

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

REGULACIÓN HORMONAL DEL DESARROLLO
TEMPRANO DEL FRUTO EN ARABIDOPSIS THALIANA

EAVAN DORCEY

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de Juny de 2007 davant un tribunal format per:

- D. José Luis García Martínez
- D. David Pablo Alabadí Diego
- D. Antonio Vera Tornel
- D. Manuel Acosta Echeverría
- D. Pedro Carrasco Sorlí

Va ser dirigida per:

D. Miguel Ángel Pérez Amador

D. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez

D. Juan Carbonell Gisbert

©Copyright: Servei de Publicacions
Eavan Dorcey

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6836-7

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Regulación hormonal del desarrollo temprano
del fruto en *Arabidopsis thaliana*

Eavan Dorcey
Valencia, 2007



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
(IBMCP, UPV-CSIC)

Regulación hormonal del desarrollo temprano del fruto en *Arabidopsis thaliana*

Trabajo presentado por Eavan Dorcey para optar al grado de Doctora por
la Universitat de València

Valencia, febrero de 2007

El Dr. Miguel Ángel Pérez Amador y el Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez, Científicos Titulares del CSIC, y el Dr. Juan Carbonell Gisbert, Profesor de Investigación del CSIC, todos ellos pertenecientes al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC) de Valencia

CERTIFICAN que la Licenciada en Bioquímica EAVAN DORCEY ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “Regulación hormonal del desarrollo temprano del fruto en *Arabidopsis thaliana*“, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, febrero de 2007.

Dr. Miguel Ángel
Pérez Amador

Dr. Miguel Ángel
Blázquez Rodríguez

Dr. Juan
Carbonell Gisbert

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia (FP-2001-0625)

Este proyecto se enmarca dentro de la financiación del proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia BIO2001-1558.

HE VISTO LO QUE
CREÍA

INVISIBLE

Rémy Zaugg

A mis padres,
por el apoyo infinito.

Quiero agradecer a mis tres codirectores de tesis, Miguel, Miguel y Juan, haberme dado la oportunidad de llevar a cabo esta tesis doctoral en sus laboratorios. Gracias por haber guiado este trabajo, por las ideas, las correcciones, la orientación y la ayuda, y también por haber roto la regla sagrada de los congresos.

Hay dos personas en el IBMCP sin las cuales esta tesis probablemente no habría llegado a salir adelante. Pablo, aunque ya esté más que dicho, hay que insistir: no te imaginas cuánto me has ayudado, científica y personalmente. Ha sido un placer absoluto, y una suerte inmensa, poder trabajar contigo. Espero estar a la altura algún día. Y MD: mil gracias por tu ayuda incansable, por tu inspiración, y por tu apoyo.

Al monovolumen, versión extendida, gracias por demostrar que el trabajo no tiene por qué ser algo miserable (y que de hecho cunde más cuando no lo es). Habéis sido uno de los mejores descubrimientos de esta tesis. A vosotros y a los demás miembros de los labos 12-13-20 (más Dolo y Carlitos), gracias por el ambiente, por la ayuda y la disponibilidad, y por las bodeguitas! En cuanto al labo 12, gracias Mariángeles por estar siempre ahí, incluso en las distancias, por enfriarme cuando hacía falta, por compartir conmigo tus historias y reírte de las mías. Gràcies David per la teua paciència inesgotable, malgrat les presses, per trobar sempre un moment quan sorgia algun dubte, per la teua energia i claredat. Ets una persona inspiradora. Y Cristina, bonita, gracias desde Barcelona por saber leerme los ojos tan bien.

Ha sido un gusto pasar estos años en el IBMCP, y compartir ciencia y vida con muchos de vosotros. Gracias especialmente a Silbia y las leonas, Esme, Mónica, Nuria, Pedro, Andrés, Begoña, Vincent, y a ti, aunque no te haya mencionado. A Lola, Helena, Vicent y Marçal, por abrirme los ojos hace tanto tiempo, al descubrirme esta pasión, y por ayudarme a mantenerlos abiertos tanto tiempo después. To my new adoptive family in Lausanne, but most of all to my adoptive family in Bern (and Zürich): if this thesis had only meant meeting you, it would already have been well worth it. Thank you for the beautiful months which have turned into beautiful years! I Jose, la fiabilitat absoluta, des de sempre ahí amb les respostes precises, sempre a temps. Ets una joia.

Gracias a los externos, sobre todo Mònica, Marga, María, Juan y Edu, por ayudarme a olvidar cuando más necesario es, y por saber reaparecer siempre en el momento justo. A mi familia, gracias por animarme siempre, por apoyarme más allá incluso de lo razonable, por hacerme sentir tan bien y tan querida. Y Thomas, gracias por la ayuda logística, estética, informática, anímica, física, lingüística... por las noches en vela, por la paciencia infinita, weil du immer ein offenes Ohr für mich hast, por hacerme feliz.

Abreviaturas

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4-Cl-IAA	ácido 4-cloroindol-3-acético
ABA	ácido abscísico
ACL5	ACAULIS5
ACT7	ACTINA7
AP3	APETALA3
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
aRNA	RNA amplificado
AUX	auxinas
AXR1	AUXIN RESISTANT1
BRs	brasinosteroides
BSA	seroalbúmina bovina
cDNA	DNA complementario
cer	eceriferum
CKs	citoquininas
Col0	Columbia 0
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DTA ^{ts}	gen de la toxina A de la difteria sensible a la temperatura
EIN2	ETHYLENE-INSENSITIVE2
ET	etileno
ETR1	ETHYLENE RECEPTOR1
GA	giberelina
GA ₃	ácido giberélico
GA2ox	GA 2-oxidasa
GA3ox	GA 3-oxidasa
GA20ox	GA 20-oxidasa
GAI	GA-INSENSITIVE
GAMYB	factores de transcripción tipo MYB dependientes de GA
GAs	giberelinas
GFP	proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
GID1,2	GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1,2
GUS	β-glucuronidasa
IAA	ácido indol-3-acético
JA	ácido jasmónico
keV	kiloelectron voltio
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
LER	Landsberg <i>ERECTA</i>
LFY	LEAFY
LUE1	LUCIFERASE SUPEREXPRESSOR1

MADS-box	MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS and SRF-box
mJ	milijulios
NAA	ácido β -naftalenacético
nm	nanómetro
NPA	ácido 1-N-naftilftalámico
PAs	poliaminas
PAT	transporte polar de auxinas (<i>polar auxin transport</i>)
PAT-2,3,4	<i>PARTHENOCARPIC TOMATO</i> 2,3,4
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	<i>PISTILLATA</i>
PKL	<i>PICKLE</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RGA	<i>REPRESSOR OF GA1-3</i>
RGL1,2,3	<i>RGA-LIKE</i> 1,2,3
SDS	dodecilsulfato sódico
SEM	microscopía electrónica de barrido (<i>scanning electron microscopy</i>)
SLR1	<i>SLENDER RICE</i> 1
SLY1	<i>SLEEPY</i> 1
SNE	<i>SNEEZY</i>
SOC1	<i>SUPPRESSOR OF CONSTANS</i> 1
SPY	<i>SPINDLY</i>
SSC	tampón cloruro de sodio-citrato de sodio
TIR1	<i>TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE PROTEIN</i> 1
UV	ultravioleta

Índice

Introducción	19
Importancia del fruto	21
Estructura del fruto de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Desarrollo por fertilización vs. desarrollo partenocárpico	23
Estudio del desarrollo del fruto en <i>Arabidopsis</i> : mutantes de esterilidad condicional.	26
Interacción entre hormonas en distintos procesos del desarrollo: <i>cross-talk</i>	27
Biosíntesis y señalización por auxinas y giberelinas	29
Interacción entre auxinas y giberelinas	34
Objetivos	37
Materiales y métodos	41
Material vegetal	43
Tratamientos hormonales	44
Medida de los pistilos y frutos	45
Tinción de callosa	45
Microscopía electrónica de barrido (<i>scanning electron microscopy</i> , SEM)	45
Microscopía confocal	46
Obtención de muestras para análisis de expresión génica	46
Extracción de RNA total	47
PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	47
Amplificación y marcaje de RNA para hibridación de micromatrices	49
Hibridación de las micromatrices	49
Resultados	51
1. Modelo experimental para el estudio de la fructificación: el mutante <i>cer6-2</i>	53
2. Procesos de diferenciación durante la fructificación	56

3. Análisis espacio-temporal de la relación entre auxinas y giberelinas	60
3.1. Localización de la síntesis y acción de las auxinas	61
3.2. Inducción de la biosíntesis de giberelinas durante la fructificación	64
3.2.1. Variación de la expresión de los genes de metabolismo de giberelinas durante la fructificación inducida por tratamientos hormonales	65
3.2.2. Variación de la expresión de los genes de metabolismo de giberelinas en los óvulos y el pericarpio	67
3.2.3. Variación de la expresión de los genes de metabolismo de giberelinas a lo largo de la polinización y fertilización	69
4. Participación de la señalización por giberelinas en la fructificación	70
4.1. Implicación de los elementos de señalización de giberelinas en la fructificación	71
4.1.1. SPY (<i>spy-5</i>)	71
4.1.2. GAI (<i>gai-1</i> y <i>gai-t6</i>)	72
4.1.3. RGA ($P_{RGA}:GFP-rga\Delta 17$ y <i>rga24</i>)	74
4.1.2. RGL1 (<i>rgl1-1</i>) y RGL2 (<i>rgl2-1</i>)	76
4.2. Regulación de GFP-RGA	78
5. Dianas moleculares de GA ₃	80
Discusión	85
Modelo de acción de las hormonas en el proceso de fructificación en <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
La fertilización de los óvulos induce acumulación de auxinas	87
La presencia de auxinas induce biosíntesis de giberelinas	89
Eventos de señalización por giberelinas tienen lugar aguas abajo de la acumulación de auxinas	90
Universalidad del modelo de acción hormonal durante el desarrollo del fruto	92
Perspectivas de futuro: la función del óvulo en la fructificación	96
Conclusiones	97
Bibliografía	101

Introducción

Importancia del fruto

El fruto es un órgano vegetal altamente especializado que tiene el doble papel de proteger a las semillas en desarrollo y asegurar su dispersión cuando están maduras (Roeder y Yanofsky 2006, Ferrándiz *et al.* 1999). Darwin ya proponía que la belleza del fruto serviría como guía para los pájaros y las bestias, con el fin de que el fruto fuera devorado y sus semillas diseminadas (citado en Gillaspay *et al.* 1993). Los frutos, debido a la importancia de su doble función, han estado sometidos a fuerte presión selectiva, lo que ha dado lugar a que, a lo largo de la evolución, se generen una gran variedad de frutos en las angiospermas, asegurando así su supervivencia (White 2002).

El fruto es probablemente el órgano más complejo de la planta, dado que está conformado por muchos tipos celulares y tejidos diferentes. El fruto seco y dehiscente de *Arabidopsis thaliana*, también llamado silicua, es representativo de más de tres mil especies de la familia de las brassicáceas. Su estructura refleja su doble función: suministrar una cámara protectora para las semillas durante su maduración, y dispersar las semillas mediante la diferenciación de varios tipos celulares especializados, que forman un mecanismo similar a un muelle que causa la apertura de la silicua cuando alcanza la madurez, lo que permite que las semillas sean liberadas al entorno (Robles y Pelaz 2005).

Estructura del fruto de *Arabidopsis thaliana*

Los frutos de *Arabidopsis thaliana* se desarrollan a partir de un pistilo o gineceo que consta de dos carpelos fusionados. En la antesis de la flor, cuando tienen lugar la apertura del botón floral y la dehiscencia de las anteras para liberar el polen, todos los tejidos necesarios para la fertilización se han desarrollado completamente, y los tejidos requeridos para la maduración y la dehiscencia del fruto ya están presentes, aunque seguirán desarrollándose después de la fructificación.

El gineceo maduro muestra, a lo largo del eje apical-basal, las siguientes partes: una capa celular única de células papilares o estigma; un estilo corto y sólido; el ovario, que contiene los óvulos y abarca la mayor parte de la longitud del gineceo; y el ginóforo en la base, una estructura corta y parecida a un tallo, que conecta el ovario a la base de la flor (Balanzá *et al.* 2006). En la Figura 1 se muestra un gineceo maduro, con los tejidos que lo conforman. Se ha propuesto que el patrón de desarrollo desde la diferenciación del primordio del pistilo a lo largo de este eje apical-basal viene determinado por un

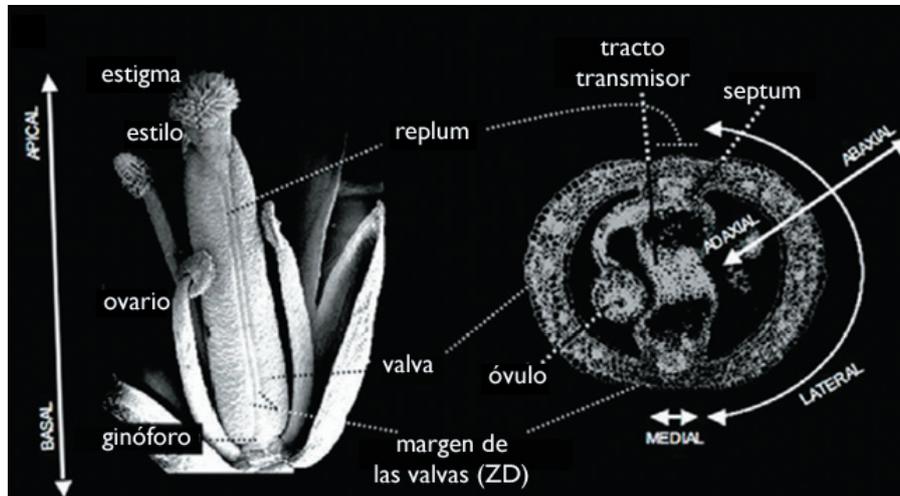


Figura 1. Estructura del gineceo de *Arabidopsis thaliana*. A la izquierda, micrografía electrónica de barrido de una flor en antesis a la que se le han quitado los pétalos y algunos sépalos para visualizar mejor el gineceo. A la derecha, sección transversal de un gineceo de la misma edad. Zona de dehiscencia, ZD. Adaptado de Balanzá et al. 2006.

gradiente de auxinas, probablemente sintetizadas en el extremo distal del pistilo (Nemhauser et al. 2000).

La disposición de los tejidos a lo largo del eje central – lateral se aprecia en una sección transversal (Figura 1): las valvas, en posición lateral, correspondientes a las dos paredes de los carpelos, acaban en una fila de células más pequeñas, que forman una costura longitudinal, llamada margen de las valvas. En posiciones centrales o medias se encuentran los márgenes fusionados de los carpelos, el septum, la placenta y los óvulos. El tracto transmisor, un tejido especializado que facilita el crecimiento del tubo polínico, recorre de arriba abajo todo el gineceo, desde el estigma y a través del centro del estilo y el septum. Todos estos tejidos centrales, junto con el estigma y el estilo apicales, reciben en conjunto el nombre de tejidos marginales, ya que se originan a partir de los márgenes de los carpelos fusionados. Estos tejidos marginales muestran una clara polaridad adaxial – abaxial. Las posiciones abaxiales son ocupadas por el replum, que forma una banda estrecha entre los márgenes de las valvas, mientras que el septum, el tracto transmisor, la placenta y los óvulos son adaxiales (Balanzá et al. 2006).

Después de la fertilización de los óvulos, las células del ovario se dividen y expanden, el fruto se alarga y se diferencian una serie de tipos celulares distintos, que permiten la maduración óptima y la dispersión de las semillas (Robles y Pelaz 1999, Ferrándiz et al. 1999). Así, el fruto maduro consta

fundamentalmente de un ovario elongado (Vivian-Smith y Koltunow 1999). Internamente, la silicua consta de dos cavidades o lóculos separados por un septum. Externamente se aprecian las valvas, el replum y los márgenes de las valvas (Robles y Pelaz 1999). Las valvas están constituidas por seis capas celulares: la epidermis externa o exocarpo, con células largas y estomas; tres capas de tejido fotosintético o mesocarpo; y el endocarpo, conformado por dos capas celulares, el endocarpo *a* o epidermis interna, y el endocarpo *b* o esclerénquima de apoyo. El replum es la acanaladura central que hay entre las valvas, y constituye la estructura por la que las semillas en desarrollo se unen a la planta. El tercer componente estructural del fruto son los márgenes de las valvas, que unen las valvas al replum. Los márgenes de las valvas son visibles como una constricción en la frontera entre las valvas y el replum, a consecuencia de su expansión más lenta durante la maduración del fruto, y están formados por unas pocas filas de células estrechas. La diferenciación de tejidos requerida para la dehiscencia del fruto es, exceptuando el desarrollo de las semillas en el interior de la silicua, el principal proceso de desarrollo que ocurre durante el desarrollo del fruto en *Arabidopsis* (Robles y Pelaz 1999). Al alcanzar la madurez, los márgenes de las valvas se convierten en la zona de dehiscencia. Esta zona comprende una capa de células pequeñas separadoras, que definen un plano longitudinal de ruptura a ambos lados del replum, y una zona adyacente de células lignificadas. El endocarpo *b*, la capa de células interna contigua a la epidermis, también se lignifica. Estas dos regiones de células lignificadas suministran, cuando el fruto maduro se seca, tensiones mecánicas que facilitan la apertura de la silicua (Ferrándiz 2002). Una vez abierta la silicua, las semillas se desprenden por la fuerza mecánica del viento, la lluvia o el contacto físico.

Desarrollo por fertilización vs. desarrollo partenocárpico

Tras la fertilización, las semillas en desarrollo se comunican con el fruto que las envuelve para coordinar su desarrollo simultáneo (Roeder y Yanofsky 2006). Generalmente, el desarrollo del fruto sólo se inicia si tiene lugar la fertilización. En *Arabidopsis*, por ejemplo, si los óvulos no son fertilizados, el desarrollo del gineceo se detiene, y la flor entra en senescencia, con o sin abscisión de los órganos florales distintos del pistilo. El gineceo sigue creciendo ligeramente, debido a elongación celular en el endocarpo y el exocarpo y algo de división celular en el mesocarpo, pero no llega a alcanzar la longitud de los frutos polinizados (Vivian-Smith y Koltunow 1999). Desde hace mucho tiempo se ha sugerido que el desarrollo del fruto después de la fertilización sería impulsado por las hormonas sintetizadas en las

semillas en desarrollo (Gustafson 1939, Nitsch 1950), y se ha comprobado cuantitativamente que esa síntesis de fitohormonas tiene lugar (Eeuwens y Schwabe 1975, Sponzel 1983, Talón *et al.* 1990, García-Martínez *et al.* 1991a, 1991b, Ben-Cheikh *et al.* 1997, Rodrigo *et al.* 1997). Sin embargo, es posible desacoplar el desarrollo del fruto y el de las semillas, como demuestra la existencia de frutos partenocárpicos en distintas especies. En el caso de especies con interés comercial, los frutos partenocárpicos presentan características especialmente atractivas, como características organolépticas mejoradas, facilidad de consumo o una duración más prolongada después de la recolección (Varoquaux *et al.* 2000), además de que se ha observado que algunos cultivares partenocárpicos son más resistentes a condiciones desfavorables en el campo (Ficcadenti *et al.* 1999, Mazzucato *et al.* 1998, Roeder y Yanofski 2006). El desarrollo de frutos partenocárpicos suele tener lugar, por tanto, en ausencia de polinización, o tras una polinización que no culmine con la fertilización (por ejemplo, con polen muerto o procedente de especies incompatibles), o tras el aborto del embrión después de la fertilización (Eeuwens y Schwabe 1975, Gillaspay *et al.* 1993). La partenocarpia suele tener una base genética, se da en numerosas especies de interés comercial, como el tomate, la manzana, la uva o los cítricos, y correlaciona a menudo con niveles endógenos de hormonas elevados (George *et al.* 1984, Homan 1964, Talón *et al.* 1992, Mapelli *et al.* 1978, Mapelli y Lombardi 1982, Yao *et al.* 2001). A consecuencia de esto, se cree que los genes causantes de partenocarpia afectan el patrón de producción, transporte o metabolismo de hormonas, o que son responsables de superar un umbral de concentración de hormonas durante el periodo crítico de la antesis, para promover el crecimiento del ovario de tal manera que la polinización y fertilización ya no sean necesarias, o sean directamente imposibles (Mazzucato *et al.* 1998).

Por otra parte, la adición exógena de diversas hormonas vegetales, especialmente giberelinas (GAs) o auxinas, antes de la fertilización puede conducir al desarrollo de frutos partenocárpicos en numerosas especies (Gustafson 1936, Gustafson 1937, Nitsch 1950, García-Martínez y Carbonell 1980, Alabadí *et al.* 1996, Vivian-Smith y Koltunow 1999), al igual que los tratamientos con inhibidores del transporte polar de auxinas (polar auxin transport, PAT) morfactina y ácido 1-N-naftilftalámico (NPA) en pepino (Robinson 1971, Beyer y Quebedeaux 1974). Se ha propuesto que la capacidad de inducir partenocarpia de los inhibidores del transporte polar de auxinas se debería a que las auxinas sintetizadas en el ovario quedarían bloqueadas, y su acumulación conduciría al desarrollo del fruto. En tomate, berenjena, fresa, frambuesa y pepino, la expresión en el ovario y los óvulos de genes de biosíntesis de auxinas (Rotino *et al.* 1997, Ficcadenti *et al.* 1999, Mezzetti *et al.*

2004, Yin *et al.* 2006) también provoca partenocarpia, al igual que la expresión en tomate del gen *rolB* de *Agrobacterium rhizogenes*, que imita, mediante un mecanismo desconocido, algunos efectos provocados por las auxinas, sin alterar su metabolismo (Carmi *et al.* 2003, Shabtai *et al.* 2007).

En *Arabidopsis*, el alelo *spy-2*, que presenta un fenotipo de hipersensibilidad a GAs debido a la inactivación del regulador negativo de la señalización por esta hormona *SPINDLY* (*SPY*), forma frutos partenocárpicos (Jacobsen y Olszewski 1993), aunque otros alelos de este gen no tienen esta característica (Jacobsen y Olszewski 1993, Vivian-Smith y Koltunow 1999). La sobreexpresión de *CYP78A9*, un gen que codifica un citocromo tipo P450, también provoca el desarrollo de frutos partenocárpicos en *Arabidopsis*. El patrón de expresión de este gen, en los óvulos, junto con la función de los citocromos, que generalmente participan en la biosíntesis o inactivación de metabolitos secundarios, como los brasinosteroides (BRs), sugieren que su efecto inductor sobre el desarrollo del fruto podría deberse a la síntesis en los óvulos de alguna sustancia, quizá una hormona (Ito y Meyerowitz, 2000). Por otro lado, mutaciones en algunos genes *parthenocarpic fruit* (*pat-2* y *pat-3/pat-4*) en tomate causan un aumento en la concentración de GAs activas en los ovarios antes de la polinización, y se ha sugerido que esta sobreproducción de GAs provoca el desarrollo de frutos partenocárpicos que se observa en estos mutantes (Fos *et al.* 2000, Fos *et al.* 2001).

Todas estas observaciones sugieren que la partenocarpia puede ser una consecuencia directa de desequilibrios en los patrones hormonales en el ovario, ya sea a causa de una regulación temporal o espacial incorrecta de su síntesis, o a causa de un aumento de la sensibilidad. No obstante, el análisis de algunos mutantes partenocárpicos sugiere que éste no es el único mecanismo que puede mediar el desarrollo del fruto en ausencia de fertilización. En manzana, por ejemplo, se ha descrito que una mutación en el gen MADS-box *PISTILLATA* (*PI*) induce desarrollo partenocárpico, y en este caso el mecanismo por el que se induce el desarrollo del fruto no parece estar relacionado con desequilibrios hormonales, sino con la modificación de la identidad de los tejidos florales. Los mutantes *pi* en otras especies no presentan partenocarpia, probablemente porque los tejidos de la flor que forman finalmente parte del fruto en manzana son completamente diferentes de los de *Arabidopsis* o tomate (Yao *et al.* 2001). En tomate, sin embargo, se puede inducir partenocarpia reduciendo los niveles de expresión de los genes MADS-box *TM5* (Pnueli *et al.* 1994) y *TM29* (Ampomah-Dwamena *et al.* 2002), homólogos de los genes *SEPALLATA* (*SEP*) de *Arabidopsis*. Se ha propuesto que *TM5* y *TM29* reprimen el desarrollo del fruto, aunque mediante un mecanismo por ahora desconocido. En todo caso, en *Arabidopsis* no se ha

descrito la posibilidad de inducir el desarrollo del fruto mediante alteración de la expresión de genes homeóticos.

Estudio del desarrollo del fruto en *Arabidopsis*: mutantes de esterilidad condicional.

