

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL PROCESO DE ADHESIÓN

CELULAR EN PLANTAS”

Lic. en Biotecnología María Gabriela Acosta

Director de Tesis: Dr. Víctor Hugo Casco

Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE)

Facultad de Ingeniería – UNER

2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al Dr. Víctor H. Casco, por darme la posibilidad y el lugar en el LAMAE-FI-UNER para realizar esta tesis. Por permitirme crecer y desarrollarme en el ámbito científico, por su gran paciencia, por transmitirme su vocación, y en todo momento, su permanente confianza. Gracias Víctor por tu invaluable predisposición y por tu inagotable energía para acompañarme en esta etapa de mi formación académica.

Al Dr. Sergio Lassaga y al Dr. Héctor Milisich, quienes me brindaron todo su apoyo, permitiéndome realizar parte de esta tesis en mi actual lugar de trabajo, el INTA.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, a sus autoridades y al Comité Académico del Doctorado por recibirme, orientarme y admitirme como alumna de la carrera de doctorado en Ciencias Biológicas.

A la Universidad Nacional de Entre Ríos, que a través del PID-FCA-UNER N° 2131 permitieron la financiación de la mayoría de los experimentos que conforman la presente tesis y al CONICET por haberme posibilitado el desarrollo de la misma a través de las becas de posgrado otorgadas.

A los miembros del LAMAE, especialmente a Javi D., Javi A., Fernanda y Mariana, quienes siempre me recibieron con mucha cordialidad y me ayudaron en todo momento con las dificultades que van surgiendo en este largo camino.

A mis amigos incondicionales, que supieron estar siempre, con sus palabras y con sus consejos. Gracias por contagiarme de la lucha incansable. Con ustedes, llegar al final, se transformó en un desafío diario, que han sabido alentar desde los lugares más difíciles, pero a los que cada uno de ustedes, han llegado: gracias Quique por tu inmensa e infatigable predisposición, por estar incondicionalmente siempre. Y a Vicky y a Caro por sus buenas energías que diariamente cargan mis pilas, por los chistes de los viernes, por las salidas en grupo que tanto bien me han hecho.

A Dani y Delfi, grandes biotecnólogas de la vida, con quienes he compartido momentos de mucha alegría. Ellas han sabido estar de éste lado, y del otro lado, ocupando, desde lo personal, lugares eternamente valiosos.

A Miguel y a Domingo por haber aportado la cuota agronómica de este trabajo y quienes han sabido resolver, con la paciencia de la que carezco, muchos de los problemas que se nos fueron presentando, colaborando desinteresadamente siempre.

Al Sr. Alberto Dittrich, gran amigo e incondicional compañero de trabajo. Por el tiempo dedicado a regar “las Arabidopsis” y, lo más importante, por estar en el laboratorio con un exquisito mate lavado y tibio, esperando mi llegada todas las mañanas en el INTA.

Al grupo de Mejoramiento Genético del INTA, al cual me he unido hace unos años y donde encontré algo más que un grupo de trabajo: a Lucrecia, a Chiquito y a todos los chicos de trigo, gracias por los asados, por estar en cada cumpleaños y por compartir ese cálido vínculo construido desde el cariño permanente, donde hacerse parte y sentirse cómodo es un privilegio para mí.

A mis padres, quienes me apoyaron en todo momento con palabras que solo una mamá o un papá pueden decir. Gracias por ser la piedra fundamental de todos mis valores, por su nobleza infinita, guiándome, alumbrando cada camino con la tenacidad, la perseverancia y la humildad digna de los grandes. Y a mis hermanas, que sin ellas, nada, absolutamente nada de esto hubiese sido posible. Sus aportes han sido técnicamente indescriptibles y aunque no tuve la suerte de tenerlas cerca, me acompañaron constantemente con su cátedra de consejos llenos de sapiencia. Gracias Chaza y Cech por mostrarme que no necesito piernas, cuando tengo alas para volar.

