.
- Escoms, E.**, 2017. Estudio de la función de las giberelinas en la iniciación de los óvulos en Arabidopsis thaliana.. (*Trabajo Final de Máster*) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Valencia.

- Feng, S. et al.**, 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, 451(7177), pp.475-79.
- Fuentes, S. et al.**, 2012. Fruit Growth in *Arabidopsis* Occurs via DELLA-Dependent and DELLA-Independent Gibberellin Responses. *The Plant Cell*, 24, pp.3982–96.
- Galbiati, F. et al.**, 2013. An integrative model of the control of ovule primordia formation. *The Plant Journal*, 76(3), pp.446-55.
- Galbiati, F. et al.**, 2013. An integrative model of the control of ovule primordia formation. *The Plant Journal*, 76(3), pp.446-55.
- Gallego-Bartolomé, J. et al.**, 2010. Transcriptional Diversification and Functional Conservation between DELLA Proteins in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Evol.*, 27(6), pp.1247–56.
- Gallego-Bartolomé, J. et al.**, 2012. Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), pp.3446-13451.
- Gallego-Giraldo, C. et al.**, 2014. Role of the gibberellin receptors *GID1* during fruit-set in *Arabidopsis*. 79(6), pp.1020-32.
- Girin, T. et al.**, 2011. *INDEHISCENT* and *SPATULA* Interact to Specify Carpel and Valve Margin Tissue and Thus Promote Seed Dispersal in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, pp.3641–53.
- Gomez, M.D. et al.**, 2018. Gibberellins negatively modulate ovule number in plants. *The Company of Biologists*, 145.
- Gomez, M.D., Ventimilla, D., Sacristan, R. & Perez-Amador, M.A.**, 2016. Gibberellins regulate ovule integument development by interfering with the transcription factor *ATS*. *Plant physiology*, 172, pp.2403-15.
- Gonçalves, B. et al.**, 2015. A conserved role for *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes during ovule development. *The Plant Journal*, 83(4), pp.732-42.
- Groszmann, M. et al.**, 2011. *SPATULA* and *ALCATRAZ*, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for *Arabidopsis* gynoecium and fruit development. *The Plant Journal*, 68, pp.816–29.
- Groszmann, M., Bylstra, Y., Lampugnani, E.R. & Smyth, D.R.**, 2010. Regulation of tissue-specific expression of *SPATULA*, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis*. 61(5), pp.1495-508.

- Groszmann, M., Paicu, T. & Smyth, D.R.**, 2008. Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 55, pp.40-52.
- Gupta, R. et al.**, 2013. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant signaling y behavior*, 8(9), p.e25504.
- Heisler, M.G.B. et al.**, 2001. SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. 128, pp.1089-1098.
- Heres Gozables, A.**, 2018. Mecanismo molecular del control por giberelinas del número de óvulos en Arabidopsis.. (*Trabajo Final de Máster*) Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Valencia.
- Hewitt, E.J.**, 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Bristol: Commonwealth Agricultural Bureaux*.
- Hu, J. et al.**, 2008. Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20, pp.320-36.
- Huang, H.Y. et al.**, 2013. BR signal influences Arabidopsis ovule and seed number through regulating related genes expression by BZR1. *Molecular plant*, 6(2), pp.456-69.
- Ichihashi, Y., Horiguchi, G., Gleissberg, S. & Tsukaya, H.**, 2010. The bHLH Transcription Factor SPATULA Controls Final Leaf Size in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology*, 51(2), pp.252–61.
- Josse, E. et al.**, 2011. A DELLA in Disguise: SPATULA Restrains the Growth of the Developing Arabidopsis Seedling. *The Plant Cell*, 23, pp.1337–51.
- Khakhar, A. et al.**, 2018. Synthetic hormone-responsive transcription factors can monitor and re- program plant development. *eLife*, 7(34702).
- Knapp, S.**, 2002. Tobacco to tomatoes: A phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*, (377), pp.2001–22.
- Koorneef, M. et al.**, 1985. A gibberellin insensitive mutant of Arabidopsis thaliana. 65 (1), pp.33-39.
- Liu, B. et al.**, 2017. The SPATULA transcription factor regulates seed oil content by controlling seed specific genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Growth Regulation*, 82(1), pp.111–21.
- Makkena, S. & Lamb, R.S.**, 2013. The bHLH transcription factor SPATULA is a key regulator of organ size in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior*, 8(5), p.e24140.

- Marín-de la Rosa, N. et al.**, 2015. Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins. *PLoS Genetics*, 11(7), p.e1005337.
- Miyakawa, T. & Tanokura, M.**, 2017. Structural basis for the regulation of phytohormone receptors. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(7), pp.1261-73.
- Murashige, T. & Skoog, F.**, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. 15(3), pp.473-97.
- Nahar, M.A. et al.**, 2012. Interactions of CUP-SHAPED COTYLEDON and SPATULA Genes Control Carpel Margin Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 53(6), pp.1134–43.
- Penfield, S. et al.**, 2005. Cold and Light Control Seed Germination through the bHLH Transcription Factor SPATULA. *Current Biology*, 15, pp.1998–2006.
- Peng, J. et al.**, 1997. The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses.. *Genes Dev.*, 11, pp.3194–205.
- Pinyopich, A. et al.**, 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development.. *Nature*, 424(6944), pp.85-88.
- Redei, G.P.**, 1962. Supervital Mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, 47(4), p.443.
- Reyes-Olalde, J.I. et al.**, 2013. Inside the gynoeceium: at the carpel margin. *Trends in Plant Science*, 18(11), pp.644-55.
- Reyes-Olalde, J.I. et al.**, 2017. The bHLH transcription factor SPATULA enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoeceium. *PLoS Genet* , 13(4), p.e1006726.
- Rieu, I. et al.**, 2007. The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *The Plant Journal* , 53(3), pp.488-504.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., et al**, 2003. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant.. *Science*, (299), pp.1896–98.
- Schmittgen, T. & Livak, K.**, 2008. Schmittgen TD, Livak KJ Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. 3(6), pp.1101-08.
- Silverstone, A.L. et al.**, 2001. Repressing a Repressor: Gibberellin-Induced Rapid Reduction of the RGA Protein in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13, pp.1555–65.

- Skinner, D.J. et al.**, 2001. The Arabidopsis HUELLENLOS gene, which is essential for normal ovule development, encodes a mitochondrial ribosomal protein. *The Plant Cell*, 13(12), pp.2719-30.
- Sun, T.P.**, 2011. The molecular mechanism and evolution of the GA–GID1–DELLA signaling module in plants.. *Current Biology*, 21(9), pp.R338-45.
- Thomas, S.G., Phillips, A.P. & Hedden, P.**, 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *PNAS*, 96(8), pp.4698-703.
- Truernit, E. et al.**, 2008. High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in Arabidopsis. 20(1494-1503).
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M. & Nakajima, M.**, 2005. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin.. *Nature*, 437, pp.693–98.
- Vera-Sirera, F., Gomez, M.D. & Perez-Amador, M.A.**, 2015. DELLA proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling. *En D.H Gonzalez (Ed.) Plant Transcription Factors Evolutionary, Structural and Functional Aspects*, pp.313-28.
- Yamaguchi, S.**, 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, pp.225-51.
- Zhou, Y. et al.**, 2009. SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 associates with MINISEED3 and HAIKU2 promoters in vivo to regulate Arabidopsis seed development. *Plant Cell Online*, 21, pp.106–17.