El análisis de los mecanismos que desencadenan la partenocarpia puede ayudar a esclarecer los mecanismos moleculares y las rutas de señalización hormonal que regulan el desarrollo de los frutos polinizados. *Arabidopsis* es una especie adecuada para el estudio de estos procesos, ya que se conocen muchos de los genes implicados en la morfogénesis del pistilo (Roeder y Yanofsky, 2006), y se han estudiado con bastante profundidad las rutas de biosíntesis (Hedden y Phillips 2000, Cohen *et al.* 2003) y señalización por auxinas y GAs (Alvey y Harberd 2005, Fleet y Sun 2005, Dharmasiri y Estelle 2004, Woodward y Bartel 2005). Pero para obtener frutos partenocárpicos en *Arabidopsis* es necesario evitar la fertilización de los óvulos, generalmente emasculando las flores antes de la antesis (antes de que la dehiscencia de las anteras libere el polen). Una alternativa a la emasculación es utilizar mutantes de esterilidad condicional, en los que se puedan evitar la polinización o la fertilización jugando con las condiciones de cultivo. Por ejemplo, el alelo *ap3-1* del gen *APETALA 3* (*AP3*) es una mutación recesiva sensible a la temperatura, que muestra la transformación homeótica de pétalos en sépalos y estambres en carpelos, y por lo tanto esterilidad, cuando las plantas son cultivadas a 25°C o más. A 16°C, en cambio, las flores pueden autofecundarse y producir semillas (Bowman *et al.* 1989). El inconveniente que presenta este mutante es que sus flores tienen una morfología alterada, por lo que no es muy adecuado para estudiar desarrollo del fruto, ya que no es fácil poder determinar el estadio de antesis y otros estadios de desarrollo de la flor y el pistilo. También se ha conseguido fertilidad condicional en función de la temperatura al expresar el gen de la toxina A de la difteria sensible a la temperatura (*DTA^{ts}*) fusionado al promotor A9 específico del tapetum del polen de *Arabidopsis*: las flores presentan esterilidad masculina pero fertilidad femenina a 18°C, y son completamente fértiles a 26°C. La toxina causa muerte celular o ablación de órganos o células, de manera que a las temperaturas a las que la toxina es activa, las células en las que el promotor dirige la expresión del gen mueren, mientras que a las temperaturas a las que la toxina no es activa, no hay efecto (Guerineau *et al.* 2003).

Otro mutante de esterilidad masculina condicional, pero en función de la humedad, es *cer6-2*. Las mutaciones en los genes *ECERIFERUM* (*CER*) de

Arabidopsis eliminan lípidos de cadena muy larga de la superficie de la cutícula y, en algunos casos, de la cubierta del polen. Esta cubierta extracelular es esencial para el reconocimiento del polen por parte del estigma. La mutación *cer6-2* inhibe la hidratación del polen al eliminar lípidos y proteínas de la cubierta del polen (Preuss *et al.* 1993), ambos importantes funcionalmente (Wolters-Arts *et al.* 1998, Mayfield y Preuss 2000). El polen de *cer6-2* es viable, y el fenotipo estéril revierte en condiciones de alta humedad, dado que el agua presente en la atmósfera compensa la necesidad de hidratación por el estigma. Además, las mutaciones *cer6* actúan específicamente sobre la hidratación del polen, sin alterar su adhesión (Zinkl *et al.* 1999). La morfología de las flores de *cer6-2* es normal, y la morfología de los frutos formados cuando las plantas se cultivan en condiciones de humedad ambiental alta (por encima del 60%, aproximadamente) también lo es. Además, las plantas mutantes no parecen tener afectados otros aspectos morfológicos y fisiológicos. Estas características convierten al mutante *cer6-2* en una herramienta excelente para el estudio del desarrollo partenocárpico del fruto en Arabidopsis.

Interacción entre hormonas en distintos procesos del desarrollo: *cross-talk*.

La importancia de las hormonas en el desarrollo y crecimiento de las plantas se fundamenta es que éstas participan prácticamente en la regulación de todos procesos del ciclo vital, desde la germinación de las semillas hasta su maduración en el interior del fruto. Pero la comprensión de sus mecanismos de acción es compleja, dado que a menudo una sola hormona puede afectar muchas respuestas no relacionadas aparentemente, y a la vez un mismo proceso puede estar regulado por diversas hormonas. Actualmente se acepta que la acción de las hormonas sobre cada proceso no suele ser actuando cada una por una vía independiente, sino que la síntesis de unas hormonas está modulada por otras, y la señalización incluye a menudo elementos compartidos. De hecho, se propone que las interacciones no tienen por qué guardar un orden jerárquico, sino que serían más similares a una tela de araña en la que las líneas y nodos representarían las distintas hormonas y su efecto inductor o represor sobre otros genes o procesos. La oscilación global de esta red es más importante que la función de cada nodo individual, dado que todos los nodos trabajan en conjunto para dar la oscilación correcta (Gazzarini y McCourt 1993).

Un ejemplo clásico de interacción entre hormonas es el efecto antagónico del ácido abscísico (ABA) y las GAs sobre la germinación de las semillas

Tabla 1. Interacciones hormonales en *Arabidopsis thaliana*.

Hormonas	Interacción	Referencias
AUX-GA	auxinas necesarias para sensibilidad raíz a GAs	Fu y Harberd 2003
AUX-GA	auxinas inducen biosíntesis GAs	Frigerio <i>et al.</i> 2006
AUX-GA	<i>tir3-1</i> reduce sensibilidad a precursores GAs, inhibidores PAT inducen expresión genes biosíntesis GAs	Desgagné-Penix <i>et al.</i> 2005
AUX-BR	AUX inducen biosíntesis BR para modular niveles correctos	Mouchel <i>et al.</i> 2006
AUX-PA	mutaciones en <i>ACL5</i> reducen PAT en inflorescencias	Clay y Nelson 2005
AUX-JA	mutantes <i>axr1</i> son insensibles a JA	Tiryaki y Staswick 2002
AUX-ET	<i>arf19</i> confiere insensibilidad a AUX y a ET en raíz	Li <i>et al.</i> 2006
AUX-ET	mutaciones en <i>POLARIS</i> confieren hipersensibilidad a ET y alteran PAT	Chilley <i>et al.</i> 2006
ET/GA/BR-ABA	efectos antagónicos sobre germinación semillas	Koorneef <i>et al.</i> 1982, Steber <i>et al.</i> 1998, Gazzarrini y McCourt 2003
ET-GA	etileno modula crecimiento raíz e hipocotilo a través de proteínas DELLA	Achard <i>et al.</i> 2003
ET-ABA	antagonistas en germinación, mutaciones en <i>ETR1</i> reducen sensibilidad a ABA	Beaudoin <i>et al.</i> 2000
ET-ABA	actúan aditivamente en crecimiento raíz	Hugouvieux <i>et al.</i> 2001
ET-CK	CK regulan positivamente paso limitante biosíntesis ET, mutantes <i>ein2</i> insensibles a CK	Vogel <i>et al.</i> 1998
ET-JA	<i>EIN2</i> tiene dominios independientes de señalización por ET y JA	Alonso <i>et al.</i> 1999

Abreviaturas: AUX, auxinas; BR, brasinosteroides; CK, citoquininas; ET, etileno; GA, giberelinas; JA, ácido jasmónico; PA, poliaminas; PAT, transporte polar de auxinas; SA, ácido salicílico.

(Koornneef *et al.* 1982), pero con el paso del tiempo se han descubierto muchas más interacciones, tanto a nivel de síntesis (las auxinas inducen la síntesis de GAs en diversas especies, y también ayudan a mantener los niveles de BRs en *Arabidopsis*), como de señalización (mutantes de señalización por etileno tienen sensibilidad alterada a citoquininas (CKs) o ABA, según el gen mutado). La Tabla I resume algunas de las interacciones que tienen lugar en *Arabidopsis*.

Biosíntesis y señalización por auxinas y giberelinas.

Las hormonas tienen una importancia capital en el desarrollo del fruto. El etileno está implicado en la maduración de los frutos climatéricos, como el tomate, la manzana o el plátano; las citoquininas parecen ser sintetizadas por las semillas en desarrollo, en fases más avanzadas; y se ha propuesto que el ABA regula la desecación de las semillas e induce el letargo del embrión para evitar la germinación temprana, cuando la semilla aún está dentro del fruto (Gillaspy *et al.* 1993). En la uva, un fruto no climatérico, se ha descrito recientemente la implicación de los BRs en la maduración (Symons *et al.* 2006). Durante la fructificación, las hormonas que desempeñan un papel fundamental son las auxinas y las GAs, aunque las CKs también son capaces de inducir fructificación partenocárpica en *Arabidopsis* (Gillaspy *et al.* 1993, Vivian-Smith y Koltunow 1999).

Auxinas.

Al menos dos rutas independientes conducen a la biosíntesis de ácido indol-3-acético (IAA), la auxina producida naturalmente en plantas (Cohen *et al.* 2003, Woodward y Bartel 2005), aunque aún no se han identificado todos los enzimas que actúan en estas rutas. La complejidad del proceso de biosíntesis es uno de los motivos que dificultan el estudio de su regulación. El mecanismo molecular que funciona en la señalización por auxinas sí se conoce con más detalle (Figura 2): las auxinas regulan la expresión de genes diana mediante la degradación de las proteínas Aux/IAA, que son proteínas nucleares de vida corta. Las auxinas promueven la ubiquitinación de estas proteínas de respuesta a auxinas Aux/IAA por el complejo SCF^{TIR1} (Skp1 – Cullin – F-box), lo que conduce a su degradación por el proteasoma 26S. Así se elimina el efecto represor de los complejos Aux/IAA sobre los factores de transcripción de respuesta a auxinas ARF, y se permite la transcripción de genes diana de las auxinas. El mecanismo por el que las auxinas promueven la interacción SCF^{TIR1} – Aux/IAA es la unión directa de IAA a TIR1, que es el receptor de auxinas (Dharmasiri *et al.* 2005, Kepinsky y Leyser 2005, Bishopp *et al.* 2006).

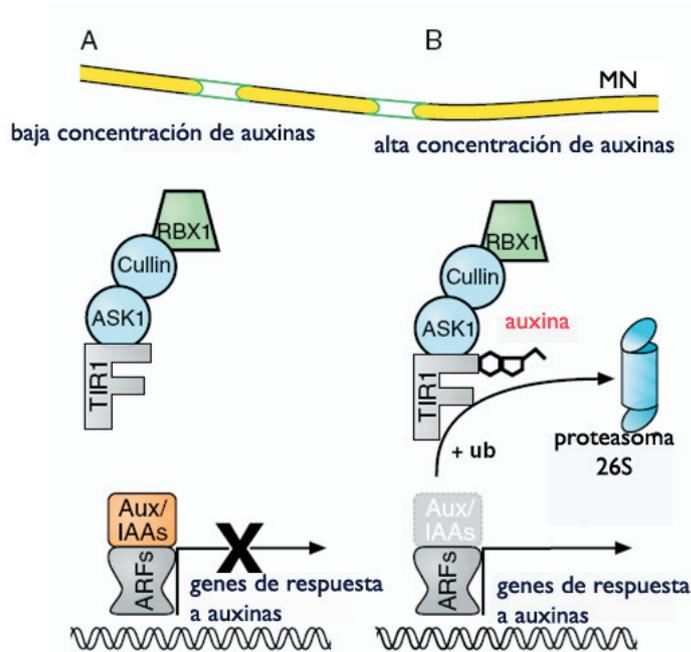


Figura 2. Mecanismo molecular de acción de las auxinas. (A) En presencia de bajas concentraciones de auxinas, la transcripción de genes de respuesta a auxinas a través de los factores de respuesta a auxinas ARF está bloqueada por las proteínas Aux/IAA, represores transcripcionales. (B) En Arabidopsis, el IAA se une a la proteína F-box TIR1, o a otras proteínas de tipo AFB que forman parte del complejo SCF^{TIR1} (RBX-Cullin-ASK1-TIR1 en la figura). La unión de auxina favorece la interacción de las proteínas Aux/IAA con SCF^{TIR1}, de manera que se promueve la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA, marcándolas para su destrucción en el proteasoma 26S, y eliminando la inhibición de las proteínas ARF. Membrana nuclear, MN; ubiquitinación, +ub. Adaptado de Bishopp *et al.* 2006.

Giberelinas.

El metabolismo de GAs se conoce con más detalle que el de auxinas, ya que se han identificado los enzimas que catalizan todos los pasos de la ruta de síntesis, así como los responsables de los primeros pasos del catabolismo. La biosíntesis se puede dividir en tres fases: 1) la biosíntesis de *ent*-kaureno en los proplastidios; 2) la conversión de *ent*-kaureno a GA₁₂ mediante citocromo P450 monooxigenasas microsomales, y 3) la formación de GAs de 20 y 19 átomos de carbono (C₂₀ y C₁₉) en el citoplasma (Olszewski *et al.* 2002). Se

han identificado numerosas GAs en plantas superiores, hongos y bacterias, pero sólo unas pocas son biológicamente activas (GA_1 , GA_3 , GA_4 y GA_7). Las demás son mayoritariamente intermediarios de la ruta o productos del catabolismo. La Figura 3 describe la ruta de biosíntesis que conduce a la formación de GA_1 y GA_4 . Los últimos pasos de la ruta de biosíntesis son los más importantes a nivel de regulación, y consisten en oxidaciones sucesivas, catalizadas por las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato GA 20-oxidadas (GA20OX) y GA 3-oxidadas (GA3OX), y dan lugar a GA_1 y GA_4 . Las GA 2-oxidadas (GA2OX) catalizan la 2β -hidroxilación que convierte a estas GAs en las formas inactivas GA_{34} y GA_8 . La cantidad de GAs bioactivas se puede modular regulando la velocidad de su síntesis y de su degradación. Este balance, además, está regulado por mecanismos de retroalimentación negativa

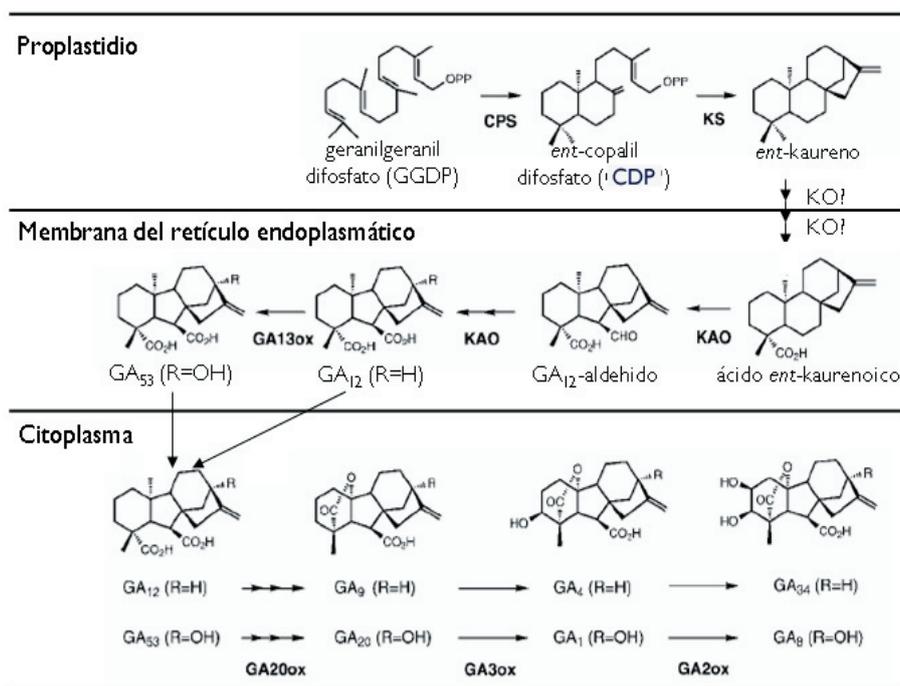


Figura 3. Ruta de biosíntesis de GAs. Los enzimas que catalizan las distintas reacciones están señalados en negrita, y los compartimentos subcelulares donde tienen lugar las reacciones se muestran a la izquierda de la figura. *ent*-copalil fosfato sintasa, CPS; *ent*-kaureno sintasa, KS; *ent*-kaureno oxidasa, KAO; GA 13-oxidasa, GA13ox; GA 20-oxidasa, GA20ox; GA 3-oxidasa, GA3ox; GA 2-oxidasa, GA2ox. Adaptado de Olszewski *et al.* 2002.

y positiva: la expresión de las *GA20ox* y *GA3ox* es regulada negativamente por GAs, mientras que la expresión de las *GA2ox* es inducida por GAs (Hedden y Phillips 2000, Olszewski et al. 2002). En *Arabidopsis*, las GA 20-oxididasas están codificadas por al menos 5 genes (*AtGA20ox1* a *AtGA20ox5*); las GA 3-oxididasas están codificadas por al menos 4 genes (*AtGA3ox1* a *AtGA3ox4*), y las GA 2-oxididasas están codificadas por al menos 7 genes (*AtGA2ox1* a *AtGA2ox8*, *AtGA2ox5* es un pseudogén) (Hedden et al. 2002, Schomburg et al. 2003).

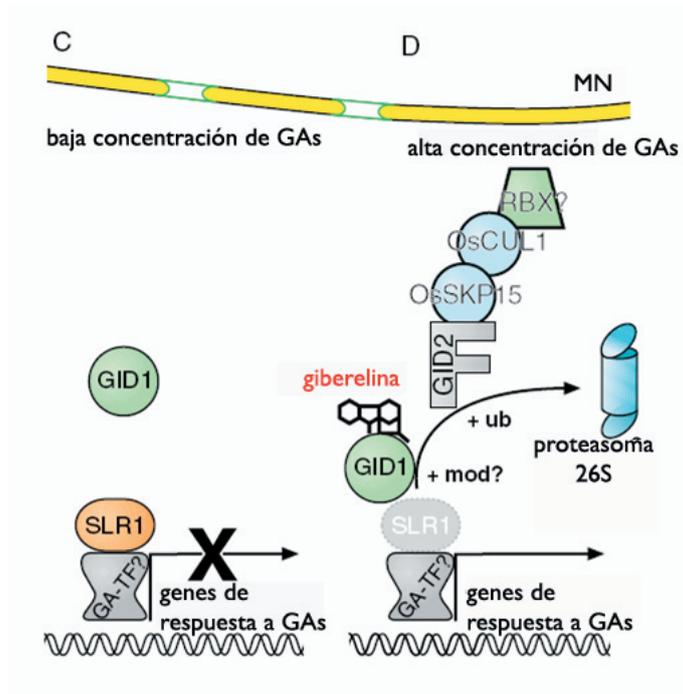


Figura 4. Mecanismo molecular de la acción de las GAs en arroz. (A) En presencia de bajas concentraciones de GAs, la proteína SLR1, probablemente formando un complejo con factores de transcripción dependientes de GAs, mantiene reprimida la expresión de los genes de respuesta a GAs. (B) En presencia de concentraciones elevadas de GAs, GA se une directamente al receptor GID1, y el complejo GID1-GA interacciona con SLR1. El complejo SCF^{GID2} es reclutado para ubiquitinar SLR1, lo que conduce a su degradación en el proteasoma. La degradación de SLR1 elimina la represión de los genes de respuesta a GAs. Factores de transcripción dependientes de GA, GA-TF; modificación desconocida, +mod; membrana nuclear, MN; homólogo 1 de Cullin en *Oryza sativa*, OsCUL1; homólogo 15 de ASK1 en *Oryza sativa*, OsSKP15; ubiquitinación, +ub. Adaptado de Bishopp et al. 2006.

La señalización por GAs también se basa, como en el caso de las auxinas, en la degradación de proteínas. El mecanismo molecular de esta señalización fue desentrañado inicialmente en arroz. Un receptor para GAs, GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1), se une, directamente y de manera dependiente de GAs, a SLENDER RICE1 (SLR1), un miembro de la familia DELLA de represores transcripcionales (Ueguchi-Tanaka *et al.* 2005). Las proteínas DELLA bloquean la transcripción dependiente de GAs de genes diana de las GAs, posiblemente de manera similar a la actuación de las Aux/IAA (Bishopp *et al.* 2006). A consecuencia de la unión de GID1, SLR1 es marcada para su degradación en el proteasoma, probablemente mediante el reclutamiento de un complejo SCF^{GID2} ubiquitina ligasa que incluya a la proteína GID2 (Sasaki *et al.* 2003, Gomi *et al.* 2004). La Figura 4 resume el mecanismo molecular que tiene lugar en la señalización por GAs.

En *Arabidopsis* hay tres genes ortólogos a GID1, denominados GID1a, GID1b y GID1c, que funcionan como receptores de GAs. En presencia de GAs, las tres proteínas GID1 se unen a las proteínas DELLA, y esta interacción aumenta la capacidad de unión de GID1 a GAs (Nakajima *et al.* 2006). Aguas abajo del receptor de GAs, se han identificado cinco genes DELLA, en contraste con arroz o cebada, especies en las que la familia DELLA tiene un solo miembro. Estos cinco genes codifican las proteínas GAI (GA-INSENSITIVE), RGA (REPRESSOR OF *gal-3*), RGA-LIKE 1 (RGL1), RGL2 y RGL3. RGA y GAI parecen ser los principales represores de la acción de las GAs durante el crecimiento vegetativo y la inducción floral, RGL2 desempeña un papel importante en la germinación de las semillas, y RGA, RGL1 y RGL2 modulan conjuntamente el desarrollo floral. La función que RGL3 desempeña durante el desarrollo todavía no se ha determinado claramente (Olszewski *et al.* 2002, Fleet y Sun 2005). En respuesta a GAs, las proteínas DELLA son rápidamente degradadas en el proteasoma (Sun y Gubler 2004). La proteína F-box que media esta degradación en *Arabidopsis* es SLEEPY1 (SLY1), que forma parte del complejo E3 ubiquitina ligasa SCF, y el complejo GID1-GA fomenta la interacción entre RGA y SLY1 (Griffiths *et al.* 2006). La proteína SPINDLY (SPY), una N-acetilglucosamina-O-transferasa que funciona también como regulador negativo de la acción de las GAs, supuestamente modifica y activa a las proteínas DELLA (Jacobsen y Olszewski 1993, Silverstone *et al.* 2006). Por último, se cree que el factor remodelador de cromatina PICKLE (PKL) actúa como regulador positivo de las respuestas a GAs (Fleet y Sun 2005). La Figura 5 muestra los componentes genéticos de esta ruta en plantas.

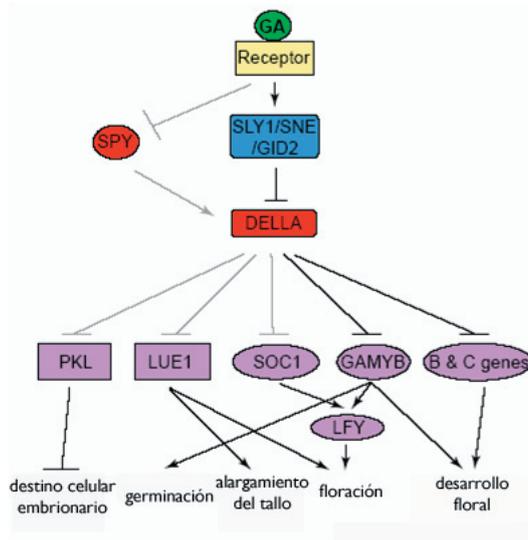


Figura 5. Componentes de la ruta de señalización por GAs en plantas, y procesos biológicos sobre los que actúan. Las elipses representan factores de transcripción, y las líneas grises, interacciones hipotéticas. Las flechas y las barras con forma de T indican activación o inhibición, respectivamente, sean directas o indirectas. Los genes B codifican PISTILLATA y APETALA3, el gen C de esta ruta codifica AGAMOUS. SLEEPY1, SLY1; SNEEZY, SNE; GA-INSENSITIVE DWARF2, GID2; SPINDLY, SPY; proteínas de la familia DELLA (RGA, GAI, RGLs, SLNI, SLR1 y demás homólogos), DELLA; PICKLE, PKL; LUCIFERASE SUPEREXPRESSOR 1, LUE1; SUPPRESSOR OF CONSTANS1, SOC1; factores de transcripción de tipo MYB dependientes de GA, GAMYB; LEAFY, LFY. Adaptado de Fleet y Sun 2005.

Interacción entre auxinas y giberelinas.

Las interacciones entre auxinas y GAs se han descrito en distintas especies y órganos. Las auxinas ejercen su efecto promotor del crecimiento de la raíz en *Arabidopsis* a través de la modulación de las respuestas a GAs, facilitando la degradación de las proteínas DELLA (Fu y Harberd 2003). Por otro lado, también se ha comprobado que las auxinas inducen la biosíntesis de GAs. La aplicación de ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) a pericarpos sin semillas de guisante induce tanto la biosíntesis de GAs activas (van Huizen et al. 1995) como la expresión de genes que codifican enzimas de la biosíntesis, como *PsGA20ox* (van Huizen et al. 1997) y *PsGA3ox1* (Ozga et al. 1999). Al decapitar plantas de guisante o tabaco, eliminando la fuente de auxinas, se observa una disminución de los niveles de GAs activas en el tallo, y estos niveles se recuperan al aplicar IAA (Ross et al. 2000, Wolbang y Ross 2001).

En guisante, la disminución de los niveles de GAs está acompañada por una regulación negativa de la expresión de *PsGA3ox1*, y un aumento de la expresión de *PsGA2ox1* (Ross *et al.* 2000).