A mis soles, para quienes sobran las palabras... Agus, el aire que respiro, y Facu, la luz de mis ojos, mis motores y mi inspiración infinita, siempre.

Finalmente, quiero agradecer a la persona que transita la vida a mi lado todos los días, porque supo acompañarme siempre, porque caminar hacia la resiliencia, nuestra gran utopía, ha sido más fácil a su lado. Porque juntos pudimos, y vamos a poder, con todos y cada uno de los desafíos que se nos presenten. Porque me permite ser como soy, pero fundamentalmente, porque entendimos, juntos, que el presente es lo único que tenemos. Gracias Santi, por seguir ramoneando en familia, apostando una vez más a la oruga perlada, acompañándome en el mayor de todos los desafíos: escoltar a los maestros universales, nuestros hijos.

ANTECEDENTES

El trabajo de investigación que se describe en esta tesis ha sido realizado en el Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LAMAEC) de la Facultad de Ingeniería, en la Cátedra de Biología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (Universidad Nacional de Entre Ríos) y en el Laboratorio de Genética, Biotecnología y Mejoramiento Vegetal del INTA EEA, Paraná.

El mismo fue desarrollado en su mayor parte con fondos del PID UNER: 2131 dirigido por el Dr. Víctor H. Casco. Los resultados han sido dados a conocer parcialmente en las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos.

Publicaciones directamente relacionadas con el trabajo de tesis:

- ✦ **Acosta, M. G.**; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. (2007) *Estudio y caracterización de la naturaleza química de la adhesión celular polen-estigma en Arabidopsis thaliana*. Revista Científica Agropecuaria, 11 (2): 141-147
- ✦ **Acosta, M. G.**, Langhi, D.; Lassaga, S.; Casco y V. H. (2008) Caracterización morfológica de las estructuras reproductivas de *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Morphology*, 3 (26): 730-731.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Langhi, D.; Lassaga, S. y Casco, V. H. (2009) *El proceso de adhesión célula-célula en plantas: estudio morfológico del mecanismo de polinización en Arabidopsis thaliana*. Acta Microscópica, 18: 473-474.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Langhi, D.; Lassaga, S. y Casco, V. H. (2010) *Estudios bioinformáticos y morfológicos en la caracterización del mecanismo de polinización como un proceso de adhesión célula-célula en Arabidopsis thaliana*. Revista Científica Agropecuaria; 14 (1): 5-14.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M.; Lassaga, S. y Casco, V. H. (2012) *PUB16 gene expression under abiotic stress and their putative role as an ARM repeat protein in Arabidopsis thaliana self-pollination pathway*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 3 (5): 609-619.

- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M.; Mistrorigo, D.; Lassaga, S. y Casco, V. H. “Gibberellins modulate gene expression of proteins PUB-ARM in *Arabidopsis*” (en redacción, 2015)

Presentaciones en congresos nacionales e internacionales:

- ✦ **Acosta M. G.**, Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Estudio y caracterización de la naturaleza química de la adhesión celular polen-estigma en Arabidopsis thaliana*. V Reunión de comunicaciones Científicas y III Reunión de Extensión de la FCA – UNER. Oro Verde, Argentina. 12 de junio de 2007.
- ✦ **Acosta, M. G.**, Langhi, D. A.; Lassaga, S. L. y Casco V. H. *Caracterización morfológica de las estructuras reproductivas de Arabidopsis thaliana*. XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas, I Congreso Nacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas y I Encuentro de Histotecnólogos. Córdoba, Argentina. 14 al 16 de mayo de 2008.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Langhi, D. A.; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Caracterización inicial del mecanismo de polinización en Arabidopsis thaliana como un proceso de adhesión celular*. XIII Reunión Latinoamericana y XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Rosario, Argentina. 21 al 24 de septiembre de 2008.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Langhi, D.; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Estudios bioinformáticos y morfológicos en la caracterización del mecanismo de polinización como un proceso de adhesión célula-célula en Arabidopsis thaliana*. VI Reunión de Comunicaciones Científicas y IV Reunión de Extensión de la FCA- UNER. Oro Verde, Argentina. 10 de junio de 2009.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Langhi, D.; Lassaga, S. y Casco, V. H. *El proceso de adhesión célula-célula en plantas: estudio morfológico del mecanismo de polinización en Arabidopsis thaliana*. 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy - 1st Congress of the Argentine Society of Microscopy SAMIC - CIASEM, Rosario, Argentina. 25 al 28 de octubre de 2009.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M. A.; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Efecto del estrés abiótico sobre la expresión de genes que codifican para proteínas con*