Se ha comprobado que las auxinas también inducen la expresión de genes de biosíntesis de GAs en plántulas de *Arabidopsis*, y que parte de los efectos causados por una sensibilidad alterada frente a auxinas o por su superproducción se deben directamente a los cambios en el metabolismo de las GAs (Frigerio *et al.* 2006). En cuanto al desarrollo del fruto, la aplicación de GA₃ o auxinas induce partenocarpia, aunque los frutos obtenidos no alcanzan el tamaño de los frutos polinizados (Vivian-Smith y Koltunow 1999). El hecho de que auxinas y GAs estén implicadas en la fructificación, y sean capaces de inducir partenocarpia en *Arabidopsis* y otras especies, permite suponer que ambas regulen este proceso del desarrollo, de manera independiente o coordinada, bien sea en paralelo o secuencialmente.

Objetivos

La capacidad de inducir partenocarpia que muestran auxinas y giberelinas, así como su interacción en la regulación de numerosos procesos del desarrollo, plantea diversos interrogantes: ¿cuál es la función que estas dos hormonas desempeñan en la fructificación? Su actuación en este proceso, ¿es coordinada, o secuencial? Si es secuencial, ¿cuál es su secuencia de acción? Para responder a estas cuestiones se abordaron los siguientes objetivos:

1. Determinar, mediante tratamientos hormonales, la implicación de distintas fitohormonas en la fructificación en *Arabidopsis*.
2. Comprobar el efecto de auxinas y giberelinas sobre la biosíntesis o la señalización de la otra hormona, para averiguar si su acción es coordinada o secuencial.
3. Identificar dianas moleculares de la acción de las hormonas en la inducción del desarrollo del fruto en *Arabidopsis*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Para la realización de la mayor parte de este trabajo se utilizó el mutante *cer6-2* de *Arabidopsis thaliana* (Preuss *et al.* 1993, Fiebig *et al.* 2000), en el ecotipo *Landsberg erecta* (*Ler*). Las semillas se obtuvieron a través del Stock Center del *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) de la Universidad de Ohio State, EE. UU. (www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm). Para el análisis del efecto inductor de partenocarpia de GA₃, también se utilizaron pistilos procedentes de flores emasculadas de plantas silvestres Columbia 0 (*Col0*), *Ler* o *Landsberg (LER)*.

Los estudios de distribución de auxinas se realizaron utilizando una línea transgénica que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), con señal de localización al retículo endoplasmático, bajo la dirección del promotor sintético de respuesta a auxinas *DR5rev*, en el ecotipo *Col0* (*P_{DR5rev}:GFP*, Benková *et al.* 2003). Esta línea fue cedida por el Dr. Jiri Friml, de la Universidad de Tübingen.

Para analizar la función de las distintas proteínas de señalización por GAs en el proceso de fructificación se cruzaron distintos mutantes en genes de señalización por GAs con *cer6-2*. Los mutantes utilizados fueron: *gai-t6*, *gai-1*, *rga24*, *P_{RGA}:GFP-rgaΔ17*, *rgl1-1*, *rgl2-1*, *spy-5*, *sly1-10*, *gar2*. En la Tabla 2 se recoge la procedencia de estos mutantes.

La localización de la proteína RGA se llevó a cabo usando una línea transgénica que expresa una fusión traduccional de la proteína RGA de *Arabidopsis* a GFP en su extremo C-terminal, dirigida por el promotor endógeno del gen (*P_{RGA}:GFP-RGA*, Dill *et al.* 2001). Esta línea fue cedida por la Dra. Tai-Ping Sun, de la Universidad de Duke.

Tabla 2. Líneas transgénicas y mutantes utilizadas en este trabajo, y procedencia.

Línea	Ecotipo	Procedencia	Referencia
<i>cer6-2</i>	<i>Ler</i>	Stock Center	Preuss <i>et al.</i> 1993
<i>P_{DR5rev}:GFP</i>	<i>Col0</i>	Dr. J. Friml, U. Tübingen (Alemania)	Benková <i>et al.</i> 2003
<i>gai-1</i>	<i>Ler</i>	Stock Center	Koornneef <i>et al.</i> 1985
<i>gai-t6</i>	<i>Ler</i>	Dr. N. Harberd, John Innes Centre, Norwich (Reino Unido)	Peng <i>et al.</i> 1997

$P_{RGA}:GFP-rga\Delta17$	Ler	Dr. T-p Sun, U. Duke (EE. UU.)	Dill et al. 2001
<i>rga24</i>	Ler	Dr. N. Harberd, John Innes Centre, Norwich (Reino Unido)	Silverstone et al. 1998
<i>rgl1-1</i>	Ler	Dr. N. Harberd, John Innes Centre, Norwich (Reino Unido)	Lee et al. 2002
<i>rgl2-1</i>	Ler	Dr. R. Martienssen (Cold Spring Harbor Laboratory, EE. UU.)	Lee et al. 2002
<i>spy-5</i>	Ler	Stock Center	Wilson y Somerville 1995
<i>sly1-10</i>	Ler	Dr. T-p Sun, U. Duke (EE. UU.)	Steber et al. 1998
<i>gar2</i>	Ler	Dr. T-p Sun, U. Duke (EE. UU.)	Wilson y Somerville 1995
$P_{RGA}:GFP-RGA$	Ler	Dr. T-p Sun, U. Duke (EE. UU.)	Silverstone et al. 2001

Las plantas se cultivaron en fitotrones Sanyo Versatile Environment Test Chamber (Sanyo E&E Europe BV, Etten Leur, Países Bajos), en condiciones de día largo (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad), a 22°C, con una humedad controlada de aproximadamente el 50 %. Las plantas se cultivaron en una mezcla de turba:perlita:vermiculita 1:1:1, y se regaron con solución nutritiva (KNO_3 5 mM, KH_2PO_4 2.5 mM, $MgSO_4$ 4 mM, $Ca(NO_3)_2$ 2 mM).

Tratamientos hormonales

Salvo indicación contraria, los tratamientos se llevaron a cabo pulverizando la parte aérea de las plantas con soluciones GA_3 (gibberellic acid 3, Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Bajos) 330 μ M, 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, República Federal de Alemania) 10 μ M y NPA (naphthylphthalamic acid, Duchefa Biochemie) 50 μ M. Para determinar la concentración idónea de GA_3 se realizó una curva dosis-respuesta con concentraciones crecientes de GA_3 , de 3 a 333 μ M. Todas las soluciones contenían Tween-80 (Sigma Aldrich) al 0.05 %, y estaban ajustadas a pH 7. Para la comparación del efecto de las distintas GAs bioactivas, se realizaron

tratamientos con GA₁, GA₃ y GA₄, o mezclas dos a dos o de las tres GAs, aplicando directamente sobre el pistilo 2 µL de una solución 1 mM de la GA correspondiente. GA₁ y GA₄ fueron suministradas por el Dr. José Luis García-Martínez. Para todos los tratamientos, se utilizó como control una solución de Tween-80 al 0.05 % en agua, a pH 7.

En los casos en que fue necesario emasculas las flores antes del tratamiento, la emasculación se llevó a cabo un día antes de la antesis, y los tratamientos en el día correspondiente a la antesis. En estos casos los tratamientos se realizaron sumergiendo la inflorescencia en la solución hormonal.

Medida de los pistilos y frutos

Los pistilos y frutos obtenidos fueron fotografiados con una lupa Nikon SMZ1000 (Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp, Países Bajos), y las mediciones se realizaron escaneando los frutos sobre una hoja de acetato, y analizando las imágenes con el programa ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU., <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Tinción de callosa

Para visualizar el crecimiento de los tubos polínicos, se llevó a cabo una tinción de callosa de los pistilos, siguiendo el protocolo del laboratorio de la Dra. Daphne Preuss, de la Universidad de Chicago (<http://preuss.bsd.uchicago.edu/index3/html?content=protocols/protocols.html>). Las muestras se fijaron en ácido acético al 10% en etanol durante 2 horas. A continuación se maceraron en NaOH 1 M durante toda la noche. Se realizaron tres lavados con tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5, y se tiñó con azul de anilina 0.01 % disuelto en tampón fosfato de potasio 50 mM durante 5-10 minutos. Para visualizar las muestras, se transfirieron a portaobjetos, se añadió medio de montaje (tampón fosfato de potasio 50 mM con 50 % glicerol), y se observaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse 600 (Nikon Instruments Europe, B.V.), con iluminación ultravioleta.

Microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy, SEM)

Para la obtención de imágenes de microscopía electrónica de barrido, las muestras se congelaron en nieve de nitrógeno (N₂) y se acoplaron al portamuestras de un sistema de criotransferencia CT-1000c (Oxford Instruments, Oxford, Reino Unido) interconectado con un microscopio

electrónico de barrido JEOL JSM-5410. A continuación, las muestras fueron fracturadas y transferidas del portamuestras de congelación (*criostage*) al portamuestras del microscopio, en el que el agua superficial condensada se sublimó mediante calentamiento controlado a -85°C . Posteriormente, la muestra fue nuevamente transferida al portamuestras de congelación para recubrirla con oro mediante chisporroteo (*sputtering*). Finalmente, se devolvió la muestra al portamuestras del microscopio para visualizarla con un voltaje de aceleración de 10 keV, a entre 100 y 1000 aumentos.

Microscopía confocal

Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania), consistente en un microscopio invertido DMIR2 y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de láser (458 nm, 488 nm, 514 nm y 534 nm). La GFP se excitó con un láser de 488 nm, y su emisión se recogió entre 500 nm y 520 nm (máximo de emisión: 509 nm). La clorofila se excitó con el mismo láser, y su emisión se recogió entre 660 nm y 690 nm. La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda (λ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

Obtención de muestras para análisis de expresión génica

Para el estudio de los niveles de expresión de los genes del metabolismo de GAs, se trataron plantas *cer6-2* con GA_3 330 μM , 2,4-D 10 μM , NPA 50 μM o una solución control, y se recogieron pistilos y frutos al cabo de 4 y 24 horas. También se polinizaron pistilos manualmente con polen Ler, y se recogieron los frutos inmediatamente después de polinizar, y al cabo de 4, 8 y 12 horas. Para analizar la expresión de los genes en óvulos y pericarpos, se trataron plantas *cer6-2* con GA_3 330 μM , NPA 50 μM o una solución control, y 4 horas después de los tratamientos se diseccionaron los pistilos con un bisturí. Los óvulos se recogieron con una aguja hipodérmica, y los pericarpos libres de óvulos con pinzas.

Para los análisis transcriptómicos mediante micromatrices, se trataron plantas *cer6-2* con GA_3 330 μM , y se recogieron pistilos y frutos al cabo de 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas. También se recogieron pistilos de flores en antesis, no tratadas, a la misma hora del tratamiento, que se denominaron muestras de tiempo cero. Como controles del estrés provocado por el tratamiento, se trataron plantas con una solución control, y se recogieron pistilos al cabo

de 1 y 2 horas. Como controles de ritmo circadiano, se recogieron pistilos de flores en antesis no tratadas 4 y 8 horas después del momento en que se habría realizado el tratamiento. Todos los tratamientos hormonales y las polinizaciones manuales realizados para analizar niveles de expresión génica se llevaron a cabo 2 horas y media después del inicio del día en las cabinas de crecimiento, para evitar detectar variaciones de expresión debidas al ritmo circadiano, en vez de a los tratamientos.

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo utilizando el kit RNeasy[®] Plant Minikit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). El RNA se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

En las muestras que iban a ser utilizadas para qRT-PCR, se modificó el protocolo de extracción de RNA total, incluyendo un paso de eliminación del DNA genómico presente mediante tratamiento con 50 unidades Kunitz (Kunitz 1950) de DNase I (RNase-free DNase set, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) durante 15 minutos. Para sintetizar cDNA, se partió de 1 µg de RNA total, y se utilizó el kit SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA, EE. UU.). Las muestras de cDNA se diluyeron a un volumen de 80 µL (20 µL en el caso de las extracciones de óvulos y pericarpos por separado). En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar los distintos genes de metabolismo de GAs.

Las PCRs cuantitativas en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). El programa consistió en una atemperación de 2 minutos a 50°C, una desnaturalización de 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en una desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una elongación de 1 minuto a 60°C. Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 20 µL, con 1 µL de cDNA, 10 µL de SYBR[®] GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), y los dos oligos en concentración final 0.3 µM. Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas. Los niveles de expresión se calcularon en relación al nivel de expresión de ACT7 usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Applied Biosystems). Todos los análisis de expresión por qRT-PCR se realizaron sobre al menos dos réplicas biológicas, obteniéndose resultados similares. Los resultados que se muestran corresponden a una sola réplica significativa.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cDNA de genes del metabolismo de GAs.

Gen	Código MIPS	oligo	secuencia	referencia
GA20ox1	At4g25420	20ox1 F	CTCCATCAACGTTCTCGAGC	Curaba et al. 2004
		20ox1 R	GGTTTTGAAGGTCGATGAGAGG	
GA20ox2	At5g51810	20ox2 F	AGAAACCTTCCATTGACATTCCA	Curaba et al. 2004
		20ox2 R	AGAGATCGATGAACGGGACG	
GA20ox3	At5g07200	20ox3 F	ACTCGTCTCAAAGGCTGCAAC	Curaba et al. 2004
		20ox3 R	GAGGCTCTCATCGACACCATG	
GA20ox4	At1g60980	20ox4 F	CTATCCAAAATGCAAGCAACCA	Frigerio et al. 2006
		20ox4 R	CAGTGAGGCCCCGTACCTAGT	
GA20ox5	At1g44090	20ox5 F	GCCACCCCATGTTGTTGAAG	Frigerio et al. 2006
		20ox5 R	CGATGGTTGCCTAGCCTTGA	
GA3ox1	At1g15550	3ox1 F	GATCTCCTTCTCCGCTGCT	Curaba et al. 2004
		3ox1 R	GAGGGATGTTTTACCGGTG	
GA3ox2	At1g80340	3ox2 F	CTGCCGCTCATCGACCTC	Curaba et al. 2004
		3ox2 R	AGCATGGCCCACAAGAGTG	
GA3ox3	At1g80330	3ox3 F	GATCACACCAAGTACTGCGGTATAA	Curaba et al. 2004
		3ox3 R	TTCCATTTTCGTCACGTATTCTT	
GA3ox4	At4g21690	3ox4 F	CGCTACACTTTATGGCCCG	Curaba et al. 2004
		3ox4 R	TCCATCACATTGCAGAACTCG	
GA2ox1	At1g78440	2ox1 F	CCAAGTCTTCTCAAAGCCCG	Curaba et al. 2004
		2ox1 R	GTA CTCTTCCAATGCGTTTCTGAA	
GA2ox2	At1g30040	2ox2 F	GGTTCCGTTTCTCACTTCCC	Curaba et al. 2004
		2ox2 R	GGATCGGCTAGGTTGACGAC	
GA2ox3	At2g34555	2ox3 F	AGCCAGCCAGTTTTGATAGCA	Curaba et al. 2004
		2ox3 R	GCGGTTTGCATTTTGGATTAAC	
GA2ox4	At1g47990	2ox4 F	CTTTGCTAAACCGGCTCACG	Frigerio et al. 2006
		2ox4 R	GGCTGGTTAACTGGTCGGAC	
GA2ox6	At1g02400	2ox6 F	GATCCTTTCAAGTTCAGCTCGG	Curaba et al. 2004
		2ox6 R	TCTAACCGTGCGTATGTAATCATTC	
GA2ox7	At1g50960	2ox7 F	ATGGACAATGGATCAGCGTAAA	Frigerio et al. 2006
		2ox7 R	TGTTGACTGTAAGGGCTTCCAA	
GA2ox8	At4g21200	2ox8 F	CATGGAGCAATGGCATGTACA	Frigerio et al. 2006
		2ox8 R	GGTTCGTCATCACACGGTGTT	
ACT7	At5g09810	ACT7 F	CAGTGTCTGGATCGGAGGAT	Hall et al. 2003
		ACT7 R	TGAACAATCGATGGACCTGA	

Amplificación y marcaje de RNA para hibridación de micromatrices

El RNA total se amplificó utilizando el kit MessageAmp™ II aRNA Kit (Ambion Inc., Austin, TX, EE. UU.). Se introdujeron algunas modificaciones en el protocolo propuesto por el fabricante, fundamentalmente reduciendo a la mitad las cantidades de reactivos y enzimas utilizadas. Brevemente, 1.5 µg RNA se hibridaron con oligonucleótidos oligo(dT) con una cola con la región de unión del promotor de la T7 RNA polimerasa. Se retrotranscribió a cDNA de simple cadena con la enzima ArrayScript™ a 42°C, se sintetizó la segunda hebra de cDNA con una DNA polimerasa a 16°C, y se transcribió el cDNA durante toda la noche a 37°C utilizando T7 RNA polimerasa, e incorporando nucleótidos UTP modificados con un grupo aminoalil. El RNA amplificado (aRNA) se purificó, y a continuación se marcaron 7.5 µg con fluoróforos Cy3 y Cy5 (Cy™Dye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham/GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido), por reacción del grupo aminoalil del UTP con el éster del fluoróforo, durante 1 hora a pH 9. Tanto la amplificación como el marcaje se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

Hibridación de las micromatrices

Las micromatrices empleadas en este trabajo fueron las micromatrices de oligonucleótidos largos (70-mer) imprimidas en la Universidad de Arizona (<http://ag.arizona.edu/microarray/>) con el set de oligos de Qiagen-Operon Arabidopsis Genome Array Ready Oligo Set (AROS) Version 1.0. Estas micromatrices, de 26000 elementos, cubren la práctica totalidad del genoma de Arabidopsis.

Para la hibridación de las micromatrices se utilizó una mezcla equimolar de todas las muestras individuales (mezcla de referencia), que se marcó con uno de los fluoróforos, enfrentada a cada una de las muestras individuales, marcada con el otro fluoróforo. Se realizaron dos réplicas biológicas independientes, con dos réplicas técnicas cada una, para las que se intercambié el fluoróforo con el que se marcaba cada muestra a comparar (*dye-swap*).

La hibridación manual de las micromatrices se realizó siguiendo este protocolo: primero, las micromatrices se hidrataron, exponiéndolas 3 veces a vapor de agua a 65°C durante 5 segundos, y a continuación se entrecruzaron por irradiación ultravioleta (UV) 65 mJ en un UV Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla CA, EE. UU.). Las micromatrices se lavaron 2 veces con SDS 0.2x y 4 veces con agua MilliQ, y se secaron por centrifugado a

2000 rpm. Seguidamente, se prehibridaron durante 30 minutos a 42°C con solución de prehibridación (BSA 1 %, SSC 6x, SDS 0.5 %). A continuación se lavaron de nuevo con agua MilliQ y se secaron por centrifugación. Las micromatrices se hibridaron durante toda la noche a 37°C, con solución de hibridación: aproximadamente 250 pmol de cada uno de los fluoróforos, formamida desionizada 50 %, SSC 6x, Denhardt's 5x, SDS 0.5 %. La solución de hibridación se desnaturalizó durante 5 minutos a 95°C, y se inyectó entre la micromatriz y un cubreobjetos LifterSlip™ (Erie Scientific, Portsmouth NH, EE. UU.). Tras la hibridación, las micromatrices se lavaron con SSC y SDS en concentraciones decrecientes, se secaron mediante centrifugado a 2000 rpm, y se escanearon en un escáner Genepix 4000B (Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale CA, EE. UU.).

El análisis de las imágenes se realizó utilizando el software Genepix ® 4.0 (Axon Instruments/Molecular Devices), y para el análisis estadístico se utilizaron los programas Acuity ® 4.0 (Axon Instruments/Molecular Devices), Significance Analysis of Microarrays (SAM, <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>, Tusher *et al.* 2001), y FatiGO+ (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/tools.cgi>, Al-Shahrour *et al.* 2005, Al-Shahrour *et al.* 2006).

Resultados

I. Modelo experimental para el estudio de la fructificación: el mutante *cer6-2*.

Se ha descrito desde hace tiempo que la aplicación exógena de hormonas (Gustafson 1936, Gustafson 1937, Nitsch 1950, García-Martínez y Carbonell 1980, Alabadí *et al.* 1996) o de inhibidores de su transporte (Beyer y Quebedeaux 1974) puede inducir partenocarpia en diversas especies. En *Arabidopsis* se han obtenido frutos partenocárpicos mediante aplicación de GAs, auxinas y citoquininas (Vivian-Smith y Koltunow 1999). Para estudiar el desarrollo de frutos partenocárpicos es necesario evitar la fertilización de los óvulos. Esto se puede conseguir emasculando las flores (es decir, eliminando las anteras), o utilizando mutantes estériles, o de esterilidad condicional (Bowman *et al.* 1989, Guerineau *et al.* 2003). En este trabajo se ha utilizado el mutante *cer6-2* de *Arabidopsis thaliana*, un mutante de esterilidad masculina condicional (Preuss *et al.* 1993, Fiebig *et al.* 2000), cuyas flores presentan



Figura 6. Inflorescencia del mutante *cer6-2* en fondo Ler de *Arabidopsis thaliana*.

morfología normal (Figura 6). Si se cultivan las plantas mutantes en condiciones de humedad ambiental baja (en torno al 50 %), no hay fructificación, mientras que en condiciones de humedad alta, los óvulos son fertilizados, y se obtienen frutos normales con semillas (Preuss *et al.* 1993, Fiebig *et al.* 2000).

La capacidad de auxinas y GAs de inducir partenocarpia en *Arabidopsis* ha sido descrita anteriormente en plantas silvestres emasculadas. Para comprobar el efecto de las distintas hormonas en el mutante *cer6-2*, se

realizaron tratamientos con la giberelina activa GA_3 , la auxina natural IAA, y las auxinas sintéticas NAA y 2,4-D. Se analizó también el efecto del inhibidor del transporte polar de auxinas NPA, así como la capacidad del polen

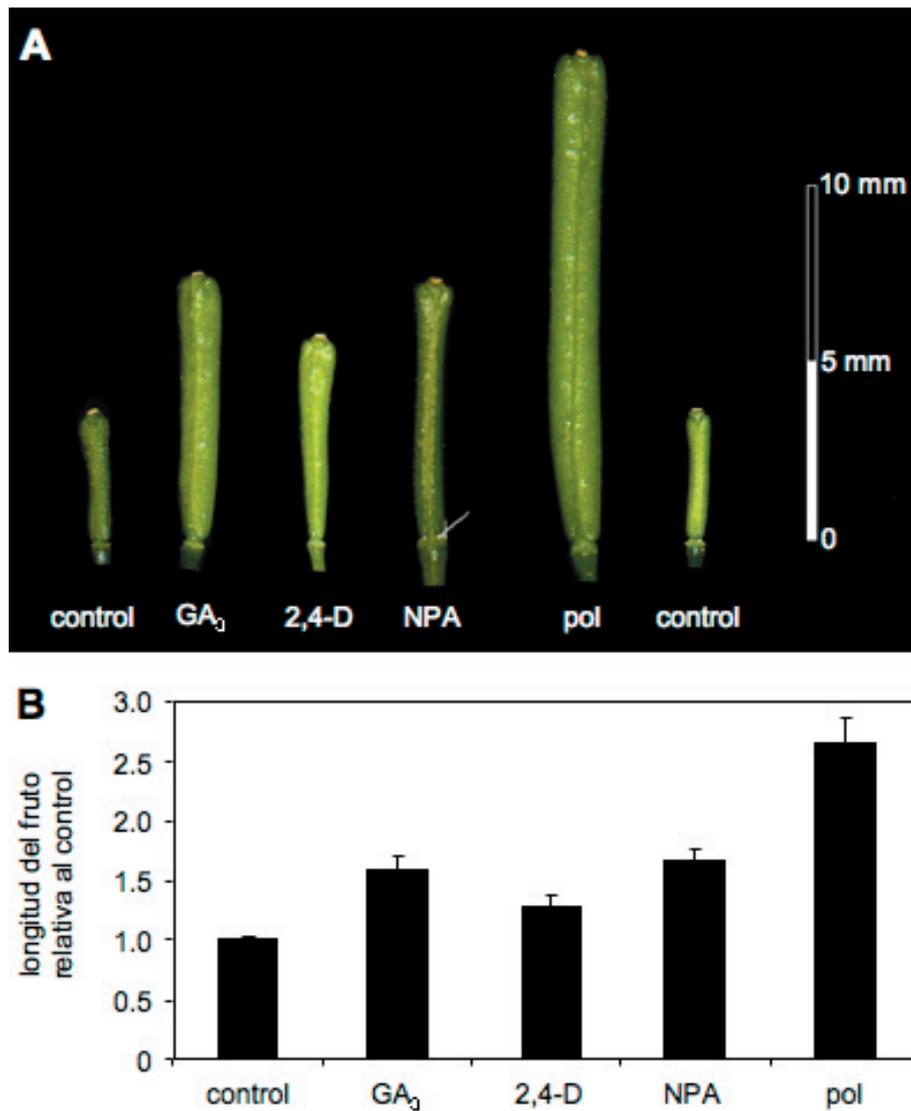


Figura 7. Efecto de los tratamientos hormonales como inductores de fructificación en el mutante *cer6-2*. Los pistilos de flores en antesis fueron tratados con una solución control, GA_3 330 μ M, 2,4-D 10 μ M, o NPA 50 μ M, o polinizados con polen Ler (pol). Los pistilos y frutos fueron fotografiados (A) y la longitud fue cuantificada (B) a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar.

silvestre Ler de inducir fructificación. Los frutos fueron fotografiados (Figura 7A) o medidos (Figura 7B) 7 días después del tratamiento. Tanto GA_3 como 2,4-D fueron capaces de inducir el desarrollo de frutos partenocárpicos, aunque sin mimetizar en ningún caso el efecto de la polinización (Figura 7). Resulta interesante que el bloqueo del transporte polar de auxinas mediante tratamiento con NPA, no utilizado anteriormente en *Arabidopsis*, tuvo el mismo efecto que la aplicación de la auxina 2,4-D: se indujo el desarrollo de frutos partenocárpicos (Figura 7). En cambio, al contrario de lo que se ha descrito previamente (Vivian-Smith y Koltunow, 1999), IAA y NAA no indujeron desarrollo partenocárpico del fruto (datos no mostrados).

Para determinar la concentración de GA_3 más efectiva en la inducción del desarrollo de frutos partenocárpicos se realizó una curva dosis-respuesta, tratando plantas *cer6-2* con concentraciones crecientes de GA_3 , desde 3 hasta 333 μM . La Figura 8A muestra los resultados: con una concentración de 333 μM se conseguía inducir la formación de frutos de mayor tamaño. Por otra

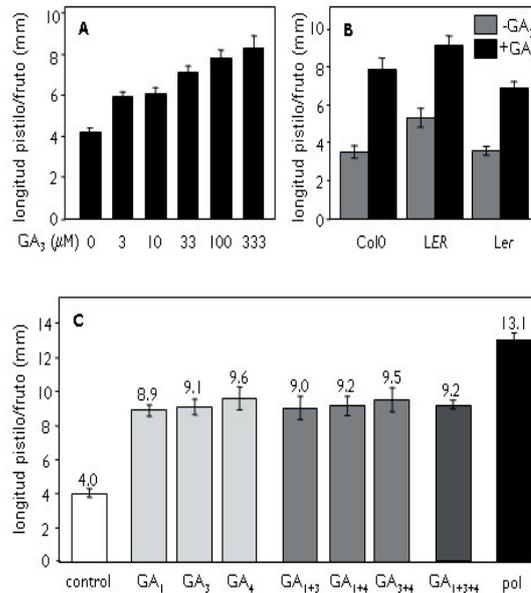


Figura 8. Análisis del efecto de GAs activas sobre la inducción de partenocarpi en *Arabidopsis thaliana*. (A) Curva dosis-respuesta de GA_3 como inductor del desarrollo del fruto en *cer6-2*. (B) Efecto de GA_3 330 μM como inductor del desarrollo del fruto en Col0, Ler y Ler. (C) Efecto de distintas GAs bioactivas (GA_1 , GA_3 , GA_4) y sus mezclas sobre la inducción de partenocarpi en *cer6-2*. En todos los casos, el tratamiento se realizó sobre flores en antesis, pulverizando la parte aérea de las plantas, y los pistilos y frutos se midieron 7 días después.

parte, se comparó también el efecto de los tratamientos con GA₃ en distintos ecotipos silvestres: Col0, Ler y LER. Los resultados de estos tratamientos se muestran en la Figura 8C: los pistilos de plantas LER son ligeramente mayores que los de plantas Col0 o Ler, pero la capacidad de respuesta a GA₃ es muy parecida en estas tres accesiones. Por último, se comparó la capacidad de inducir desarrollo del fruto de distintas GAs bioactivas: la GA bioactiva comercial GA₃, que es la que se utiliza de manera más extendida, y GA₁ y GA₄. Se realizaron tratamientos con cada una de ellas, o con mezclas, en plantas *cer6-2*, y los frutos obtenidos fueron medidos al cabo de 7 días. En la Figura 8C se muestra que el efecto de estas tres GAs es prácticamente idéntico, y que la utilización de mezclas de dos de ellas o de las tres a la vez tampoco aumentó la eficacia del tratamiento. Por ello, en adelante se realizaron siempre los tratamientos con GA₃ 330 µM.

Para poder definir los puntos temporales de interés para el estudio del desarrollo del fruto inducido por polinización, es necesario saber cuántas horas requiere el tubo polínico para alcanzar los óvulos y fertilizarlos. Se conoce cuál es la evolución temporal de este proceso en el ecotipo Col0 (Fauré *et al.* 2002). Para comprobar si en *cer6-2* el tubo polínico avanza al mismo ritmo, y cuántas horas son necesarias para que los óvulos sean fertilizados, se llevó a cabo una tinción de callosa, que permite visualizar el polen y los tubos polínicos avanzando por el interior del pistilo. Se polinizaron manualmente pistilos de flores de *cer6-2* en antesis, emasculados un día antes de la antesis, con polen silvestre Ler. Se recogieron muestras a intervalos de 2 horas entre 4 y 24 horas después de polinizar, y se tiñeron con azul de anilina. En la Figura 9 se muestran los resultados de la tinción: a las 4 horas de la polinización manual, los tubos polínicos tan sólo han llegado a atravesar el estilo. Al cabo de 6 horas se aprecia que los primeros óvulos ya han sido alcanzados, y a las 8 horas los tubos polínicos han entrado en casi todos los óvulos. Los óvulos más basales están ya todos fertilizados a las 10 o 12 horas de la polinización.

2. Procesos de diferenciación durante la fructificación.

Para averiguar si los distintos tratamientos hormonales actúan de la misma manera, y de la misma manera que la polinización, se analizó el efecto que provocan, a nivel de división, expansión o diferenciación celular, en los distintos tejidos que forman los frutos. Para ello se realizaron criosecciones, que se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (*cryo-sem*). Se estudiaron frutos obtenidos mediante polinización o tratamiento con GA₃, 2,4-D o NPA, y pistilos tratados con una solución control. Los tratamientos

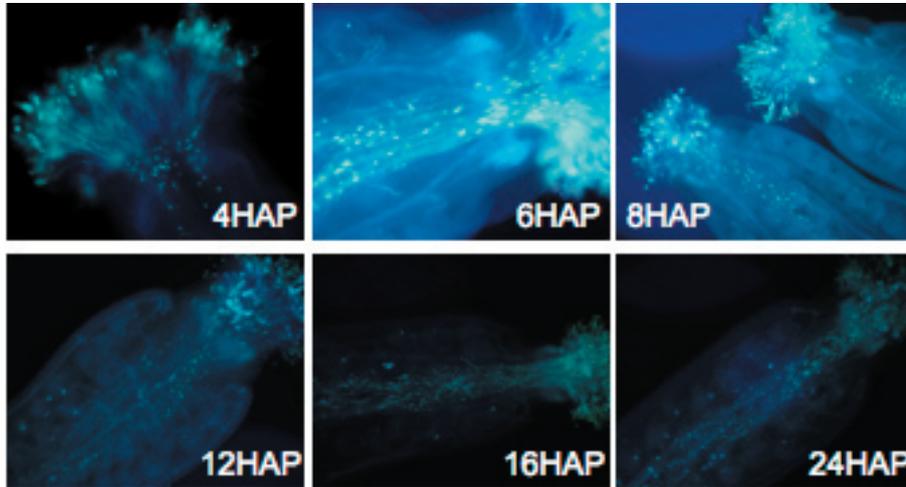


Figura 9. Evolución temporal del avance del tubo polínico en *cer6-2*. Tinciones de callosa con azul de anilina de pistilos procedentes de flores de *cer6-2* emasculadas un día antes de la antesis, y polinizadas manualmente con polen silvestre *Ler* en el día de antesis. Los pistilos fueron fijados y teñidos entre 4 y 24 horas después de la polinización manual (HAP), y visualizados en un microscopio de fluorescencia, iluminados con luz UV.

se realizaron siempre en el día de antesis, y el análisis por *cryo-sem* se llevó a cabo 7 días después de la antesis. Los pistilos de *cer6-2* tratados con una solución control presentaron la organización en capas descrita previamente (Figura 1): una capa de células de exocarpo, tres capas de células de mesocarpo, una capa de células de endocarpo *b*, y una capa de células de endocarpo *a* (Figura 10). Para mayor claridad, se han coloreado las diferentes

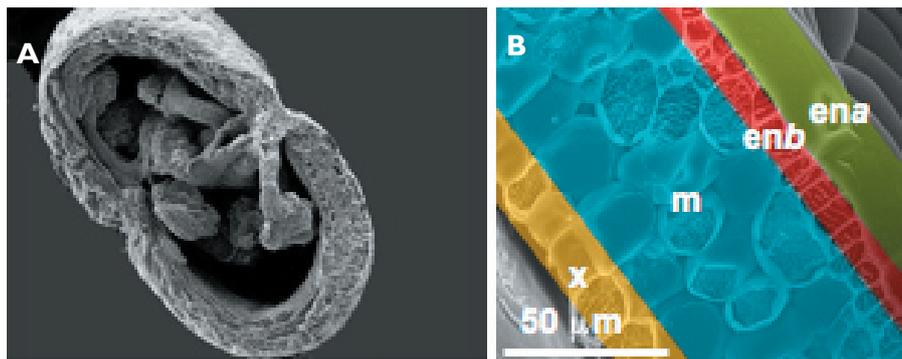


Figura 10. Crio-sección transversal de pistilos y frutos *cer6-2*. (A) Crio-sección de un pistilo tratado con solución control, en el día de la antesis, a los 7 días del tratamiento. (B) Detalle de un pistilo tratado con solución control, 7 días después del tratamiento. Las crio-secciones se obtuvieron según se describe en Materiales y métodos. Se han coloreado las distintas capas celulares que conforman el pericarpo para mayor claridad: Endocarpo *a*, en *a*; endocarpo *b*, en *b*; mesocarpo, *m*; exocarpo, *x*.

capas en la figura, y en las figuras siguientes se identifican las distintas capas con líneas de los mismos colores.

Tanto las silicuas procedentes de pistilos polinizados como los frutos partenocárpicos obtenidos mediante tratamiento con auxinas o NPA presentaron la misma organización en capas que los pistilos control (Figura 11). En los frutos polinizados, todos los tipos celulares presentaron elongación,

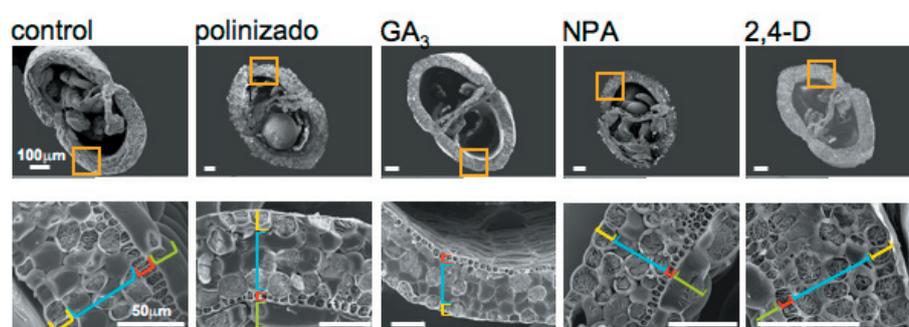


Figura 11. Criosecciones transversales de pistilos y frutos de *cer6-2*. Pistilos de flores en anthesis fueron tratados con solución control, tratados con GA_3 330 μ M, NPA 50 μ M, o 2,4-D 10 μ M, o polinizados manualmente con polen Ler. Las imágenes se tomaron 7 días después del tratamiento. Las imágenes de la fila superior muestran criosecciones completas del pistilo o fruto, mientras que en las imágenes de la fila inferior se muestra una ampliación de los detalles de la pared de la valva, recuadrados en las imágenes superiores. Las capas celulares están identificadas con los mismos colores que en la Figura 10.

mientras que las células del endocarpo *b* se ensancharon considerablemente. En los frutos obtenidos mediante tratamiento con NPA, en cambio, sólo las células del endocarpo *a* se expandieron, mientras que las células del mesocarpo presentaron un tamaño menor que en el control. En los frutos procedentes del tratamiento con 2,4-D, todos los tipos celulares mostraron un tamaño menor que en los pistilos tratados con solución control. Los frutos obtenidos tratando con GA_3 también mostraron un mayor tamaño celular, pero se apreció un colapso de las células del endocarpo *a*. Las células de todas las capas presentes en estos frutos mostraron un mayor tamaño, lo que sugiere que el crecimiento del fruto se podría deber fundamentalmente a la expansión de los diferentes tipos celulares.

La desaparición del endocarpo *a* se ha descrito en frutos polinizados en estadios posteriores de desarrollo, próximos a las etapas finales de maduración de la silicua (Ferrándiz *et al.* 1999), así como en pistilos no fertilizados de 10-12 días después de anthesis (P. Carbonell, resultados no publicados), pero no

en frutos partenocárpicos obtenidos mediante tratamiento con GA_3 . De hecho, Vivian-Smith y Koltunow (1999) describieron la estructura de este tipo de frutos, sin colapso del endocarpo. La diferencia con estos datos publicados podría deberse a la mutación *cer6-2*. Para descartar esta posibilidad, se repitieron todos los tratamientos en pistilos de flores emasculadas de plantas silvestres *Ler*. Las flores se emascularon un día antes de la antesis, se trataron en el día correspondiente a la antesis, y se analizaron por *cryo-sem* siete días después. Los resultados obtenidos fueron los mismos que en el mutante *cer6-2* (Figura 12): no hubo alteración en las capas celulares presentes en los frutos obtenidos por polinización o tratamiento con NPA o 2,4-D, comparados con los pistilos control, mientras que en los frutos obtenidos mediante aplicación de GA_3 el endocarpo α desapareció. Este resultado indica que el efecto de GA_3 en el adelanto en el colapso del endocarpo α no se debe a la mutación *cer6-2*.

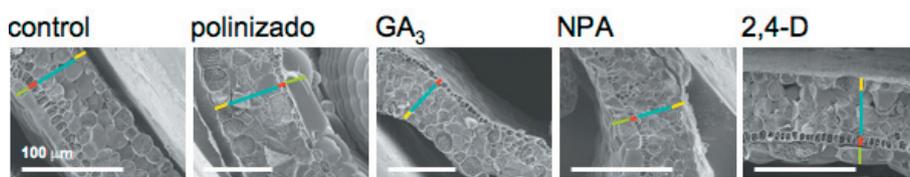


Figura 12. Criosecciones transversales de pistilos y frutos *Ler*. Las flores se emascularon un día antes de antesis y se trataron con solución control, GA_3 330 μ M, NPA 50 μ M, o 2,4-D 10 μ M, o se polinizaron manualmente con polen *Ler*. Las imágenes se tomaron 7 días después del tratamiento. Las capas celulares están identificadas con los mismos colores que en la Figura 10.

Otra posible causa de la discrepancia con los datos publicados podría ser la solución de GAs utilizada. Es posible que la presencia de otras sustancias, como otras giberelinas activas o auxinas, en la solución de GA_3 pueda provocar la persistencia del endocarpo. Para comprobar esta posibilidad, se trataron plantas *cer6-2* y *Ler* con mezclas de GA_3 y 2,4-D. En ambos genotipos se obtuvo el mismo resultado (Figura 13): el endocarpo α desapareció, por colapso de las células. Por lo tanto, la presencia de auxinas en la solución de GAs no contrarresta el colapso del endocarpo α .

Una última explicación justificaría la discrepancia con los resultados publicados. Se ha descrito que la fructificación inducida por polinización desencadena el colapso del endocarpo α a tiempos más largos, y es posible que GA_3 sea capaz de acelerar la desaparición de esa capa celular. La discrepancia con los resultados de Vivian-Smith y Koltunow podría deberse a

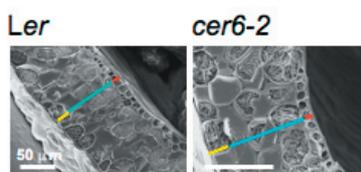


Figura 13. Criosecciones transversales de frutos Ler o *cer6-2*, 7 días después de un tratamiento combinado con GA₃ 330 μM y 2,4-D 10 μM. Las flores de plantas Ler se emascularon un día antes de antesis. Las capas celulares están identificadas con los mismos colores que en la Figura 10.

alguna diferencia en la escala de tiempos para llevar a cabo las emasculaciones y/o los tratamientos. Además, en los frutos obtenidos por tratamiento con GA₃ se apreció alguna célula del endocarpo *a* que aún estaba intacta, al igual que en los frutos obtenidos por polinización o por tratamiento combinado con GA₃ y 2,4-D (Figura 14).

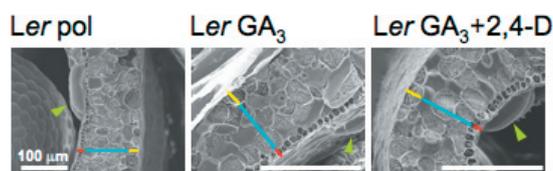


Figura 14. Criosecciones transversales de frutos Ler 7 días después de la polinización manual con polen Ler o de un tratamiento con GA₃ 330 μM, o de un tratamiento combinado con GA₃ 330 μM y 2,4-D 10 μM. Las capas celulares están identificadas con los mismos colores que en la Figura 10. Las puntas de flecha verdes indican células del endocarpo *a* que aún no han colapsado.

3. Análisis espacio-temporal de la relación entre auxinas y giberelinas.

Tanto auxinas como GAs son capaces de desencadenar la fructificación, aunque su efecto a nivel de diferenciación celular es ligeramente diferente. Hay dos posibilidades en cuanto a su mecanismo de acción: que las auxinas y las GAs actúen en paralelo, de manera independiente, o que lo hagan dentro de una jerarquía temporal. Para distinguir entre estas dos opciones, se analizó el patrón espacio-temporal de la acción de estas dos hormonas durante la fructificación.

3.1. Localización de la síntesis y acción de las auxinas.

Los niveles endógenos de auxinas son muy reducidos, lo que dificulta su medida directa. Para poder cuantificar auxinas es necesario disponer de grandes cantidades de tejido, lo que resulta complejo en especies de porte pequeño como *Arabidopsis*, y especialmente en tejidos específicos de tamaño reducido. Una alternativa para identificar los patrones de distribución de auxinas es la utilización de herramientas genéticas, como plantas transgénicas portadoras del promotor sintético de respuesta a auxinas *DR5* (Ulmasov et al. 1997) fusionado a proteínas deladoras como GUS o GFP.

Este promotor ha sido validado semicuantitativamente como indicador de la concentración de auxinas en distintos tejidos (Sabatini et al. 1999, Friml et al. 2002), y es aceptado ampliamente como un indicador fiable de dicha concentración. En este trabajo se han utilizado plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la proteína GFP bajo el control del promotor *DR5rev* ($P_{DR5rev}:GFP$, Benková et al. 2003) para monitorizar cambios en los niveles de auxinas después de la antesis del pistilo y durante las primeras fases del desarrollo del fruto, después de inducir fructificación mediante polinización o tratamientos exógenos de hormonas o NPA.

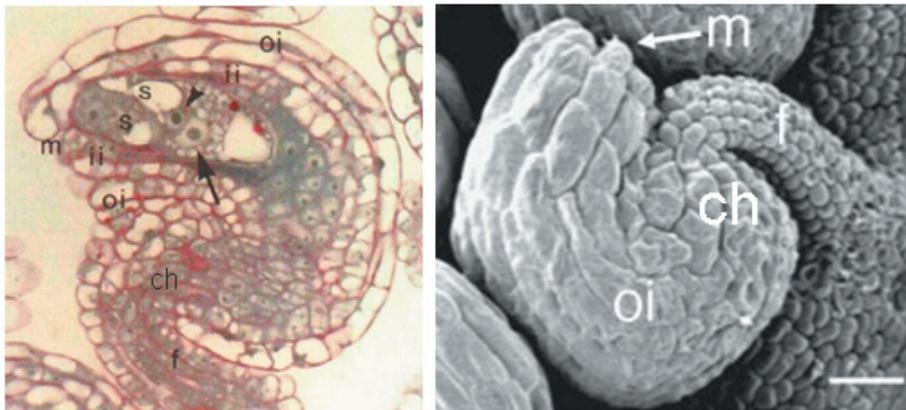


Figura 15. Organización interna del óvulo de la flor en antesis en *Ler*, mostrado mediante sección ultrafina en resina (A) o microscopía electrónica de barrido (B) de un óvulo. Barra de escala: 200 μ m. Integumentos externos (outer integuments), oi; integumentos internos (inner integuments), ii; sinérgida, s; micropilo, m; funículo, f; chalaza, ch. Adaptado de Robinson-Beers et al. 1992 (A) y Gasser et al. 1998 (B).

La Figura 15 muestra la organización tisular de los óvulos de flores en antesis de plantas silvestres Ler. Los pistilos no fertilizados de *Arabidopsis* mostraron señal de GFP en la vasculatura del funículo, y una señal menos intensa en torno a los haces vasculares del pericarpo (Figuras 16 control y 17 control). Este patrón espacial de distribución de auxinas es similar al de otros tejidos no reproductivos, como las hojas, en los que se aprecia una clara asociación de las auxinas a la vasculatura (Mattsson *et al.* 2003, Cheng *et al.* 2006), lo que concuerda con el hecho de que las hojas y los carpelos comparten un origen evolutivo común (Gillaspy *et al.* 1993, Balanzá *et al.* 2006). A las 24h de inducir la fructificación mediante tratamiento con 2,4-D se observó un fuerte aumento de la expresión de GFP dirigida por el promotor *DR5*, tanto en los óvulos (Figura 16 2,4-D) como en el pericarpo (Figura 17 2,4-D). En los óvulos esta expresión quedó fundamentalmente restringida al funículo, la chalaza y el micropilo, mientras que en el pericarpo la señal apareció ectópicamente en todo el tejido. Esta activación del promotor *DR5* podría reflejar simplemente la presencia del 2,4-D en el tejido, o también podría implicar que el tratamiento con 2,4-D induce acumulación de auxinas.

La polinización del pistilo desencadenó un aumento en la señal de GFP en la misma zona de los óvulos que en el tratamiento con 2,4-D, lo que indicaría una acumulación de auxinas en el funículo, la chalaza y el micropilo de los óvulos fertilizados (Figura 16 pol). En cambio, no hubo incremento de la señal de GFP, y por tanto acumulación de auxinas, en el pericarpo de los pistilos polinizados (Figura 17 pol). Este resultado indica que los óvulos son el órgano fisiológicamente relevante para el papel de las auxinas en la fructificación.

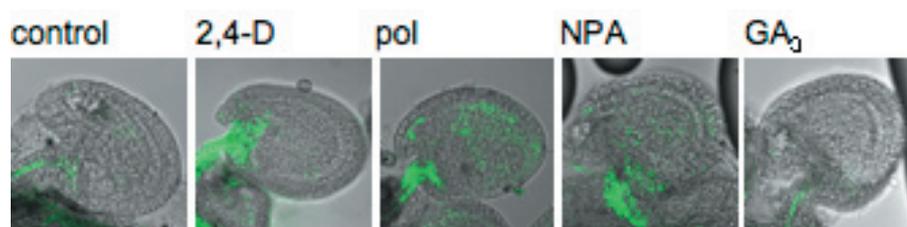


Figura 16. Expresión de $P_{DR5rev}::GFP$ en los óvulos. Las flores de plantas transgénicas $P_{DR5rev}::GFP$ fueron emasculadas 1 día antes de la antesis, tratadas con solución control, GA_3 330 μM , 2,4-D 10 μM o NPA 50 μM , o polinizadas manualmente en el día de antesis, y visualizadas por microscopía confocal 24 horas después del tratamiento. Las imágenes corresponden a tejido fresco no fijado (*whole-mount*) de óvulos, y son la superposición de la imagen confocal (verde) de la señal correspondiente a $DR5rev::GFP$ con la imagen visible del óvulo.

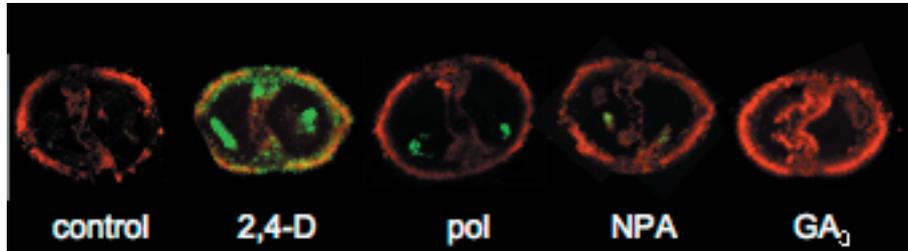


Figura 17. Expresión de $P_{DR5rev};GFP$ en el pericarpio de los pistilos y frutos. Las flores de plantas transgénicas $P_{DR5rev};GFP$ fueron emasculadas 1 día antes de la antesis y tratadas con solución control, GA_3 330 μM , 2,4-D 10 μM o NPA 50 μM , o polinizadas manualmente con polen Ler en el día de antesis, y visualizadas por microscopía confocal 24 horas después del tratamiento. Las imágenes corresponden a secciones transversales del pistilo o fruto. La señal fluorescente de GFP aparece en verde, y la autofluorescencia de la clorofila en rojo.