repeticiones armadillo en A. thaliana. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV– RAFV). La Plata, Argentina. 26 al-29 de septiembre de 2010.

- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M. A.; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Analysis of putative biological role of conserved armadillo repeats proteins in Arabidopsis thaliana*. 2° Congreso de Bioinformática y Biología Computacional. Córdoba, Argentina. 11 al 13 de mayo de 2011.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M. A.; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Análisis de la expresión de la súper-familia de proteínas con repeticiones armadillo en tejido floral de A. thaliana*. VII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas y V Reunión de Extensión de la FCA. Oro Verde, Argentina. 14 de junio de 2011.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M. A.; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Análisis de la expresión de la súper-familia de proteínas con repeticiones armadillo en tejido floral de A. thaliana*. Jornadas INEXA - XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Ciudad del Este, Paraguay. 25 al 27 de octubre de 2011.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M. A. Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Microscopía de epifluorescencia como herramienta para la cuantificación de granos de polen en A. thaliana*. 2° Congreso Argentino de Microscopía SAMIC. Buenos Aires, Argentina. 18 al 20 de abril de 2012.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M. A. Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Analysis of putative biological role in pollen-stigma interaction of arm- repeats proteins in Arabidopsis thaliana*. VI International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology. Montevideo, Uruguay. 26 al 29 de abril de 2012.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Ahumada, M. A. Lassaga, S. L. y Casco, V. H. *Web-based gene-expression analysis using the plant biology analysis tools: Genevestigator 3°* Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional. Oro Verde, Argentina. 26 al 28 de septiembre de 2012.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Mistrorigo, D. M., Pacheco, M. G. y Casco, V. H. *Estudio de la expresión génica de pub16 en Arabidopsis thaliana bajo estrés abiótico y su rol en los mecanismos de polinización*. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Argentina. 13 al 16 de septiembre de 2015.

- ✦ Acosta, M.G.; Mistrorigo, D.M.; Pacheco, M.G; Lassaga, S. L. y Casco V. H. *AtARM-Proteins Gene Expression in the A. thaliana Pollination Process under Gibberellins Stress*. SAIB, Mar del Plata, Argentina. 3 al 6 de noviembre de 2015.

Publicaciones y presentaciones a congresos nacionales e internacionales relacionadas indirectamente con el trabajo de tesis

Las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos no contienen resultados volcados en este manuscrito de tesis. Sin embargo, las herramientas y conocimientos adquiridos por la participación en estos trabajos fueron aplicados a la obtención de esos resultados.