En los frutos obtenidos mediante tratamiento con NPA se observó el mismo patrón de expresión de GFP que en los frutos polinizados: se detectó un aumento de la fluorescencia asociada a GFP en los óvulos, que indicaría una acumulación de auxinas, fundamentalmente en el funículo y la chalaza (Figura 16 NPA), pero no hubo cambios en los niveles de expresión de GFP en el pericarpio (Figura 17 NPA). Este resultado corrobora la importancia fisiológica de los óvulos para la señalización por auxinas en el proceso de fructificación. Además, también sugiere que la inducción de la síntesis de auxinas en los óvulos podría ser el primer evento molecular desencadenado por la fecundación, lo que situaría a las auxinas en un paso previo a las GAs en la cascada de señalización hormonal desencadenada tras la fructificación. Por otra parte, este resultado parece indicar que el mecanismo molecular de acción del NPA es común, al menos en parte, con el de la fertilización, y que uno de los factores que impulsan el crecimiento del fruto en ambos casos es el aumento de la concentración de auxinas en los óvulos. Además, las auxinas sintetizadas en el óvulo no parecen ser transportadas al pericarpio, lo que apunta hacia la existencia de alguna señal, aguas abajo de auxinas, que pueda ser transportada al pericarpio, para inducir allí crecimiento.

El tratamiento con GA_3 , por su parte, no tuvo ningún efecto sobre la expresión de GFP dirigida por $DR5$ (Figuras 16 GA_3 y 17 GA_3), lo que indica que la inducción de fructificación mediante tratamiento con GA_3 no desencadena un aumento en la concentración de auxinas. Este resultado apoya la hipótesis de que las giberelinas actúen con posterioridad a las auxinas, en el proceso de desarrollo del fruto, y que serían candidatas a ser esa señal aguas abajo de las auxinas. No obstante, también es posible que las GAs actúen en paralelo a las auxinas en la fructificación.

3.2. Inducción de la biosíntesis de giberelinas durante la fructificación.

Los datos expuestos anteriormente parecen indicar que en la fructificación las GAs actúan con posterioridad a las auxinas, o independientemente de ellas. En diversas especies y tejidos vegetales (van Huizen *et al.* 1997, Ross *et al.* 2000, Wolbang y Ross 2001, O'Neill y Ross 2002, Ngo *et al.* 2003, Ozga *et al.* 2003, Frigerio *et al.* 2006) se ha descrito que las auxinas inducen la síntesis de GAs, o regulan la expresión de genes del metabolismo de GAs. La reducida abundancia de esta hormona dificulta su cuantificación: una alternativa habitual para estudiar cómo está regulada su concentración es analizar la expresión de los genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de GAs, que se muestra en la Figura 3. Se han analizado mediante qRT-PCR los niveles de expresión de todos los genes identificados que codifican enzimas implicados en los dos últimos pasos de la biosíntesis, GA 20-oxidasas (GA20OX) y GA 3-oxidasas (GA3OX), así como los de GA 2-oxidasas (GA2OX), que catalizan las reacciones de inactivación de GAs. En la Figura 18 se muestran los niveles

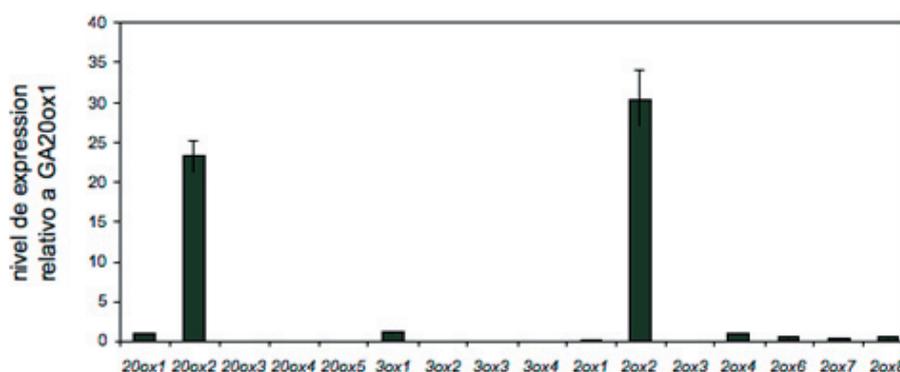


Figura 18. Niveles relativos de expresión de los genes de metabolismo de giberelinas en el pistilo de la flor de *cer6-2* en antesis. Los niveles de expresión se determinaron por qRT-PCR según se describe en Materiales y métodos, y se normalizaron respecto al nivel de expresión del gen *ACT7* (At5g09810). Los niveles de expresión de todos los genes se normalizaron respecto al nivel de expresión de *AtGA20ox1*, que se igualó a 1. Se muestra el resultado representativo de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Las barras de error muestran la desviación estándar.

de expresión relativos de estos genes en los pistilos de flores en antesis de *cer6-2*, no tratadas. Los genes que mostraron niveles más altos de expresión fueron *AtGA20ox2*, *AtGA3ox1* y *AtGA2ox2*, así que los análisis sucesivos se centraron en estos genes. En un segundo grupo quedarían englobados *AtGA20ox1*, *AtGA2ox1*, *AtGA2ox4*, y *AtGA2ox6-8*, que se expresaron a niveles

mucho más bajos, pero aún detectables, mientras que *AtGA20ox3-5*, *AtGA3ox2-4* y *AtGA2ox3* quedaron por debajo del nivel de detección de esta técnica.

3.2.1. Variación de la expresión de los genes de metabolismo de giberelinas durante la fructificación inducida por tratamientos hormonales.

Con el fin de comprobar si en el proceso de fructificación los mecanismos de regulación de la expresión de las *GA20ox*, *GA3ox* y *GA2ox* por retroalimentación son funcionales, y si las auxinas inducen la expresión de genes de biosíntesis de GAs también en este proceso, se indujo fructificación en *cer6-2* mediante tratamientos con GA_3 , NPA y 2,4-D, y se cuantificaron los niveles de expresión de las *AtGA20ox*, *AtGA3ox* y *AtGA2ox* al cabo de 2 y 24h mediante qRT-PCR. La expresión de estos genes en la fructificación está regulada por GAs. En la Figura 19 se muestran los niveles de expresión relativos 2 horas (barras grises) o 24 horas (barras negras) después del tratamiento con GA_3 . Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al tratamiento control, de modo que los valores superiores a 1 indican inducción de la expresión del gen, mientras que los valores inferiores a 1 indican represión. A las 2 horas del tratamiento, la expresión de los genes que codifican enzimas de biosíntesis

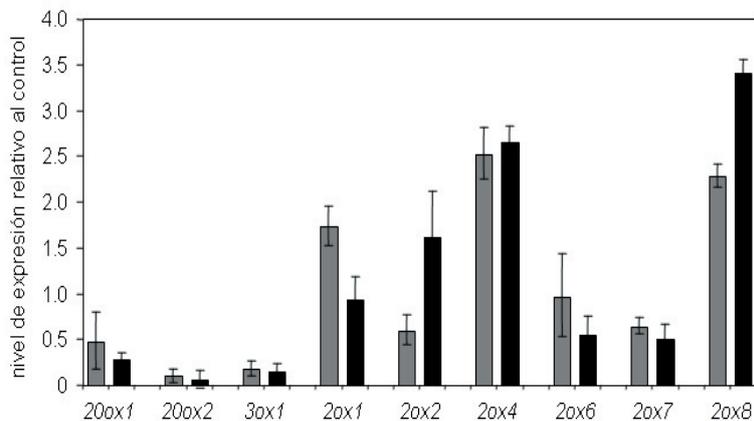


Figura 19. Niveles relativos de expresión de los genes de metabolismo de giberelinas tras el tratamiento con GA_3 330 μ M. Los niveles de expresión se determinaron por qRT-PCR según se describe en Materiales y métodos, y se normalizaron respecto al nivel de expresión de *ACT7* (*At5g09810*). El nivel de expresión de cada gen tras el tratamiento control se igualó a 1, y los niveles de expresión después del tratamiento con GA_3 se calcularon normalizando cada uno frente a su control. Las medidas de expresión se realizaron a las 4 horas (barras grises) y 24 h (barras negras) del tratamiento. Se muestra el resultado representativo de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Las barras de error muestran la desviación estándar.

se redujo notablemente, manteniéndose reprimidos hasta, al menos, 24 horas después del tratamiento. La expresión de los genes que codifican enzimas de inactivación, en cambio, se indujo (salvo en el caso de *AtGA2ox6* y *AtGA2ox7*, aunque su nivel de expresión es mucho menor). El gen con un nivel de expresión más elevado, *AtGA2ox2*, disminuyó ligeramente su expresión a tiempos cortos, para inducirse al cabo de 24 horas.

Las auxinas regulan la expresión de los genes del metabolismo de GAs de manera opuesta a las propias GAs. La Figura 20 muestra los niveles de expresión relativos después del tratamiento con 2,4-D: la inducción de fructificación con esta hormona sólo causó un aumento de la expresión de *AtGA3ox1*, mientras que el nivel de expresión de *AtGA2ox2* y de *AtGA2ox2* se redujo. El comportamiento de los genes con niveles de expresión más bajos en este tejido fue menos consistente.

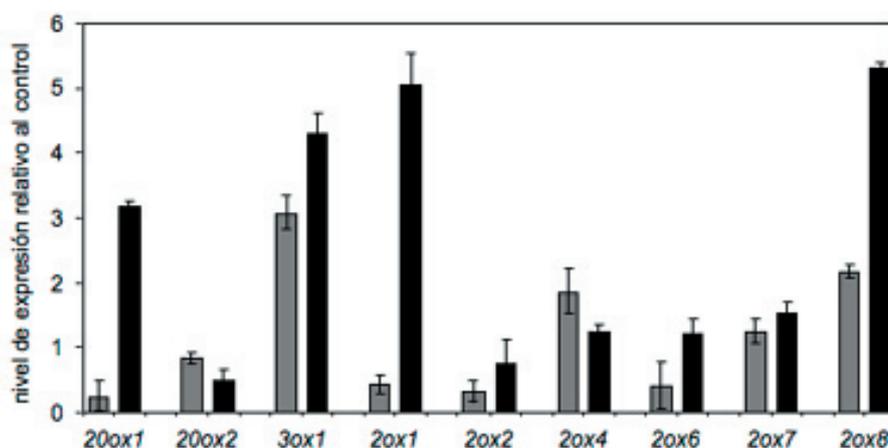


Figura 20. Niveles relativos de expresión de los genes de metabolismo de giberelinas tras el tratamiento con 2,4-D 10 μ M. Los niveles de expresión se determinaron por qRT-PCR según se describe en Materiales y métodos, y se normalizaron respecto al nivel de expresión de *ACT7* (*At5g09810*). El nivel de expresión de cada gen tras el tratamiento control se igualó a 1, y los niveles de expresión después del tratamiento con 2,4-D se calcularon normalizando cada uno frente a su control. Las medidas de expresión se realizaron a las 4 horas (barras grises) y 24 h (barras negras) del tratamiento. Se muestra el resultado representativo de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Resulta especialmente interesante que el tratamiento con NPA (Figura 21) también provocó un aumento de la expresión de los genes de biosíntesis y una reducción de la expresión de los genes de inactivación de GAs. La expresión

de *AtGA20ox2* y *AtGA3ox1* se indujo, aunque las 20-oxidasas recuperaron sus niveles de expresión iniciales a las 24 horas del tratamiento, y la expresión de *AtGA20ox2* disminuyó a las 2 horas del tratamiento, y también volvió a su nivel inicial a las 24 horas.

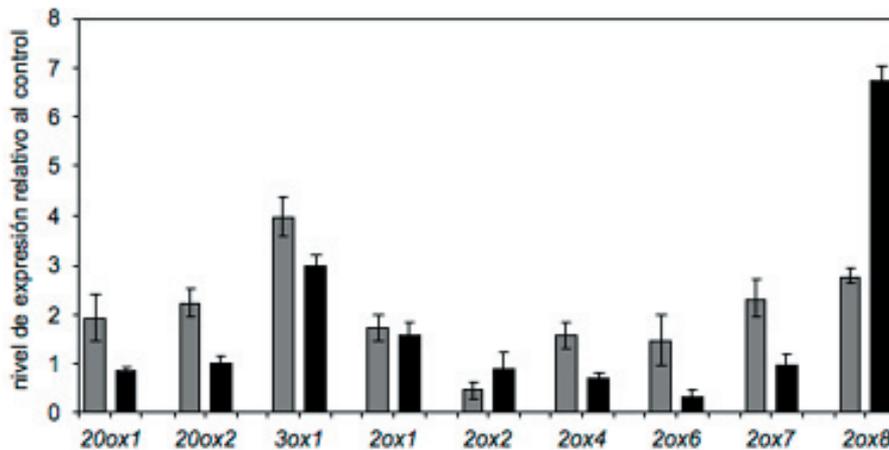


Figura 21. Niveles relativos de expresión de los genes de metabolismo de giberelinas tras el tratamiento con NPA 50 μ M. Los niveles de expresión se determinaron por qRT PCR según se describe en Materiales y métodos, y se normalizaron respecto al nivel de expresión de *ACT7* (*At5g09810*). El nivel de expresión de cada gen tras el tratamiento control se igualó a 1, y los niveles de expresión después del tratamiento con NPA se calcularon normalizando cada uno frente a su control. Las medidas de expresión se realizaron a las 4 horas (barras grises) y 24 h (barras negras) del tratamiento. Se muestra el resultado representativo de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Las barras de error muestran la desviación estándar.

3.2.2. Variación de la expresión de los genes del metabolismo de giberelinas en los óvulos y el pericarpio.

Puesto que el NPA sólo tiene efecto sobre la concentración de auxinas en óvulos, surge la cuestión de si su efecto sobre el metabolismo de GAs se ejerce en ese mismo tejido o en el pericarpio. Para comprobarlo, se realizaron tratamientos con GA_3 y NPA sobre flores de *cer6-2*, se recogieron por separado los óvulos y los pericarpos a las 2 horas, y se estudió en cada tejido la regulación de la expresión de los genes de metabolismo de GAs mediante qRT-PCR.

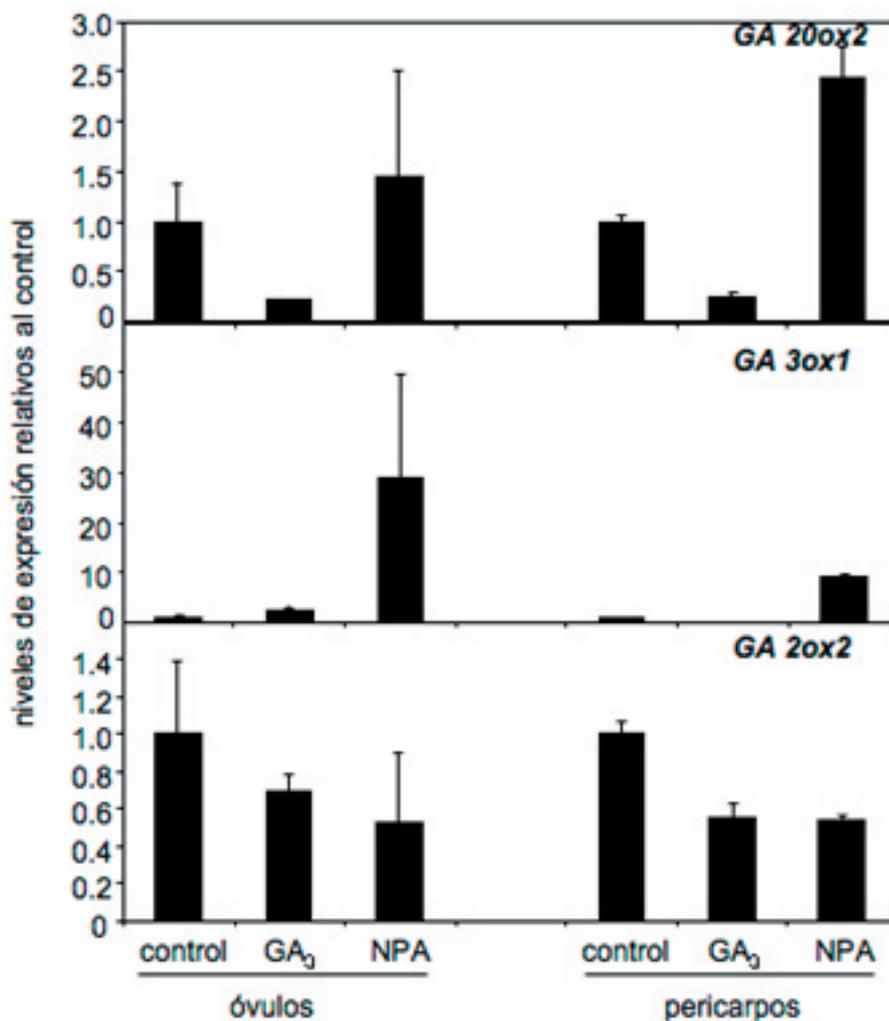


Figura 22. Niveles relativos de expresión de *AtGA20ox2*, *AtGA3ox1* y *AtGA2ox2* en los óvulos y el pericarpio 4 horas después del tratamiento con GA₃ 330 μM o NPA 50 μM. Los niveles de expresión se determinaron por qRT PCR según se describe en Materiales y métodos, y se normalizaron respecto al nivel de expresión de *ACT7* (*At5g09810*). El nivel de expresión de cada gen tras el tratamiento control se igualó a 1, y los niveles de expresión después del tratamiento con GA₃ o NPA se calcularon normalizando cada uno frente al tratamiento control. Se muestra el resultado representativo de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar.

Como se observa en la Figura 22, el único gen que presentó un comportamiento diferencial en óvulos y pericarpos fue *AtGA3ox1*. La expresión de este gen aumentó aproximadamente el triple (unas 30 veces frente a unas 10 veces más expresado, aproximadamente) en los óvulos que en el pericarpo, en respuesta al tratamiento con NPA. Además, *AtGA3ox1* se indujo ligeramente (2 veces) en los óvulos en respuesta a GA_3 , mientras que este tratamiento desencadenó una disminución de su expresión (unas 5 veces) en el pericarpo. Tanto *AtGA20ox2* como *AtGA2ox2* mostraron perfiles de expresión prácticamente idénticos en los dos tejidos en cada uno de los tratamientos. Este resultado sugiere que el gen que desempeña un papel preponderante en los óvulos es *AtGA3ox1*, y que parece activarse la síntesis de GAs en los óvulos en respuesta a la inducción de partenocarpia. Es decir, ya en los óvulos se observa el papel de las auxinas como inductoras de síntesis de GAs, aunque ese efecto finalmente se debe de trasladar al pericarpo, para promover su crecimiento.

3.2.3. Variación de la expresión de los genes de metabolismo de giberelinas a lo largo de la polinización y fertilización.

En diversas especies (cítricos, tomate, guisante y *Arabidopsis*) se ha observado que la polinización y fertilización desencadenan aumentos en los niveles de GAs o inducción de la expresión de genes de biosíntesis de GAs en los frutos (Sun y Kamiya 1994, Ait-Ali *et al.* 1997, Ben-Cheikh *et al.* 1997, Silverstone *et al.* 1997, Rebers *et al.* 1999).

Para averiguar cómo se regula en *Arabidopsis* la expresión de los genes del metabolismo de GAs en respuesta a la polinización, se analizó la evolución temporal de la expresión de estos genes en *cer6-2* después de polinizar los pistilos de flores en anthesis con polen silvestre Ler.

La Figura 23 muestra la evolución temporal de la expresión de *AtGA20ox2*, *AtGA3ox1* y *AtGA2ox2* a partir de la polinización. La expresión de *AtGA3ox1* aumentó rápidamente en los pistilos polinizados de *Arabidopsis*: el nivel de mRNA de este gen se duplicó 4 horas después de la polinización, y alcanzó un máximo a las 8 horas, coincidiendo con el tiempo en que todos los óvulos habrían sido fertilizados. Al cabo de 12 horas, el nivel de expresión se redujo ligeramente, aunque manteniéndose 3 veces por encima del nivel de expresión en el momento de la polinización. La expresión de *AtGA20ox2*, en cambio, no se modificó prácticamente, lo cual sugiere que *AtGA3ox1* es el gen que desempeñaría el papel fundamental en la inducción de la síntesis de GAs que probablemente tiene lugar tras la fertilización. La expresión de *AtGA2ox2*, por su parte, se redujo a la mitad 4 horas después de la polinización, para

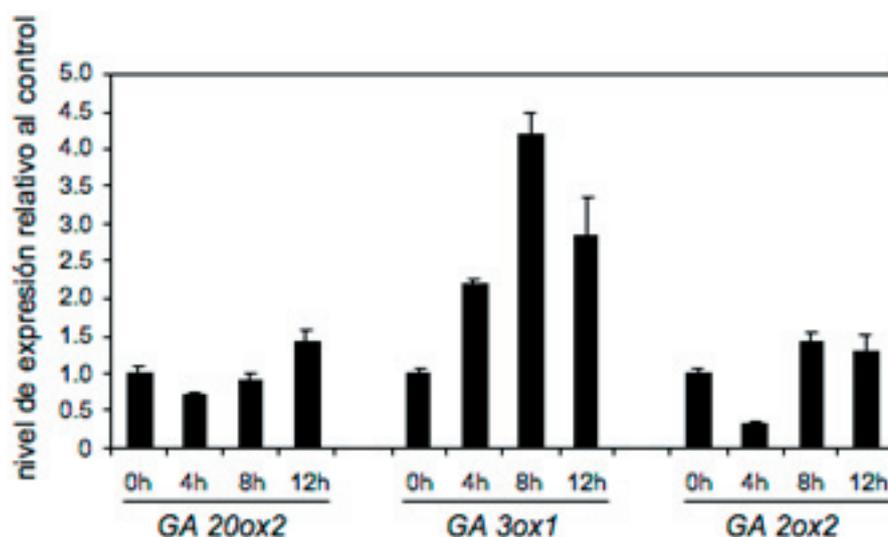


Figura 23. Evolución temporal de los niveles relativos de expresión de *AtGA20ox2*, *AtGA3ox1* y *AtGA2ox2* después de la polinización manual con polen *Ler*. Los niveles de expresión se determinaron por qRT PCR según se describe en Materiales y métodos, y se normalizaron respecto al nivel de expresión de *ACT7* (*At5g09810*). El nivel de expresión de cada gen en el momento de la polinización (tiempo cero) se igualó a 1, y los niveles de expresión después de polinizar se calcularon normalizando cada uno frente a su tiempo cero. Las medidas de expresión se realizaron a las 0, 4, 8 y 12 horas tras la polinización. Se muestra el resultado representativo de dos réplicas biológicas, con tres réplicas técnicas cada una. Las barras de error muestran la desviación estándar.

luego inducirse ligeramente a las 8 horas, y mantenerse en ese nivel hasta las 12 horas. Es posible que esta inducción tardía responda al mecanismo de retroalimentación positiva.

4. Participación de la señalización por giberelinas en la fructificación.

La mayor parte de la diferenciación durante la fructificación ocurre en las paredes del fruto, mientras que la señal inicial parece surgir de los óvulos. ¿Cómo se transduce esa señal? Las GAs parecen ser el último escalón antes de disparar la fructificación, así que se decidió estudiar la implicación de su señalización y su localización espacial. Para ello se utilizaron dos herramientas principales: mutantes en genes implicados en la vía de señalización de GAs, y plantas que expresan fusiones traduccionales de GFP a proteínas de señalización de GAs.

4.1. Implicación de los elementos de señalización de GA en la fructificación.

La señalización por GAs opera en forma de sistema des-reprimible, modulado fundamentalmente por las proteínas SPY, SLY y los miembros de la familia DELLA (Figura 5). Para identificar qué genes de esta cadena de señalización participan en la transducción de señal en la fructificación, se analizó la capacidad de respuesta a los distintos tratamientos inductores de fructificación, así como a la polinización, en los mutantes de ganancia de función de GAI (*gai-1*), RGA (plantas sobreexpresantes de la fusión $P_{RGA}:GFP-rga\Delta I7$), y en los mutantes de pérdida de función de GAI (*gaiT6*), RGA (*rga24*), RGL1 (*rgl1-1*), RGL2 (*rgl2-1*), y SPY (*spy-5*), todos ellos en fondo Ler. Previamente se realizaron cruces de cada uno de estos mutantes con *cer6-2* para obtener los dobles mutantes, y poder realizar así los análisis sin necesidad de emascular las flores.

4.1.1. SPY (*spy-5*)

La proteína SPY regula negativamente la ruta de señalización por GAs. SPY es una N-acetilglucosamina-O-transferasa (OGT) con un dominio de interacción proteína-proteína. Se ha propuesto que SPY funciona aumentando la actividad de RGA, y probablemente de otras proteínas DELLA, modificándolas con

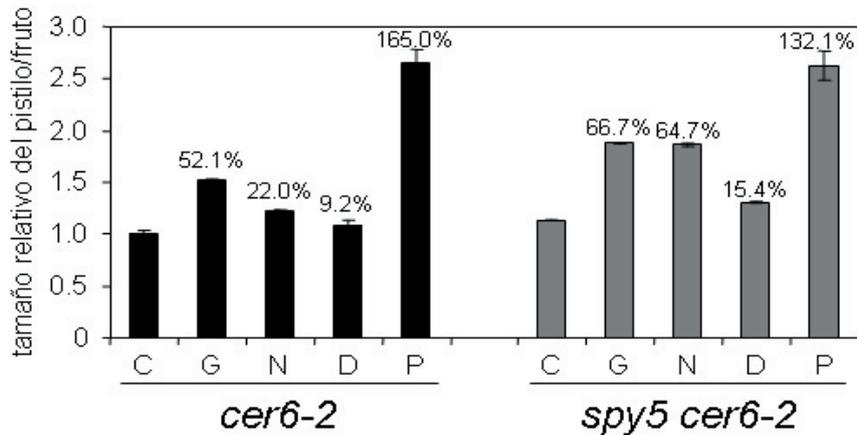


Figura 24. Efecto de los tratamientos inductores de fructificación en *cer6-2* y en el doble mutante *spy-5 cer6-2*. Los pistilos de flores en antesis fueron tratados con una solución control (C), GA₃ 330 μM (G), NPA 50 μM (N), 2,4-D 10 μM (D), o polinizados manualmente con polen Ler (P), y medidos a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los porcentajes indican el aumento de longitud respecto a los pistilos del mismo genotipo tratados con solución control.

N-acetilglucosamina (Silverstone *et al.* 2006). El alelo recesivo *spy-5* se obtuvo en un rastreo de plantas silvestres capaces de crecer en presencia de paclobutrazol (PAC), un inhibidor de biosíntesis de GAs (Wilson y Somerville 1995). Esta mutación confiere un fenotipo parecido al causado por una sobredosis de GAs: crecimiento mayor que el silvestre en presencia de PAC, floración temprana, curvatura parcial de las hojas, doblamiento de las silicuas y fertilidad reducida, y, como en el caso de otros alelos de este gen, un incremento de la respuesta a GAs. Se ha descrito anteriormente que *spy-2*, otro alelo de *SPY*, presenta desarrollo partenocárpico de los frutos (Jacobsen y Olszewski 1993), pero esta característica no está descrita en *spy-5*, ni tampoco se observó durante el desarrollo de este trabajo.

Los dobles mutantes *spy-5 cer6-2* mostraron una respuesta incrementada a todos los tratamientos. Esta hipersensibilidad fue especialmente acentuada frente a NPA y 2,4-D, que indujeron un crecimiento del fruto dos y tres veces mayor, respectivamente, en el doble mutante que en *cer6-2* (Figura 24). Los frutos polinizados, en cambio, alcanzaron un tamaño final menor que el de los frutos del parental *cer6-2*. La pérdida de función de *SPY* acentúa las respuestas a GAs, al desaparecer la activación de los reguladores negativos de estas respuestas, las proteínas DELLA. Estos resultados sugieren que la señalización por GAs también está incrementada en el proceso de fructificación. Además, la mayor respuesta a auxinas parece indicar que éstas actúan por encima de las giberelinas en la señalización hormonal durante la fructificación. El exceso de señalización por GAs, no obstante, parece influir negativamente sobre el crecimiento de los frutos polinizados.

4.1.2. GAI (*gai-1* y *gai-t6*).

El gen *GAI* de *Arabidopsis* se identificó mediante una mutación, *gai-1*, que reduce considerablemente la capacidad de respuesta a GAs durante el crecimiento vegetativo (Koornneef *et al.* 1985). El mutante *gai-1* tiene un contenido mayor en GAs activas, lo que sugiere que *GAI* está implicada en la regulación por retroalimentación negativa de la biosíntesis de GAs (Talón *et al.* 1990). El alelo *gai-1* tiene una deleción de 51 nucleótidos que no altera la pauta abierta de lectura pero implica la pérdida de 17 aminoácidos en el dominio DELLA (Peng *et al.* 1997), necesario para la degradación de la proteína inducida por GAs (Dill *et al.* 2001). La imposibilidad de degradar la proteína hace que en este mutante de ganancia de función las respuestas a GAs estén permanentemente bloqueadas. La mutación *gai-t6* (Peng *et al.* 1997), en cambio, corresponde a un alelo recesivo de pérdida de función que confiere resistencia parcial a PAC, y es capaz de rescatar parcialmente el fenotipo del mutante deficiente en GAs *gai* (Dill y Sun, 2001, King *et al.* 2001).

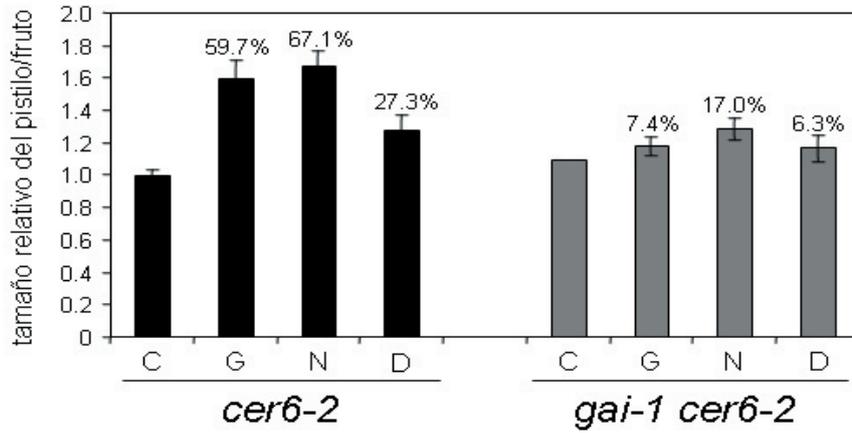


Figura 25. Efecto de los tratamientos inductores de fructificación en *cer6-2* y en el doble mutante *gai-1 cer6-2*. Los pistilos de flores en antesis fueron tratados con una solución control (C), GA₃ 330 μM (G), NPA 50 μM (N), 2,4-D 10 μM (D), o polinizados manualmente con polen Ler (P), y medidos a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los porcentajes indican el aumento de longitud respecto a los pistilos del mismo genotipo tratados con solución control.

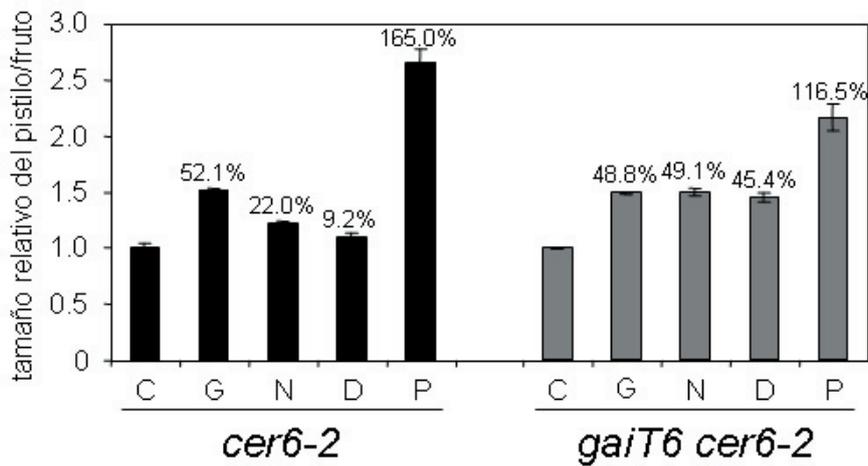


Figura 26. Efecto de los tratamientos inductores de fructificación en *cer6-2* y en el doble mutante *gai-t6 cer6-2*. Los pistilos de flores en antesis fueron tratados con una solución control (C), GA₃ 330 μM (G), NPA 50 μM (N), 2,4-D 10 μM (D), o polinizados manualmente con polen Ler (P), y medidos a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los porcentajes indican el aumento de longitud respecto a los pistilos del mismo genotipo tratados con solución control.

Los tratamientos en el doble mutante *gai-1 cer6-2* resultaron menos efectivos que en el parental *cer6-2*. La mayor reducción de sensibilidad (aproximadamente 8 veces menos sensible) se observó en el tratamiento con GA_3 , mientras que tanto la respuesta a NPA como a 2,4-D se vio reducida aproximadamente 4 veces (Figura 25). En el doble mutante *gai-t6 cer6-2*, la respuesta a GA_3 prácticamente no se vio alterada con respecto al parental. Los frutos polinizados, en cambio, no alcanzaron el mismo tamaño que los de *cer6-2*. El mutante mostró hipersensibilidad a auxinas: el efecto del NPA es el doble en *gai-t6 cer6-2* que en el parental, mientras que 2,4-D tiene un efecto cinco veces mayor sobre *gai-t6* (Figura 26).

La reducción de la sensibilidad a los tratamientos en *gai-1 cer6-2* sugiere que GAI participa en la transmisión de la señal de GAs en fructificación, aunque sin ser la única proteína implicada. Por otra parte, la disminución de la respuesta a auxinas al mutar un elemento de señalización por GAs apoya la presencia de las auxinas por encima de las GAs, o en una rama independiente a ellas, en la ruta de regulación hormonal que opera durante la fructificación. La falta de efecto de *gai-t6* sobre la respuesta a GAs sería explicable por un fenómeno de redundancia, mientras que la hipersensibilidad a auxinas en este mutante parece indicar que GAs y auxinas podrían actuar sobre GAI por distintas rutas.

4.1.3. RGA ($P_{RGA}:GFP-rga\Delta 17$ y *rga-24*).

El gen *RGA* fue identificado a partir de una mutación de pérdida de función, *rga*, capaz de rescatar varios de los fenotipos del mutante biosintético *gal* (Silverstone et al. 1997). El alelo *rga-24*, en el que toda la región codificante de *RGA* está eliminada (Silverstone et al. 1998), tiene un efecto supresor sobre *gal* considerablemente mayor que el de *gai-t6* (King et al. 2001, Dill y Sun 2001), aunque ambos actúan sinérgicamente: el triple mutante *rga-24 gai-t6 gal* presenta incluso algunos fenotipos de sobredosis de GAs, lo que indica que *RGA* y *GAI* son los principales represores que controlan esos procesos (Dill y Sun 2001). El mutante *rga\Delta 17*, que se generó eliminando la misma región que estaba ausente en *gai-1*, e introduciendo la versión mutada en fusión traduccional con la proteína GFP, bajo el control del promotor endógeno de *RGA* (aquí abreviado $P_{RGA}:GFP-rga\Delta 17$), presenta un fenotipo idéntico al de *gai-1*. La proteína mutante es resistente a la degradación inducida por GAs, por lo que actúa como un represor constitutivamente activo (Dill et al. 2001).

La capacidad de respuesta de $P_{RGA}:GFP-rga\Delta 17$ *cer6-2* a polen y a GA_3 se vio reducida aproximadamente 2 veces con respecto a *cer6-2*, de manera parecida a lo observado en *gai-1 cer6-2*. En cambio, el doble mutante presentó

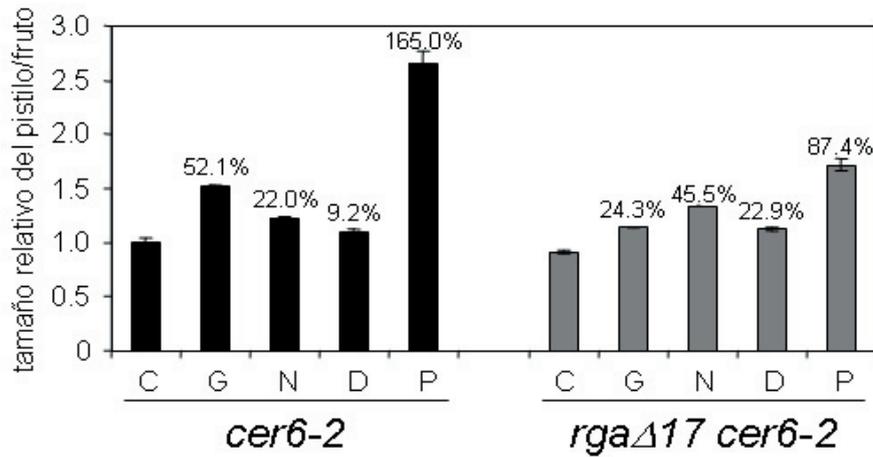


Figura 27. Efecto de los tratamientos inductores de fructificación en *cer6-2* y en el doble mutante $P_{RGA}::GFP-rga\Delta17$ *cer6-2*. Los pistilos de flores en anthesis fueron tratados con una solución control (C), GA₃ 330 μM (G), NPA 50 μM (N), 2,4-D 10 μM (D), o polinizados manualmente con polen Ler (P), y medidos a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los porcentajes indican el aumento de longitud respecto a los pistilos del mismo genotipo tratados con solución control.

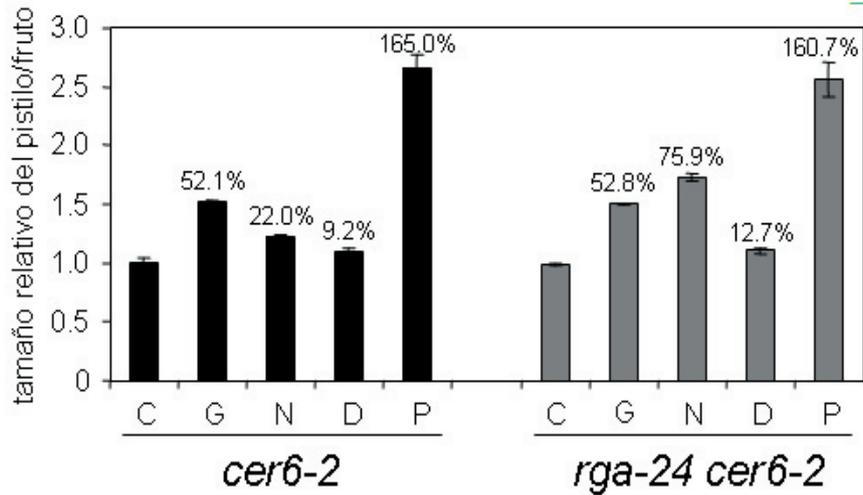


Figura 28. Efecto de los tratamientos inductores de fructificación en *cer6-2* y en el doble mutante *rga-24 cer6-2*. Los pistilos de flores en anthesis fueron tratados con una solución control (C), GA₃ 330 μM (G), NPA 50 μM (N), 2,4-D 10 μM (D), o polinizados manualmente con polen Ler (P), y medidos a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los porcentajes indican el aumento de longitud respecto a los pistilos del mismo genotipo tratados con solución control.

hipersensibilidad a NPA y 2,4-D, los cuales indujeron el crecimiento de frutos 2 veces mayores que en el parental (Figura 27). En el doble mutante *rga-24 cer6-2*, al igual que ocurría en *gai-t6 cer6-2*, la capacidad de respuesta a GA_3 no se vio alterada, como tampoco el crecimiento de los frutos polinizados. El efecto de 2,4-D y NPA también fue comparable al que tuvieron sobre *gai-t6 cer6-2*, ya que ambos indujeron una respuesta ligeramente mayor en *rga-24 cer6-2* que en el parental *cer6-2* (Figura 28).

Estos resultados sugieren que las auxinas no ejercen la misma acción sobre RGA y sobre GAI en el proceso de fructificación, ya que en los mutantes resistentes *rgaΔ17* y *gai-1* se observaron comportamientos contrarios en respuesta a auxinas (insensibilidad parcial en *gai-1*, hipersensibilidad en *rgaΔ17*).

4.1.4. RGL1 (*rgl1-1*) y RGL2 (*rgl2-1*).

Los primeros análisis de la función de RGA y GAI sugirieron que los otros miembros de la familia DELLA, RGL1, RGL2 y RGL3, podrían desempeñar un papel en la germinación y el desarrollo de la flor, procesos que no se veían prácticamente afectados en los mutantes de RGA o GAI. El gen *RGL1* se identificó originalmente a partir de una secuencia de un clon de DNA genómico (Sánchez-Fernández *et al.* 1998), y posteriormente se propuso que participaba en el desarrollo vegetativo de la planta y en la germinación (Wen y Chang 2002). Sin embargo, Lee y colaboradores (2002) desmintieron el papel de RGL1 en la germinación, utilizando alelos de inserción de *Ds*. Tyler y colaboradores (2004) también mostraron que el principal represor de la señalización por GAs durante la germinación es RGL2, analizando mutantes de inserción de T-DNA. Los mutantes de pérdida de función *rgl1-1* y *rgl2-1* fueron obtenidos mediante el rastreo de una colección de mutantes de inserción del elemento transponible *Ds-GUS* (Lee *et al.* 2002): *rgl1-1* tiene una inserción *Ds-GUS* 68 pb aguas arriba del codón de inicio de la traducción, mientras que en *rgl2-1* la inserción está localizada en la región codificante. Basándose en los niveles de expresión de los cinco genes *DELLA*, se ha propuesto (Tyler *et al.* 2004) que el papel preponderante en el desarrollo de la silicua correspondería a RGA, RGL1 y RGL2.

El doble mutante *rgl1-1 cer6-2* respondió peor a todos los tratamientos: el efecto de GA_3 , NPA y 2,4-D se redujo aproximadamente a la mitad (Figura 29). Estos resultados parecen indicar que la ausencia de RGL1 es compensada

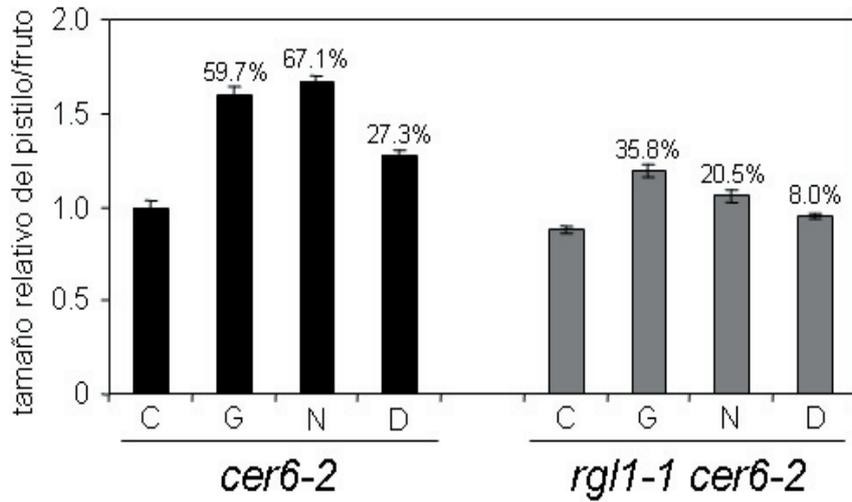


Figura 29. Efecto de los tratamientos inductores de fructificación en *cer6-2* y en el doble mutante *rgl1-1 cer6-2*. Los pistilos de flores en anthesis fueron tratados con una solución control (C), GA₃ 330 μM (G), NPA 50 μM (N), 2,4-D 10 μM (D), o polinizados manualmente con polen Ler (P), y medidos a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los porcentajes indican el aumento de longitud respecto a los pistilos del mismo genotipo tratados con solución control.

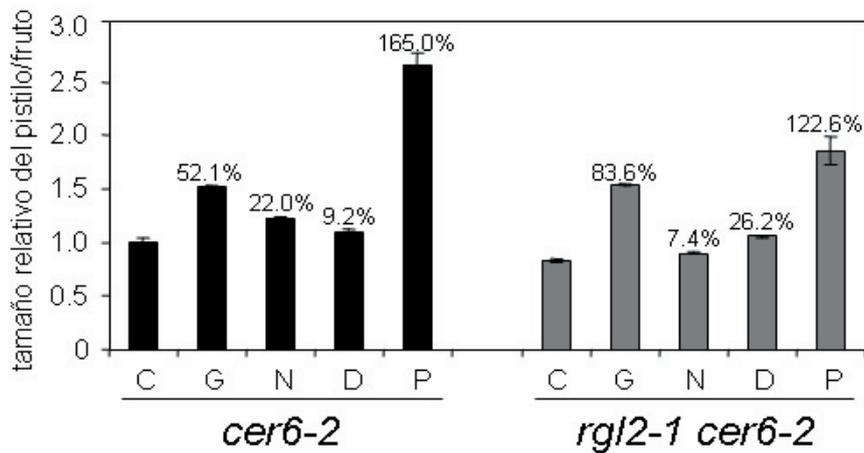


Figura 30. Efecto de los tratamientos inductores de fructificación en *cer6-2* y en el doble mutante *rgl2-1 cer6-2*. Los pistilos de flores en anthesis fueron tratados con una solución control (C), GA₃ 330 μM (G), NPA 50 μM (N), 2,4-D 10 μM (D), o polinizados manualmente con polen Ler (P), y medidos a los 7 días. Las medidas representan el promedio de un mínimo de 25 pistilos o frutos. Las barras de error representan la desviación estándar. Los porcentajes indican el aumento de longitud respecto a los pistilos del mismo genotipo tratados con solución control.

por alguna otra proteína DELLA, que incluso ejercería de forma más activa su papel represor. En cambio, *rgl2-1 cer6-2* mostró una ligera hipersensibilidad a GA_3 (los frutos formados eran aproximadamente 1.5 veces mayores que los de *cer6-2*) y a 2,4-D (frutos casi 3 veces mayores en *rgl2-1 cer6-2* que en el parental). El efecto de NPA sobre *rgl2-1 cer6-2* fue casi 3 veces menor que sobre el parental, y los frutos polinizados también elongaron un poco menos (Figura 30). La ausencia de RGL2, por lo tanto, tiene un efecto similar al de eliminar GAI o RGA.

4.2. Regulación de GFP-RGA.

La alteración de las respuestas en fructificación en los mutantes *rga24* y $P_{RGA}::GFP-rga\Delta17$ indica que la proteína RGA está implicada en la señalización por GAs durante el proceso de fructificación. Para comprobar en qué tejidos tiene lugar la señalización a través de RGA, y cuál es la evolución temporal de esta señalización se utilizaron plantas transgénicas que expresan una fusión

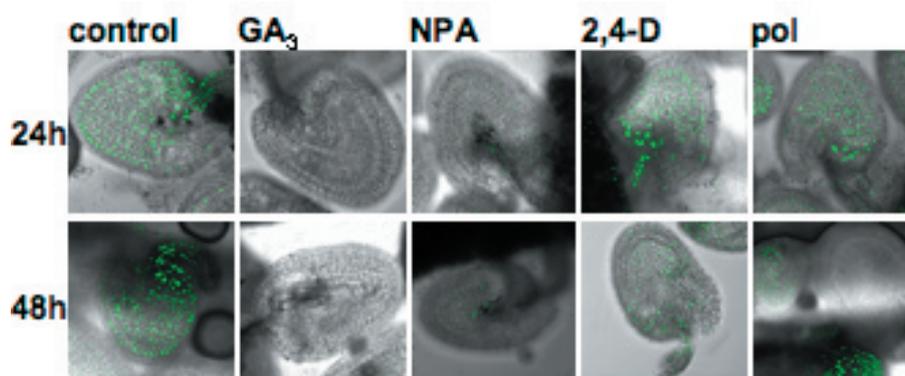


Figura 31. Localización de la proteína RGA en los óvulos. Las flores de plantas $P_{RGA}::GFP-RGA$ en un fondo *cer6-2* fueron tratadas con solución control, GA_3 330 μM , 2,4-D 10 μM o NPA 50 μM , o polinizadas manualmente con polen Ler en el día de antesis y visualizadas por microscopía confocal 24 y 48 horas después del tratamiento. Las imágenes mostradas son la superposición de la imagen confocal (verde) de la señal correspondiente a GFP-RGA con la imagen visible del óvulo.

traduccional de GFP-RGA, bajo el control del promotor endógeno RGA ($P_{RGA}::GFP-RGA$) (Silverstone et al. 2001). Esta proteína de fusión se degrada rápidamente en respuesta a la aplicación exógena de GA en raíces (Achard et al. 2003, Fu y Harberd 2003).

En los pistilos de flores en antesis de plantas *cer6-2* $P_{RGA}::GFP-RGA$ se detectó señal de GFP en los núcleos de todas las células, y la señal se mantuvo

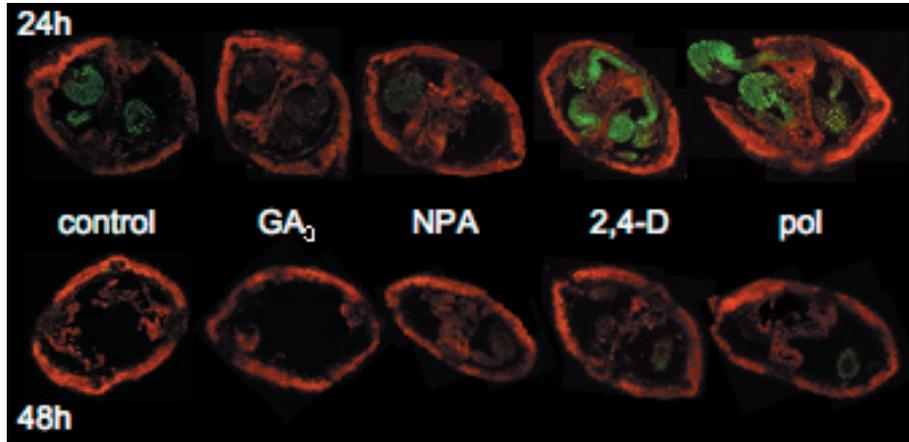


Figura 32. Localización de la proteína RGA en el pericarpo de los pistilos y frutos. Las flores de plantas $P_{RGA}::GFP-RGA$ en un fondo *cer6-2* fueron tratadas con solución control, GA_3 330 μM , 2,4-D 10 μM o NPA 50 μM , o polinizadas manualmente con polen Ler en el día de antesis, y visualizadas por microscopía confocal 24 y 48 horas después del tratamiento. Las imágenes corresponden a secciones transversales a través del pistilo o fruto. La señal fluorescente de GFP-RGA aparece en verde, y la autofluorescencia de la clorofila en rojo.

hasta 48 horas después de la antesis (Figuras 31 control y 32 control). RGA estaba presente tanto en los óvulos como en los pericarpos, aunque la intensidad de la señal en este último tejido era mucho menor (Figuras 31 y 32, respectivamente). El tratamiento con GA_3 resultó en la desaparición completa y rápida de la señal de fluorescencia, lo que indica que el GA_3 indujo la degradación casi completa de la proteína GFP-RGA tanto en los óvulos como en el pericarpo al cabo de 24 horas (Figuras 31 y 32). La degradación de la proteína de fusión es más lenta que en raíces, probablemente debido a la diferente permeabilidad de estos tejidos, es decir, al tiempo que pueda precisar el GA_3 hasta penetrar en el tejido y ejercer su acción.