- ✦ Paravani, E. V; **Acosta, M. G.**; Díaz Zamboni, J. E. y Casco, V. H. (2010) *Aislamiento, clonado y expresión de la proteína recombinante para el factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF-8) de Bufo arenarum*. Revista Ciencia y Tecnología, 12: 17-22.
- ✦ Paravani, E. V.; Viale, L.; **Acosta, M. G.**; Gervasoni, L. y Barbagelata, H. *Estudio físico – químico de aguas subterráneas de la provincia de Entre Ríos – Argentina por espectrofotometría de absorción atómica*. Argentina y Ambiente. Mar del Plata, Argentina. 28 de mayo al 01 de junio de 2012.
- ✦ Diaz Zamboni, J. E., Bugnon, L., Paravani E., Galetto, C., Adur, J., Bessone, V., Bianchi. M., **Acosta, M. G.**; Laugero, S., Casco, V.H. e Izaguirre, M. F. *Software integration to bioimage management, processing and analysis*. 3° Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional. Oro Verde, Argentina. 26 al 28 de septiembre de 2012.
- ✦ Milisich, H. J.; Gioco, L.; **Acosta, M. G.**; Gallardo, M.; Schutt, L. y Bessone, V. *Programa de mejoramiento genético en el INTA*. Simposio Latinoamericano de Canola. Passo Fundo, Brasil. 18 al 22 de agosto de 2014.
- ✦ **Acosta, M. G.**; Bessone, V.; Gioco, L.; Gallardo, M.; Schutt, L. y Milisich, H. *Bioteología aplicada a los programas de mejoramiento de trigo y colza en INTA Paraná*. V Congreso Nacional e Internacional de Agrobiotecnología, Propiedad Intelectual y Políticas Públicas. Paraná, Argentina. 28 y 29 de agosto de 2014.

- ⊕ **Acosta, M. G.;** Dittrich, A.; Gieco, L. y Milisich, H. *Selección de genotipos de trigo con resistencia durable a roya de la hoja utilizando el gen Lr 34.* XLV Congreso Argentino de Genética. Bariloche, Argentina. 20 al 24 de octubre de 2014.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ANTECEDENTES	4
ÍNDICE	9
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMECLATURA	14
RESUMEN	16
ABSTRACT	20
INTRODUCCIÓN	23
Mecanismos de Adhesión Celular en Plantas	23
Mecanismo de Polinización en Brassicaceae	26
Aspectos estructurales del desarrollo floral	26
Reproducción sexual: polinización	31
Proteínas ARM en eucariotas	44
Proteínas ARM en plantas	46
Factores que Modifican la Expresión Génica de Proteínas ARM	48
Proteínas DELLA	50
Ligasas de Ubiquitina E3 de plantas	54
PUBs en <i>Arabidopsis</i> (AtPUBs) y su rol durante el estrés abiótico	57
Tolerancia al estrés abiótico mediado por ubiquitinación de proteínas	58
Proteínas PUB-ARM	60
PUB-ARMs en <i>A. thaliana</i>: AtPUB-ARMs	60
OBJETIVOS	63
MATERIALES Y MÉTODOS	64

Variantes de Plantas	64
Condiciones de Crecimiento	65
Cultivo de plantas en sustrato	65
Cultivo de plantas <i>in vitro</i>	65
Técnicas de Microscopia	66
Microscopia óptica directa de luz transmitida (MO)	66
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	68
Ensayo de Polinización por Microscopía de Epifluorescencia	68
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	69
Estudios Bioinformáticos	69
Análisis de Secuencia	69
Predicción de Estructuras Secundarias y 3D	70
Análisis filogenético	70
Análisis de Ácidos Nucleicos	70
Extracción de ADN genómico (ADNg)	70
Extracción de ARNs totales	71
Cuantificación de Ácidos Nucleicos	72
Tratamiento de los ARNs con ADNasa	72
Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)	73
Amplificación de fragmentos de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	73
Análisis de Proteínas	75
Extracción de proteínas totales de <i>A. thaliana</i>	75
Cuantificación de proteínas totales	75
Técnicas electroforéticas	76
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	76
Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes	76
Electroforesis y cuantificación de proteínas ARMs en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)	77
Electrotransferencia a membranas de PVDF	78
Inmunodetección	78