El tratamiento con NPA también indujo la desaparición de la señal de GFP-RGA en los óvulos y el pericarpo, aunque de manera más lenta que el GA_3 (Figuras 31 NPA y 32 NPA). A las 24 horas del tratamiento con 2,4-D pareció aumentar ligeramente la intensidad de la señal de GFP en los óvulos: es posible que RGA se estabilice transitoriamente en respuesta a auxinas. Después de 48h, en cambio, la fluorescencia desapareció casi por completo (Figuras 31 2,4-D y 32 2,4-D), lo que indica que 2,4-D también induce la degradación de GFP-RGA. Estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que la señalización por giberelinas es posterior a la acción de las auxinas, una de las opciones que sugeriría la falta de efecto de las giberelinas sobre la expresión de $P_{DR5rev}::GFP$. Por último, la polinización y posterior fertilización desencadenó asimismo desaparición de la señal fluorescente asociada a

GFP-RGA. La degradación de RGA en respuesta a polinización también tuvo lugar a tiempos más largos que en respuesta al tratamiento con GA₃. Resulta especialmente llamativo que la degradación en los óvulos fue dependiente de fertilización: los óvulos no fertilizados siguieron mostrando señal de RGA-GFP, mientras que la proteína desapareció completamente en los óvulos fertilizados, así como en el pericarpo (Figuras 31 pol y 32 pol). Esto sugiere que la cascada de señalización de GAs se desencadena en el óvulo a partir de la fertilización, mientras que en el pericarpo lo hace a raíz de la polinización.

5. Dianas moleculares de giberelinas.

La determinación de qué genes responden a la inducción de partenocarpia mediante tratamiento con GA₃ puede permitir identificar dianas moleculares de esta hormona en el desarrollo temprano del fruto, así como descubrir procesos biológicos que se activen en respuesta a la fructificación. Para abordar este objetivo, se hibridaron micromatrices de oligonucleótidos largos con RNA amplificado procedente de pistilos y frutos tratados con GA₃ y recogidos 0, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas después del tratamiento. Para eliminar del análisis los genes cuya expresión variara en respuesta al estrés inducido por el tratamiento, o aquellos que mostraran variaciones circadianas de expresión, independientes de la inducción de partenocarpia por GA₃, se llevaron a cabo dos controles independientes. Por una parte, se trataron plantas con una solución control, y se recogieron pistilos al cabo de 1 y 2 horas, y por otra parte se tomaron muestras de pistilos no tratados a las 4 y 8 horas del momento en que se realizaron los tratamientos. Los genes que mostraron expresión diferencial en la evolución temporal de la respuesta a GA₃, pero que variaron en el mismo sentido en estos controles, fueron descartados del análisis.

Para analizar los datos, se estableció un filtro de nivel de expresión de 100 unidades de fluorescencia para ambos canales, y se seleccionaron sólo los genes que dieran datos de hibridación en al menos un 70 % de las micromatrices. Con los genes que superaron estos filtros, se realizó un análisis de significancia de micromatriz (*significance analysis microarray*, SAM) SAM multiclass, mediante el método de K-nearest neighbors, con 1000 permutaciones. Como nivel de corte para seleccionar genes estadísticamente significativos se tomó una tasa de falsos positivos (false discovery rate, FDR) del 0.20 %. A continuación, de entre estos genes se eliminaron los genes sospechosos de mostrar variaciones de expresión debido al ritmo circadiano o al estrés producido por el tratamiento: se descartaron los genes con variaciones de expresión estadísticamente significativas en el análisis de los

controles de ritmo circadiano y de estrés del tratamiento y cuyos perfiles de expresión en esos controles fueran similares a los perfiles de expresión tras la inducción de fructificación con GA₃. Con los 1675 genes obtenidos tras aplicar estos filtros se hizo un análisis de agrupamiento en mapas autoorganizativos (*self-organizing maps*, SOMs), que permitió agrupar los genes en cuatro perfiles de expresión fundamentales: 255 genes mostraron una inducción transitoria, hasta 8 horas después del tratamiento, para luego recuperar niveles de expresión similares a los del tiempo cero; 445 genes mostraron un aumento gradual en sus niveles de expresión, desde 1 hasta 48 horas después del tratamiento; 622 genes se reprimieron gradualmente, para alcanzar niveles mínimos de expresión al cabo de 48 horas del tratamiento; y 353 genes mostraron una inducción a tiempos largos, 24 y 48 horas después del tratamiento, variando muy poco su expresión en los tiempos más cortos analizados. La Figura 33 muestra los agrupamientos obtenidos.

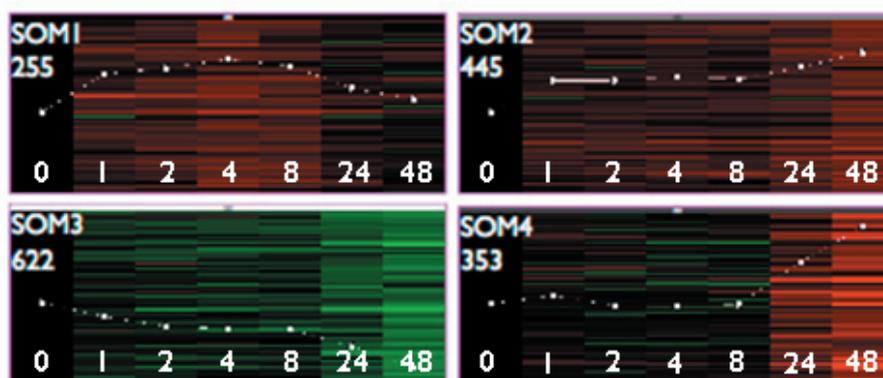


Figura 33. Agrupamiento de genes por perfiles de expresión en mapas autoorganizativos. El número de genes incluido en cada agrupamiento se muestra en la esquina superior izquierda. Los puntos temporales analizados, en horas después del tratamiento, se muestran en blanco en la parte inferior de cada mapa. Los puntos blancos representan el nivel de expresión promedio de todos los genes incluidos en ese agrupamiento, para cada punto temporal, y la línea blanca muestra el perfil promedio de expresión. Cada gen está representado por una línea horizontal a través de los distintos tiempos, con un color diferente en cada fracción, en función de su nivel de expresión (normalizado siempre frente a su nivel de expresión a tiempo cero). El color rojo indica aumento de la expresión, el verde represión, y la intensidad del color es proporcional a la magnitud de la variación de la expresión.

Un análisis de enriquecimiento funcional mediante el programa FatiGO+ indicó que ninguno de los agrupamientos por perfil de expresión presentó

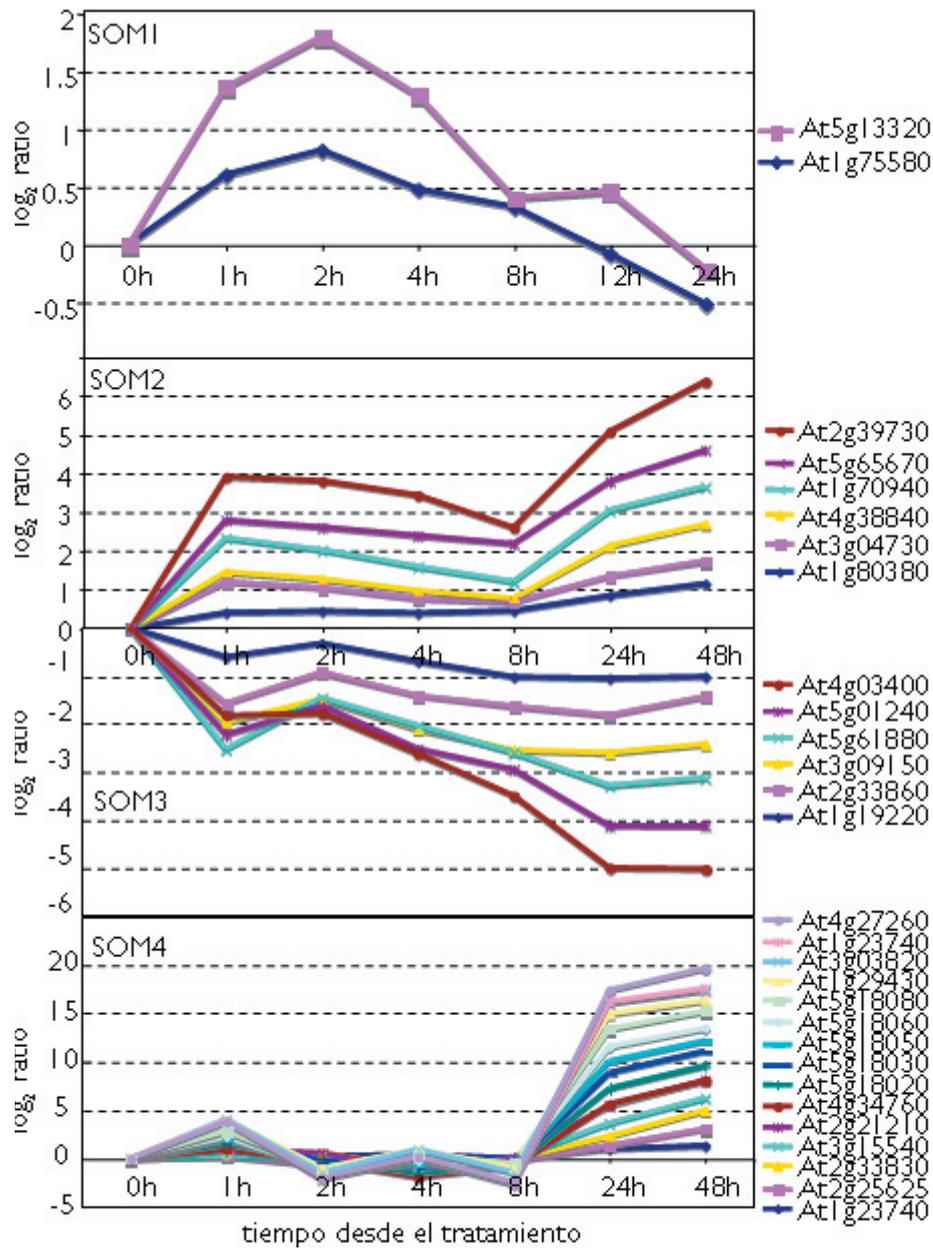


Figura 34. Perfiles de expresión de los genes de respuesta a auxinas. Los gráficos muestran los niveles de expresión a cada tiempo, normalizados frente a nivel de expresión a tiempo cero, de los genes de respuesta a auxinas o transporte de auxinas que aparecen en cada agrupamiento SOM. En cada gráfico aparece el SOM al que pertenecen los genes representados.

enriquecimiento en alguna función biológica contemplada en esta clasificación génica. Al analizar los genes que aparecían en los distintos grupos sí resultó evidente, no obstante, la presencia de numerosos genes de respuesta a auxinas, la mayoría de los cuales se indujo en respuesta al tratamiento por GA₃. En la Figura 34 se muestran los genes de respuesta a auxinas que mostraron diferencias de expresión en respuesta a la inducción de fructificación mediante GA₃. Este resultado sugiere que aguas abajo de la acción de las GAs en la fructificación se producen nuevamente eventos de señalización por auxinas, lo que parece indicar que la secuencia de acción de estas dos hormonas en el desarrollo temprano del fruto es más compleja de lo que se había pensado hasta este momento.

Discusión

Modelo de acción de las hormonas en el proceso de fructificación en *Arabidopsis thaliana*.

Determinadas hormonas vegetales, en particular auxinas y giberelinas, desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del fruto, desde la fructificación hasta la maduración. De hecho, se asume que las fitohormonas sintetizadas por las semillas ya desde la fertilización y durante su desarrollo son responsables tanto del inicio del desarrollo del fruto como de su crecimiento y maduración. Numerosas observaciones apoyan esta hipótesis: las semillas en desarrollo sintetizan hormonas (Eeuwens y Schwabe 1975, Sponsel 1983, Talón *et al.* 1990, García-Martínez *et al.* 1991a, 1991b, Ben-Cheikh *et al.* 1997, Rodrigo *et al.* 1997), la aplicación exógena de hormonas (Gustafson 1936, Gustafson 1937, Nitsch 1950, García-Martínez y Carbonell 1980, Alabadí *et al.* 1996, Vivian-Smith y Koltunow 1999) o de inhibidores del transporte de auxinas (Robinson *et al.* 1971, Beyer y Quebedeaux 1974) permiten inducir partenocarpia en distintas especies. Además, se ha comprobado que mutantes partenocárpicos de cítricos y tomate tienen un contenido hormonal mayor que el de los tipos silvestres (Talón 1992, Mapelli *et al.* 1978, Mapelli y Lombardi 1982), mientras que la inducción por transgénesis de la síntesis de auxinas en los óvulos y la placenta conduce al desarrollo de frutos partenocárpicos en berenjena, tomate, fresa y frambuesa (Rotino *et al.* 1997, Ficcadenti *et al.* 1999, Mezzetti *et al.* 2004). Ahora bien, el mecanismo molecular por el que actúan las diferentes hormonas no se conoce, ni tampoco se sabe si su actuación es coordinada o independiente.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten proponer un modelo de acción de las hormonas en el proceso de fructificación. La Figura 35 resume este modelo, según el cual la polinización y fertilización desencadenan un aumento de la concentración de auxinas en los óvulos. Esto a su vez causaría la inducción de la síntesis de giberelinas, desencadenando eventos de señalización por esta hormona. Esta cascada de acción de auxinas y giberelinas conduce finalmente al desarrollo del fruto. Hay diversos datos experimentales, tanto en esta tesis como en trabajos anteriores, que apoyan el modelo propuesto en este trabajo.

La fertilización de los óvulos induce acumulación de auxinas.

La polinización induce un aumento de la concentración de auxinas en los óvulos, como demuestra la inducción de la expresión de GFP, dirigida por el promotor *DR5*, en los óvulos después de la polinización (Figura 16). Además, el bloqueo del transporte polar de auxinas mediante tratamiento

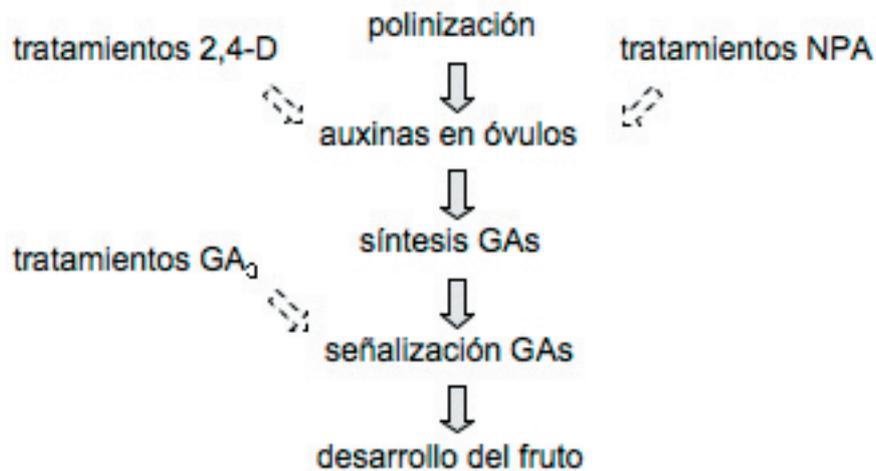


Figura 35. Esquema de la acción de auxinas y GAs en el desarrollo del fruto en *Arabidopsis thaliana*.

con NPA es capaz de inducir fructificación, al parecer mimetizando este mecanismo hormonal inicial (Figura 16). Este evento temprano en la cascada de señalización hormonal que conduce al desarrollo del fruto parece ser específico del óvulo, puesto que en el pericarpo no se aprecia aumento en la concentración de auxinas, ni a raíz de la polinización, ni después de tratar con NPA (Figura 17). Por otra parte, al inducir fructificación mediante tratamiento exógeno con auxinas (2,4-D) se observa una activación del promotor *DR5*, evidenciada por el aumento de señal de GFP, en la misma región de los óvulos que tras la polinización o el tratamiento con NPA (Figura 16). La expresión de *DR5:GFP* también se induce en el pericarpo tras el tratamiento con 2,4-D (Figura 17): este efecto ectópico se debe probablemente a que el tratamiento es en todo el tejido, de modo que la presencia del propio 2,4-D en el pericarpo es capaz de activar el promotor *DR5*. Müller y colaboradores (2002) determinaron por cromatografía multiplex de gases acoplada con espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) que los niveles de IAA en las flores de *Arabidopsis* aumentan considerablemente un día después de la fertilización, para mantenerse elevados hasta, como mínimo, el principio de la maduración del embrión. Por otra parte, el laboratorio de Cornelia Ullrich (Aloni *et al.* 2005) también describió la inducción de la expresión de *DR5:GUS* en óvulos fertilizados de *Arabidopsis* en los momentos iniciales del desarrollo del fruto. Es decir, parece claro que un evento temprano que se desencadena a raíz de la polinización y fertilización es el aumento de concentración de

auxinas en los óvulos fertilizados. Este aumento podría deberse a una síntesis de novo de auxinas, o a la acumulación de éstas en el lugar de su síntesis, al bloquearse de alguna manera el transporte tras el tratamiento con NPA.

A favor de la hipótesis del bloqueo están los resultados observados en los tratamientos con morfactina o NPA (Robinson 1971, Beyer y Quebedeaux 1974, este trabajo): estos agentes bloqueantes del transporte de auxinas son capaces de inducir desarrollo del fruto en pepino y *Arabidopsis*, aparentemente a través de la acumulación de auxinas en los óvulos. En estos casos, presumiblemente no se desencadena nueva síntesis, sino que la salida del IAA sintetizado en los óvulos queda bloqueada. Por otra parte, la inducción mediante transgénesis de síntesis de auxinas en óvulos y placenta de berenjena (Rotino *et al.* 1997) y tomate (Ficcadenti *et al.* 1999), o la expresión en el ovario de tomate de un gen que confiere hipersensibilidad a auxinas (Carmi *et al.* 2003) son capaces de desencadenar el desarrollo de los frutos en esas especies. Estos resultados indican que tanto el bloqueo de la salida de las auxinas de los óvulos como la inducción de síntesis de nuevas auxinas en estos tejidos son capaces de disparar la fructificación. ¿Cuál es el mecanismo que actúa realmente en la fructificación inducida a raíz de la polinización? El muy bajo nivel de auxinas presente en los tallos de las inflorescencias sugiere que las auxinas deben sintetizarse *in situ* en las flores y/o los frutos, y no ser importadas (Müller *et al.* 2002). Además, una de las nitrilasas de la ruta de biosíntesis del IAA, NIT2, se expresa específicamente en las semillas al principio del desarrollo del fruto (Vorwerk *et al.* 2001), y el sustrato que esta nitrilasa utiliza para producir IAA, el glucosinolato glucobrasicina, se acumula a niveles altos en los frutos en desarrollo (Petersen *et al.* 2002). Por tanto, sí hay síntesis de auxinas en los óvulos. Los datos disponibles actualmente, sin embargo, no permiten determinar si la polinización causa sólo un aumento de esa síntesis o también la acumulación en los óvulos del IAA u otras auxinas ya sintetizadas.

La presencia de auxinas induce biosíntesis de giberelinas.

La actuación de las giberelinas aguas abajo de las auxinas en el proceso de fructificación se puede inferir a partir de distintos datos experimentales. Por una parte, el tratamiento con GA₃ no induce aumento de la señal de GFP dirigida por DR5 (Figuras 16 y 17), lo que indica que las GAs actúan o por debajo de las auxinas, o en una ruta independiente, paralela. En cambio, las auxinas sí tienen un efecto sobre la biosíntesis de GAs: al inducir la fructificación mediante tratamiento con NPA o 2,4-D, la expresión de los genes de biosíntesis de GAs aumenta, mientras que la mayoría de los

genes de catabolismo de GAs disminuye sus niveles de expresión (Figuras 20 y 21). Esta regulación transcripcional de genes del metabolismo de GAs por auxinas podría ser directa, y no una consecuencia del proceso de fructificación inducido por estos tratamientos, ya que previamente se ha descrito que las auxinas inducen la biosíntesis de GAs en distintas especies y tejidos. En guisante, la eliminación de la fuente de auxinas por decapitación provoca una disminución de los niveles tanto de GAs activas como de mRNA de *PsGA3ox1* en tallo, y un aumento de la expresión de *PsGA2ox1*. Estos fenotipos revierten al aplicar IAA a la zona decapitada (Ross *et al.* 2000). La decapitación de plantas de tabaco también disminuye los niveles de IAA y GAs en los internodos inmediatamente inferiores a la zona decapitada, y al aplicar auxinas los niveles se recuperan (Wolbang y Ross 2001). En guisante, la aplicación de ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) a pericarpos sin semillas induce tanto la biosíntesis de GAs activas (van Huizen *et al.* 1995) como la expresión de *PsGA20ox* (van Huizen *et al.* 1997) y *PsGA3ox1* (Ozga *et al.* 1999). Las auxinas también inducen la expresión de genes de biosíntesis de GAs en plántulas de *Arabidopsis*, aunque en esta especie el tratamiento con NAA también provoca el aumento de los niveles de mRNA de algunas 2-oxidases, implicadas en la inactivación de las GAs, si bien la expresión de las *GA20ox* y *GA2ox* se localiza en sitios diferentes (Frigerio *et al.* 2006). Los genes diana de la regulación por auxinas varían de unas especies a otras, y de unos tejidos a otros: en plántulas de *Arabidopsis*, la inducción de la biosíntesis de GAs parece actuar fundamentalmente a través de las 20-oxidases, mientras que en fructificación el papel predominante parece corresponder a *AtGA3ox1* (Figura 22), de manera similar a lo que se ha descrito en guisante. Por otra parte, el aumento de los niveles de expresión de *AtGA3ox1* y la disminución de la expresión de *AtGA2ox2* a raíz de la polinización (Figura 23) muestran que la regulación no es exclusiva de los tratamientos con auxinas o NPA, sino que tiene una importancia fisiológica. Sin embargo, con los datos disponibles no es posible determinar si la regulación se debe al proceso de fructificación *per se*, o al aumento de la concentración de auxinas desencadenado por este proceso.

Eventos de señalización por GAs tienen lugar aguas abajo de la acumulación de auxinas.

La inducción por auxinas de la expresión de los genes de biosíntesis de GAs sugiere que hay un aumento de los niveles de giberelinas activas. Aunque en *Arabidopsis* no se han realizado determinaciones del nivel de GAs, los datos en guisante y tabaco corroboran esta hipótesis (van Huizen *et al.* 1995, van Huizen *et al.* 1997, Ozga *et al.* 1999, Ross *et al.* 2000). La señalización por GAs

también está regulada por auxinas: la capacidad de respuesta a 2,4-D y NPA está alterada en diversos mutantes en la ruta de señalización por GAs. El mutante *spy-5*, que presenta un fenotipo similar al que produciría una sobredosis de GAs, es hipersensible a todos los tratamientos que inducen fructificación (Figura 24), lo que sugiere que GAs y auxinas interaccionan coordinadamente en el proceso de desarrollo del fruto. La reducción de la sensibilidad a todos los tratamientos en *gai-1* (Figura 25), junto con el aumento de la capacidad de respuesta a auxinas en *gai-t6* (Figura 26) sí parecen indicar claramente que GAI desempeña un papel en la fructificación, y que la señalización por auxinas en este proceso tiene lugar, al menos en parte, a través de esta proteína. Los resultados obtenidos con otros mutantes son menos claros, probablemente debido a fenómenos de redundancia génica.

Un análisis más detallado de la señalización a través de RGA muestra que los tratamientos tanto con NPA como con 2,4-D (además de GA₃) inducen la degradación de la proteína de fusión GFP-RGA (Figuras 31 y 32). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los eventos de señalización por GAs tienen lugar aguas abajo de las auxinas. Además, la fertilización de los óvulos, que desencadena tempranamente un aumento de la concentración de auxinas, también induce la degradación de GFP-RGA (Figuras 31 y 32). En raíces de *Arabidopsis* se ha observado (Fu y Harberd 2003) que las auxinas inducen la degradación de RGA. En este trabajo se mostraba que el bloqueo del transporte polar de auxinas mediante tratamiento con NPA dificulta la degradación de GFP-RGA inducida por GAs, mientras que en el desarrollo del fruto el tratamiento con NPA induce la desaparición de GFP-RGA (Figuras 31 y 32): una posible explicación para esta aparente discordancia es el efecto diferente del NPA en estos dos tejidos. Las raíces son un órgano sumidero, donde no hay síntesis de auxinas, de modo que al tratar con NPA se bloquea la importación de auxinas desde el tallo; el pistilo, en cambio, es un órgano fuente, en el que se sintetizan auxinas (Müller *et al.* 2002), que probablemente quedan retenidas al tratar con NPA. El consiguiente aumento de concentración de auxinas probablemente provoca la degradación de GFP-RGA. No se ha demostrado un efecto directo de auxinas sobre la estabilidad de las proteínas DELLA: lo que se ha descrito es el requerimiento de auxinas para la correcta inducción por GAs de la degradación de GFP-RGA. Así, en el proceso de fructificación se podría estar observando un efecto regulador directo de las auxinas sobre la estabilidad de RGA aún no descrito en otros tejidos, o bien que a partir de la inducción de fructificación mediante auxinas se produzca síntesis de GAs activas, y esas GAs sean las que estén induciendo la degradación de GFP-RGA.