Tratamientos Experimentales	79
Giberelinas (GA)	79
Ácido Abscísico (ABA)	80
Estrés salino	80
Inmunofluorescencia de Proteínas ARM	80
Caracterización fenotípica de la mutante <i>pub16</i>	82
Análisis Estadístico	83
RESULTADOS	84
Caracterización de la naturaleza química de la adhesión polen-estigma en <i>A. thaliana</i>	84
Morfología e Histología de las Estructuras Reproductivas Involucradas en el Contacto Polen-Estigma en <i>A. thaliana</i>	87
Morfología del polen y estigma utilizando MO y MET	87
Caracterización del Polen y el Tubo Polínico por MEF y MEB	91
Estudio de Proteínas con Repeticiones Armadillo en <i>A. thaliana</i>: AtARMs	93
Caracterización funcional de la familia de proteínas AtARMs, utilizando herramientas bioinformáticas	93
Predicción de estructuras secundarias y terciarias de proteínas AtARMs	98
Estudio de la expresión proteica y génica de AtARMs homólogas a BnARC1 presentes durante la interacción polen-estigma	101
Selección y evaluación de los ensayos de tratamiento hormonal y estrés salino	103
SDS-PAGE e Inmunodetección de AtARMs	106
Ensayos de polinización utilizando MEF bajo diferentes condiciones de tratamiento hormonal y estrés salino	110
Expresión génica de la calosa sintasa Cal5S responsable de la síntesis de calosa en los tejidos florales de <i>A. thaliana</i>	112
Caracterización de los patrones de expresión génica de AtPUB-ARMs bajo diferentes tratamientos hormonales y estrés salino	113
Expresión génica de AtPUB-ARMs (RT-sqPCR)	114
Estudio de la expresión de genes candidatos para interactuar con AtARMs	117
Estudios de las AtARMs por inmunofluorescencia	121
Cuantificaciones por RT-qPCR de la expresión génica de <i>AtPUB16</i> en genotipos salvajes y mutantes de <i>A. thaliana</i>	123
Ensayo de polinización para diferentes genotipos de <i>A. thaliana</i>	124
Inmunofluorescencia para la detección de proteínas At-ARMs en genotipos mutantes de <i>A. thaliana</i>	125
Caracterización fenotípica de la mutante <i>pub16</i>	127
Estudio de la expresión génica de <i>AtPUB8</i>	129

DISCUSIÓN	132
Adhesión celular durante la polinización	132
Naturaleza química lipoproteica de las moléculas que intervienen en la interacción polen estigma en <i>A. thaliana</i>	132
Morfología e histología de las estructuras reproductivas involucradas en el contacto polen-estigma	137
Adhesión del grano de polen al estigma	140
Proteínas con repeticiones armadillo en <i>A. thaliana</i>: AtARMs	143
AtPUB16 se encuentra filogenéticamente relacionada a BnARC1	143
AtPUB16 posee dominios y estructura 3D similares a BnARC1 y AtPUB17	146
Las AtARMs muestran diferentes patrones de expresión proteica en función del tratamiento aplicado, aunque sólo GA favorece la interacción polen-estigma	148
El agregado exógeno de GA induce significativamente la expresión génica de AtPUB16, AtPUB19 y AtPUB2	153
La expresión génica del receptor quinasa ARK3 no se modifica frente a los diferentes tratamientos, mientras que la expresión génica de EXO70A1 resulta dependiente de GA	160
Los niveles de expresión de AtPUB8 aumentan la SC en genotipos de <i>A. thaliana</i>	162
Análisis de las variables reproductivas de las plantas mutantes pub16	163
Los niveles relativos de expresión génica de AtPUB16 no muestran variación frente al agregado de GA en las mutantes <i>pub16</i> y <i>gid1a</i>	164
Las proteínas AtARMs se expresan en estigmas de plantas salvajes de <i>A. thaliana</i> tratadas con GA, en respuesta al contacto con el grano polen	166
Los genotipos mutantes <i>pub16</i> y <i>gid1a</i> de <i>A. thaliana</i> no expresan significativamente proteínas AtARM y el número de granos de polen adheridos por estigma disminuye	168
Posible rol de AtPUB16 en el mecanismo de SC	169
CONCLUSIONES	172
CONCLUSION GENERAL	175
ANEXO I	176
Oligonucleótidos utilizados en reacciones de amplificación de PCR, RT- <i>q</i> PCR y para verificación de mutantes.	176
ANEXO II	178
Composición de las soluciones y medios de cultivo utilizados.	178