Universalidad del modelo de acción hormonal durante el desarrollo del fruto.

El laboratorio de Anna Koltunow (Vivian-Smith y Koltunow 1999, Vivian-Smith *et al.* 2001) ha estudiado la regulación hormonal de la fructificación en *Arabidopsis*, y ha propuesto un modelo de actuación de las hormonas, según el cual las auxinas serían una de las señales iniciales desencadenadas por la polinización y fertilización, y estimularían el desarrollo vascular y la expansión celular en el mesocarpo. Estos eventos posiblemente estarían modulados por la proteína FRUIT WITHOUT FERTILIZATION (FWF), identificada posteriormente como el factor de transcripción de respuesta a auxinas ARF8, un regulador negativo del desarrollo del fruto, cuyos niveles disminuyen drásticamente a raíz de la fertilización (Goetz *et al.* 2006). Las auxinas actuarían de manera independiente y temporalmente anterior a la síntesis y percepción de GAs. Sin embargo, esta secuencia de acción era sólo una propuesta, sin apoyo experimental (Vivian-Smith *et al.* 2001). Su modelo se centraba más en el papel de auxinas y GAs en división y diferenciación celular durante el desarrollo del fruto, y proponía que las GAs podrían actuar de manera auxiliar a la señal primaria de tipo auxina de diferenciación de la silicua, para regular la división celular asimétrica necesaria para el crecimiento y desarrollo del fruto (Vivian-Smith *et al.* 2001). Las GAs, según estos autores, son necesarias, aunque no suficientes, para este proceso: es necesario un nivel umbral de GAs para que pueda haber desarrollo del fruto, partenocárpico o no, aunque las GAs no son el único factor implicado. Si los niveles de GAs son bajos, una señal similar a auxinas puede tomar el relevo, y se consiguen frutos con una estructura tisular diferente de los frutos polinizados o inducidos por tratamiento con GA₃ (Vivian-Smith y Koltunow, 1999). El modelo que proponen estos autores se muestra en la Figura 36.

Las especies en la que el desarrollo del fruto ha sido estudiado con mayor profundidad son probablemente el tomate y el guisante. En estas especies se han postulado modelos diversos para explicar cómo las hormonas intervienen en el desarrollo del fruto.

En tomate se han propuesto al menos dos modelos diferentes para explicar la regulación hormonal del desarrollo temprano del fruto. Gillaspay y colaboradores (1993) proponían que GAs presentes en el polen serían importantes para el aumento de la producción de auxinas observado en el ovario a partir de la polinización/fertilización. Para esta propuesta se basaban en 1) la capacidad de las GAs para inducir la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, además de inducir partenocarpia, 2) el aumento en la concentración de auxinas observado en ovarios de tomate



Figura 36. Esquema de la regulación hormonal del desarrollo del fruto, la división y la diferenciación celular en la silicua, en *Arabidopsis thaliana*, según Anna M. Koltunow y colaboradores. Adaptado de Vivian-Smith et al. 2001.

no polinizados tratados con GAs (Sastry y Muir 1963), y 3) las oleadas de aumento de concentración de auxinas, desde la zona apical del ovario hacia la zona basal, detectadas unas horas después de la polinización. Los picos de concentración de auxinas y GAs observados serían consistentes con este modelo: un pico inicial de GAs entre la antesis de la flor y la fertilización, que decae a partir de la fructificación, momento en que comienza la fase dominada por la división celular. Simultáneamente comienza a aumentar la concentración de auxinas, que llega a su pico al inicio de la fase de expansión celular, y comienza a declinar de manera concomitante con un nuevo aumento de la concentración de GAs. El segundo pico de GAs cubre aproximadamente toda la fase de expansión celular, y decae antes de llegar a la fase de maduración del fruto. En esta fase se observa un nuevo aumento en la concentración de auxinas, sintetizadas en las semillas en desarrollo (este pico no aparece en los frutos partenocárpicos). La Figura 37 muestra estos perfiles de concentración de GAs y auxinas. Las auxinas, así, están fundamentalmente asociadas a la expansión celular, mientras que las GAs son necesarias para estimular la división celular y mantener la expansión celular. Los perfiles de concentración de auxinas y GAs son consistentes con un modelo en que la síntesis y acumulación de GAs estimulada por auxinas son necesarias para la

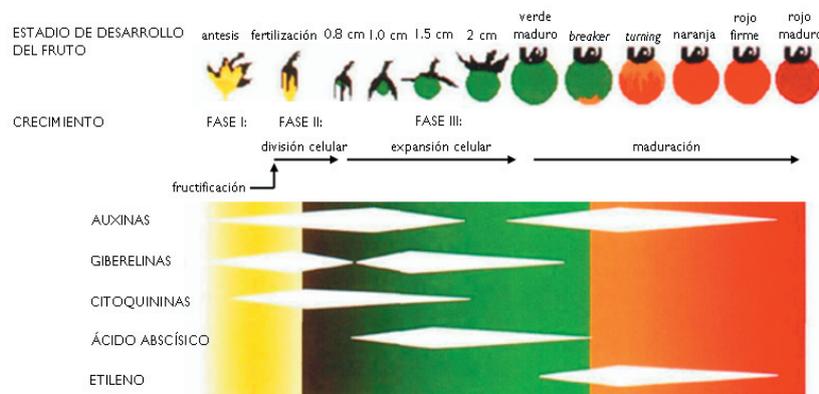


Figura 37. Esquema de los picos de concentración de hormonas a lo largo de las distintas fases del desarrollo del fruto de tomate. Adaptado de Gillaspay *et al.* 1993.

subsiguiente expansión y/o actividad sumidero de las células del fruto. Ahora bien, estos autores dejaban la puerta abierta a que la acción de GAs y auxinas en el desarrollo del fruto pudiera ser secuencial o coordinada.

En cambio, Wang y colaboradores (2005) ignoraron el pico inicial de GAs, y sugirieron un modelo más similar al que se propone en esta tesis para el desarrollo temprano del fruto en *Arabidopsis*. La proteína de respuesta a auxinas IAA9 actuaría como freno al desarrollo del ovario previo a la polinización, probablemente mediante la regulación negativa de vías de señalización de auxinas. La disminución de la expresión de IAA9 (por RNA antisentido) permitiría la expresión de genes regulados por auxinas, lo cual mimetizaría una posible explosión de auxinas que tendría lugar durante la polinización. La capacidad de las auxinas de promover la biosíntesis de GAs (Ross *et al.* 2000, Wolbang y Ross 2001) y de modular las respuestas a GAs (Fu y Harberd 2003) llevó a este grupo a proponer que el desarrollo precoz y partenocárpico de los frutos de las líneas antisentido para IAA9 pudiera estar mediado por respuestas a GAs. Otros autores (Balbi y Lomax 2003) han propuesto además que no sólo la capacidad de respuesta a auxinas, sino también la biosíntesis de etileno, desempeñan roles importantes en el desarrollo temprano del fruto en tomate, basándose en la expresión alterada de genes de respuesta a auxinas y de biosíntesis de etileno en las fases tempranas del desarrollo del fruto en el mutante *diageotropica (dgt)*, cuyos

frutos presentan fenotipos drásticos, aunque los patrones de producción de etileno no presentan diferencias respecto al silvestre.

En guisante, el laboratorio de Dennis Reinecke ha propuesto también un modelo de acción hormonal en el desarrollo del fruto, según el cual la polinización estimula la síntesis de la giberelina activa GA_1 , a través de un aumento en los niveles de mRNA de *PsGA3ox*, tanto en las semillas como en el pericarpo, lo que resulta en la fructificación y el crecimiento inicial de ambos tejidos. A continuación, las semillas sostienen el crecimiento del pericarpo al menos en parte mediante el transporte de auxina (4-Cl-IAA) al pericarpo, donde ésta estimula la expresión de tanto *GA20ox* como *GA3ox*, para mantener un nivel crítico de GA_1 necesario para el crecimiento del pericarpo. Esta GA bioactiva también puede regular su propia síntesis en el pericarpo por retroalimentación negativa, reduciendo los niveles de mensajero de *GA20ox* y *GA3ox*. Además, el 4-Cl-IAA afecta el crecimiento del fruto directamente a través de respuestas mediadas por auxinas. Por lo tanto, la interacción de auxinas y GAs , actuando de manera concertada, es necesaria para la coordinación del desarrollo del fruto y las semillas.

Tanto en tomate como en guisante, por lo tanto, se propone una actuación inicial de las GAs , posiblemente procedentes del polen, que en este trabajo no se ha detectado. En diversas especies en las que se comprobó la capacidad de extractos de polen de inducir desarrollo partenocárpico (Gustafson 1937), se proponía que la presencia de auxinas sería responsable de ese efecto. En *Nicotiana tabacum*, *Antirrhinum majus*, *Cyclamen persicum* y *Datura suaveolens* (Muir 1947) y *Arabidopsis* (Aloni et al. 2005) también se ha comprobado la presencia de auxinas en el polen. Se ha descrito que el polen de tomate es una fuente de GAs (Gustafson 1960), y, aunque en *Arabidopsis* no se ha comprobado la presencia de GAs en polen, sí se ha demostrado que las GAs son necesarias para el crecimiento tubo polínico (Singh 2002). Es posible que la ruta de señalización hormonal sea realmente más compleja que la que se propone en esta tesis, y que tengan lugar una síntesis inicial de GAs en el polen, o eventos muy tempranos de señalización por GAs durante la polinización, pero que no desencadenen síntesis o acumulación de auxinas detectables mediante *DR5:GFP*. Esta posibilidad también explicaría la inducción de genes de respuesta a auxinas al inducir partenocarpia mediante tratamiento con GA_3 (Figura 34). La acumulación de auxinas posterior sí parece claramente que desencadena eventos de biosíntesis y señalización por GAs . Otra posibilidad es que las GAs desempeñen un papel importante en los momentos tempranos de la fructificación en tomate, pero no en *Arabidopsis*, y que en esta especie su capacidad de inducir partenocarpia se deba a su actuación más aguas abajo en la ruta.

Perspectivas de futuro: la función del óvulo en la fructificación

En los óvulos en *Arabidopsis* se produce acumulación de auxinas, que no tiene lugar en el pericarpo (Figuras 16 y 17), se induce la expresión de genes de biosíntesis de GAs (Figura 22), y se desencadena señalización por GAs (Figura 31). Ahora bien, los resultados presentados en esta tesis no demuestran inequívocamente que en los óvulos se sinteticen GAs a raíz de la polinización, ni cuál puede ser la sustancia que actúe como señal desde el óvulo hacia el pericarpo. Los patrones de expresión de los distintos genes de biosíntesis y catabolismo de GAs podrían aclarar la importancia relativa de óvulos y pericarpo en este proceso. Más revelador aún sería restringir la síntesis de GAs a cada uno de estos tejidos, y comprobar en qué caso esa síntesis restringida es suficiente para desencadenar el desarrollo del fruto.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten proponer un modelo de acción de auxinas y giberelinas en el proceso de fructificación, y contestar a los objetivos que se plantearon inicialmente.

1. La auxina 2,4-D, el ácido giberélico (GA_3) y el inhibidor del transporte polar de auxinas NPA son capaces de inducir el desarrollo de frutos partenocárpicos en *Arabidopsis*, aunque los frutos obtenidos no llegan a alcanzar el tamaño de los frutos formados a partir de la polinización y fertilización.

2. En el proceso de fructificación, la primera señal hormonal que se desencadena es un aumento de la concentración de auxinas en los óvulos. La mimetización de este efecto mediante tratamientos exógenos con auxinas o NPA es probablemente la causa de su capacidad de inducir partenocarpia. A continuación se induce la expresión de genes implicados en la biosíntesis de GAs, y por lo tanto posiblemente aumentan los niveles de GAs activas. Finalmente, la biosíntesis de GAs, al igual que los tratamientos exógenos con GA_3 , desencadena eventos de señalización por GAs.

3. La inducción de genes de respuesta a auxinas tras los tratamientos con GA_3 sugiere que, aunque las auxinas actúan aguas arriba de las giberelinas en la fructificación, la ruta de señalización hormonal en este proceso probablemente no es lineal, sino más compleja.

Bibliografía

- Ait-Ali T, Swain SM, Reid JB, Sun T-p, Kamiya Y** (1997) The *LS* locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme *ent*-kaurene synthase A. *Plant J* **11**:443-454.
- Alabadí D, Agüero MS, Pérez-Amador MA, Carbonell J** (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries. *Plant Physiol* **112**:1237-1244.
- Al-Shahrour F, Mínguez P, Tárraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM, Conde L, Blaschke C, Vera J, Dopazo J** (2006) BABELOMICS : a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nuc Ac Res* **34** :W472-W476.
- Al-Shahrour F, Mínguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J** (2005) Babelomics : a suite of web-tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nuc Ac Res* **33** :W460-W464.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2005) Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**:315-328.
- Alvey L, Harberd NP** (2005) DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiol Plant* **123**:153-160.
- Ampomah-Dwamena C, Morris BA, Sutherland P, Veit B, Yao JL** (2002) Downregulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol* **130**:605-617.
- Archbold DD, Dennis FG** (1985) Strawberry receptacle growth and endogenous IAA content as affected by growth regulator application and achene removal. *J Am Soc Hortic Sci* **110**:816-820.
- Balanzá V, Navarrete M, Trigueros M, Ferrándiz C** (2006) Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *J Exp Bot* **57**:3457-3469.
- Balbi V, Lomax TL** (2003) Regulation of early tomato fruit development by the *Diageotropica* gene. *Plant Physiol* **131**:186-197.
- Ben-Cheikh W, Pérez-Botella J, Tadeo FR, Talón M, Primo-Millo E** (1997) Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. *Plant Physiol* **114**:557-564.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**:591-602.
- Beyer EM, Quebedeaux B** (1974) Parthenocarpy in cucumber: mechanism of action of auxin transport inhibitors. *J Am Soc Hortic Sci* **99**(5):385-390.
- Bishopp A, Mähönen AP, Helariutta Y** (2006) Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**:1857-1869.

- Bowman J, Smyth DR, Meyerowitz EM** (1989) Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1**:37-52.
- Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R** (2003) Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta* **217**:726-735.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**:1790-1799.
- Cohen JD, Slovin JP, Hendrickson AM** (2003) Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* **8**:197-199.
- Dharmasiri N, Estelle M** (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci* **9**:302-308.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**:441-445.
- Dill A, Jung H-S, Sun T-p** (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:14162-14167.
- Dill A, Sun T-p** (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **159**:777-785.
- Eeuwens CJ, Schwabe WW** (1975) Seed and pod wall development in *Pisum sativum*, L. in relation to extracted and applied hormones. *J Exp Bot* **26**:1-14.
- Faure JE, Rotman N, Fortuné P, Dumas C** (2002) Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type : developmental stages and time course. *Plant J* **30**:481-488.
- Ferrándiz C** (2002) Regulation of fruit dehiscence in Arabidopsis. *J Exp Bot* **53**(377): 2031-2038.
- Ferrándiz C, Pelaz S, Yanofski MF** (1999) Control of carpel and fruit development in Arabidopsis. *Annu Rev Biochem* **68**:321-354.
- Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, Cirillo C, Rotino GL, Spena A** (1999) Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol Breeding* **5**:463-470.
- Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL, Chau S, Fischer RL, Preuss D** (2000) Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell* **12**:2001-2008.
- Fleet CM, Sun T-p** (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Op Plant Biol* **8**:77-85.

- Fos M, Nuez F, García-Martínez JL** (2000) The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* **122**:471-80.
- Fos M, Proaño K, Nuez F, García-Martínez JL** (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol Plant* **111**: 545-550.
- Frigerio M, Alabadí D, Pérez-Gómez J, García-Cárcel L, Phillips AL, Hedden P, Blázquez MA** (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**:553-563.
- Friml J, Benková E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jürgens G, Palme K** (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**:661-673.
- Fu X, Harberd N** (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**:740-743.
- García-Martínez JL, Carbonell J** (1980) Fruit-set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L.: influence of plant-growth regulators. *Planta* **147**:451-456.
- García-Martínez JL, Martí M, Sabater T, Maldonado A, Vercher Y** (1991a) Development of fertilized ovules and their role in the growth of the pea pod. *Physiol Plant* **83**:411-416.
- García-Martínez JL, Santes C, Croker SJ, Hedden P** (1991b) Identification, quantification and distribution of gibberellins in fruits of *Pisum sativum* L. cv. Alaska during pod development. *Planta* **184**:53-60.
- Gasser CS, Broadhvest J, Hauser BA** (1998) Genetic analysis of ovule development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**:1-24.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell* **5**:1439-1451.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM** (2006) AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**:1873-1886.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun T-p, Thomas SG** (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**:3399-3414.
- Guerineau F, Sorensen AM, Fenby N, Scott RJ** (2003) Temperature sensitive diphtheria toxin confers conditional male-sterility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotech J* **1**:33-42.
- Gustafson FG** (1936) Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**:628-636.

- Gustafson FG** (1937) Parthenocarpy induced by pollen extracts. *Am J Bot* **24**:102-107.
- Hall A, Bastow RM, Davis SJ, Hanano S, McWatters HG, Hibberd V, Doyle MR, Sung S, Halliday KJ, Amasino RM, Millar AJ** (2003) The *TIME FOR COFFEE* gene maintains the amplitude and timing of Arabidopsis circadian clocks. *The Plant Cell* **15**:2719-2729.
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**:523-530.
- Homan DH** (1964) Auxin transport in the physiology of fruit development. *Plant Physiol* **39**:982-986.
- Jacobsen SE, Olszewski NE** (1993) Mutations at the *SPINDLY* locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**:887-896.
- Kepinsky S, Leyser O** (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**:446-451.
- King KE, Moritz T, Harberd NP** (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**:767-776.
- Koornneef M, Elgersma A, Hanhart CJ, van Loenen-Martinet EP, van Rijn L, Zeevaart JAD** (1985) A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **65**:33-39.
- Kunitz M** (1950) Crystalline desoxyribonuclease. Isolation and general properties. Spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Gen Physiol* **33**:349-363.
- Mapelli SC, Frova G, Tori G, Soressi G** (1978) Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol* **19**:1281-1288.
- Mapelli SC, Lombardi L** (1982) A comparative auxin and cytokinin study in normal and *to-2* mutant tomato plants. *Plant Cell Physiol* **23**:751-757.
- Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T** (2003) Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. *Plant Physiol* **131**:1327-1339.
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP** (1998) The *parthenocarpic fruit (pat)* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* **125**:107-114.
- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A** (2004) The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* **4**:4.
- Müller A, Düchting P, Weiler EW** (2002) A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**:44-56.

- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I** (2006) Identification of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J* **46**:880-889.
- Nemhauser JL, Feldman LJ, Zambryski PC** (2000) Auxin and *ETTIN* in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development* **127**:3877-3888.
- Ngo P, Ozga JA, Reinecke DM** (2002) Specificity of auxin regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression in pea pericarp. *Plant Mol Biol* **49**:439-448.
- Nitsch JP** (1950) Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *Am J Bot* **87**: 211-215.
- Pnueli L, Hareven D, Broday L, Hurwitz C, Lifschitz E** (1994) The *TM5* MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell* **6**:175-186.
- O'Neill DP, Ross JJ** (2002) Auxin regulation of the gibberellin pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**:1974-1982.
- Olszewski N, Sun T-p, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14**:S61-S80.
- Ozga JA, Yu J, Reinecke DM** (2003) Pollination-, development-, and auxin-specific regulation of gibberellin 3 β -hydroxylase gene expression in pea fruit and seeds. *Plant Physiol* **131**:1137-1146.
- Payne T, Johnson SD, Koltunow, AM** (2004) *KNUCKLES (KNU)* encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the Arabidopsis gynoecium. *Development* **131**:3737-3749.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The Arabidopsis *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**:3194-3205.
- Robles P, Pelaz S** (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* **49**:633-643.
- Robinson RW, Cantliffe DJ, Shannon S** (1971) Morphactin-induced parthenocarpy in the cucumber. *Science* **171**:1251-1252.
- Robinson-Beers K, Pruitt RE, Gasser CS** (1992) Ovule development in wild-type Arabidopsis and two female-sterile mutants. *The Plant Cell* **4**:1237-1249.
- Rodrigo MJ, García-Martínez JL, Santes CM, Gaskin P, Hedden P** (1997) The role of gibberellins A₁ and A₃ in fruit growth of *Pisum sativum* L. and the identification of gibberellins A₄ and A₇ in young seeds. *Planta* **201**:446-455.
- Roeder AHK, Yanofsky MF** (2006) Fruit development. En CR Somerville, EM Meyerowitz eds. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville MD. www.aspb.org/publications/arabidopsis/

- Ross JJ, O'Neil DP, Smith JJ, Kerckhoffs LHJ, Elliott RC** (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *Plant J* **21**:547-552.
- Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A** (1997) Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotechnol* **15**:1398-1401.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**:463-472.
- Sánchez-Fernández R, Ardiles-Díaz W, Van Montagu M, Inze D, May MJ** (1998) Cloning of a novel *Arabidopsis thaliana* RGA-like gene, a putative member of the VHLID-domain transcription factor family. *J Exp Bot* **49**, 1609–1610.
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JAD, Amasino RM** (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**:151-163.
- Shabtai S, Salts Y, Kaluzky G, Barg R** (2007) Improved yielding and reduced puffiness under extreme temperatures induced by fruit-specific expression of *rolB* in processing tomatoes. *Theor Appl Genet* <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-007-0511-7>.
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T-p** (1998) The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**:155-169.
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T-p** (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**:1555-1565.
- Silverstone AL, Mak PYA, Casamitjana-Martínez E, Sun T-p** (1997) The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**:1087-1099.
- Silverstone AL, Tseng T-S, Swain SM, Dill A, Jeong SY, Olszewski NE, Sun T-p** (2006) Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**:987-1000.
- Singh DP, Jermakow AM, Swain SM** (2002) Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 3133-3147.
- Sponsel VM** (1983) The localization, metabolism and biological activity of gibberellins in maturing and germinating seeds of *Pisum sativum* cv. Progress No. 9. *Planta* **159**:454-468.
- Steber CM, Cooney SE, McCourt P** (1998) Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of ABII-1 in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 509-521.

- Sun T-p, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**:197-223.
- Sun T-p, Kamiya Y** (1994) The Arabidopsis *GAI* locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**:1509-1518.
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR** (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol* **140**:150-158.
- Talón M, Koornneef M, Zeevaart JAD** (1990) Accumulation of C-19-gibberellins in the gibberellin-insensitive dwarf mutant *gai* of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Planta* **182**:501-505.
- Talón M, Zacarías L, Primo-Millo E** (1992) Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiol* **99**:1575-1581.
- Thomas SG, Sun T-p** (2004) Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol* **135**:668-676.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G** (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:5116-5121.
- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, Sun T-p** (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**:1008-1019.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle T** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**:1963-1971.
- Van Huizen R, Ozga JA, Reinecke DM, Twitchin B, Mander LN** (1995) Seed and 4-chloroindole-3-acetic acid regulation of gibberellin metabolism in pea pericarp. *Plant Physiol* **109**:1213-1217.
- Van Huizen R, Ozga JA, Reinecke DM** (1997) Seed and hormonal regulation of gibberellin 20-oxidase expression in pea pericarp. *Plant Physiol* **115**:123-128.
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P** (2000) Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol* **18**:233-242.
- Vivian-Smith A, Koltunow A** (1999) Genetic Analysis of Growth-Regulator-Induced Parthenocarpy in Arabidopsis. *Plant Physiol* **121**:437-451.
- Vivian-Smith A, Luo M, Chaudhury A, Koltunow A** (2001) Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in Arabidopsis. *Development* **128**:2321-2331.

- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latché A, Pech J-C, Bouzayen M** (2005) The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* **17**:2676-2692.
- Wen C-K, Chang C** (2002) Arabidopsis *RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**:87-100.
- White PJ** (2002) Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *J Exp Bot* **53**:1995-2000.
- Wilson RN, Somerville CR** (1995) Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (*gai*) of Arabidopsis. *Plant Physiol* **108**: 495-502.
- Wolbang CM, Ross JJ** (2001) Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. *Planta* **214**:153-157.
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action and interaction. *Ann Bot* **95**:707-735.
- Yin Z, Malinowski R, Ziolkowska A, Sommer H, Plader W, Malepszy S** (2006) The *DefH9-iaaM*-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cell Mol Biol Lett* **11**:279-290.