ANEXO III

Grupos de AtARMs y sus correspondientes pesos moleculares obtenido de las bases de datos TAIR y UNIPROT. 181

BIBLIOGRAFÍA 182

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y NOMECLATURA

ABA	ácido abscísico (del inglés, <i>Ab</i> <u>s</u> <i>cisic</i> <u>A</u> <i>cid</i>)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa A	ribonucleasa A
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ABS	albúmina sérica bovina
cm	centímetros
col.	colaboradores
dATP	desoxiadenosinatrifosfato
dNTP	desoxinucleótidostrifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	fuerza centrífuga por aceleración de gravedad
GA	giberelinas (del inglés <i>G</i> <u>i</u> <i>bberellic</i> <u>A</u> <i>cid</i>)
FAA	<u>F</u> ormaldeído- <u>A</u> cético- <u>A</u> lcohol etílico
h	hora
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N´-(2-etanosulfónico)
mA	mili amperes
min	minuto
ml	mililitro/s
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimoles
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
ng	nanogramos
nm	nanómetros
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>P</i> <u>o</u> <i>lymerase</i> <u>C</u> <i>hain</i> <u>R</u> <i>eaction</i>)

PM	peso molecular
rpm	revoluciones por minuto
RT-qPCR	retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés, <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>)
RT-sqPCR	retrotranscripción seguida de PCR semicuantitativa (del inglés <i>semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
s	segundo
SAM	meristema apical del tallo
SDS	dodecil sulfato de sodio
T _{amb}	temperatura ambiente
U	unidad/es
UV	ultravioleta
V	voltios
v/v	volumen en volumen
vol	volumen/es
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrómetros
µM	micromolar
°C	grados centígrados

A lo largo de este manuscrito se ha adoptado la siguiente convención al referirnos a proteínas, genes salvajes y mutantes:

Proteínas: se escriben con mayúscula. Ej: BnARC1.

Genes: se escriben con mayúscula e itálica. Ej: *AtPUB16*.

Genes mutantes: se escriben con minúscula e itálica. Ej: *gid1a*.

RESUMEN

La adhesión celular en las plantas es un hecho esencial en la comunicación célula-célula. Existen diferentes tipos de adhesión que pueden ocurrir en las células vegetales: entre la pared celular y un sustrato, entre dos paredes celulares, y entre la pared celular y la membrana plasmática. La adhesión se ha propuesto como un paso clave en la reproducción de las Angiospermas al mediar el contacto inicial del grano de polen al estigma. La polinización es un paso crucial en el ciclo de vida de las plantas y constituye la interacción célula-célula más importante de las plantas con flores, donde el éxito de la reproducción sexual depende de múltiples interacciones entre el grano de polen y los diferentes tejidos del pistilo. Estas interacciones pueden ser proteína-proteína, como por ejemplo ligando-proteína quinasa o pueden involucrar moléculas tan simples como agua, iones calcio, lípidos y azúcares. Luego de dicha adhesión, se produce una comunicación cruzada entre ambas estructuras, que culmina con el rechazo o la aceptación del grano de polen propio. En el primer caso, conocido como mecanismo de autoincompatibilidad (SI) se produce una cascada de señalización altamente caracterizada en especies de *Brassica*. En el segundo, se produce la aceptación del polen propio y es conocido como mecanismo de autocompatibilidad (SC) y aún no ha sido caracterizado en profundidad. En el mecanismo SI participan proteínas que pertenecen a la superfamilia de proteínas con repeticiones armadillo (ARM). Esta superfamilia, está presente tanto en animales como plantas, y se sabe que desempeñan un papel clave en varios procesos celulares incluyendo la transducción de señales, la regulación de la organización del citoesqueleto, los mecanismos de importación nuclear, la regulación transcripcional y la ubiquitinación. Una alta proporción de los dominios ARM en plantas se encuentran coexistiendo con dominios U-box, desempeñando funciones especializadas, la mayoría de ellas como ligasas de ubiquitina E3 (PUB-ARM). Al presente, permanecen sin asignar las funciones biológicas de muchas proteínas ARM y muchos estudios recientes han remarcado su importancia en múltiples procesos (SI, señalización hormonal, resistencia a enfermedades, etc.) y

han mostrado que la mayor parte de las ARMs de *A. thaliana* poseen dominios U-box (AtPUB-ARMs), desempeñando roles como ligasas de ubiquitina E3.

En este trabajo de tesis, utilizando herramientas bioinformáticas, se encontraron 113 polipéptidos pertenecientes a esta superfamilia de proteínas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (AtARMs). Como objetivo general del presente estudio, se propuso la caracterización del mecanismo de adhesión celular en una especie SC y asimismo, estudiar en el proceso de polinización el posible rol biológico de las proteínas AtARMs. Para ello se caracterizó inicialmente la naturaleza química de la interacción polen-estigma, corroborando que se trata de un contacto de tipo lipoproteico. Paralelamente, se llevaron a cabo estudios morfológicos utilizando técnicas de microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido, mediante los cuales se detectaron particularidades, no descritas previamente, de la interacción polen-estigma entre las que se destaca la discontinuidad de la traza osmiofílica del contacto y se corroboraron otras, como la reorganización de la red vacuolar en las papilas estigmáticas, con reorientación de éstas hacia el punto de contacto con el grano de polen. Por técnicas bioinformáticas, se determinó la existencia de proteínas AtARMs putativas relacionadas filogenéticamente con ARC1, una ligasa de ubiquitina E3 que participa en el mecanismo de SI en *Brassica*. Mediante técnicas de inmunodetección, se caracterizaron tres grupos de proteínas AtARMs con diferentes rangos de pesos moleculares, los cuales mostraron perfiles diferenciales cuando se somete a las plantas a tratamiento hormonal y estrés salino. En el presente trabajo, los estudios de expresión génica utilizando RT-*sq*PCR mostraron que, del conjunto de transcritos que codifican para las AtPUB-ARMs más relacionadas filogenéticamente con BnARC1 y que aumentaron sus niveles de expresión proteica bajo diferentes tratamientos, el polipéptido que emergió como candidato a estudiar fue AtPUB16. Esta posible ligasa de ubiquitina E3 mostró elevados niveles de expresión génica con el agregado exógeno de GA en plantas salvajes donde, por técnicas de inmunofluorescencia, se detectaron proteínas ARM en el interior de las papilas del estigma durante el contacto con el grano de polen, estando ausentes en condiciones normales de crecimiento. Asimismo, se observó por microscopia de epifluorescencia un aumento significativo de granos de polen adheridos cuando se somete a las plantas

a tratamiento con GA. Para corroborar el posible rol de esta molécula, se utilizaron mutantes en el gen *pub16* en los que no se verificaron incrementos de su expresión, ni en el número de granos de polen adheridos, ante el tratamiento con GA, comparada con los genotipos salvajes. En los mutantes, usando técnicas de inmunofluorescencia no se detectó la presencia de proteínas ARM en el interior de las papilas. Asimismo, mutantes en el receptor *gid1a* mostraron, para ambos tratamientos, un número de granos de polen adheridos similar al genotipo salvaje sin tratamiento con GA. Esto sugiere que la activación de la expresión génica de *AtPUB16* sería mediada por GA.

En un análisis posterior, y con el objetivo de encontrar posibles moléculas blanco para la ligasa de ubiquitina E3 *AtPUB16*, se observó que en flores sometidas a tratamiento con GA se verifica un aumento significativo de la expresión génica de *EXO70A1*, un homólogo de *EXO70* de *B. napus*, involucrado en la actividad secretora de las papilas estigmáticas, sugiriendo su posible participación en la vía de hidratación del polen propio en *A. thaliana*.

En un estudio complementario se analizó, tanto en *A. lyrata* como en *A. thaliana*, la expresión génica de los transcritos correspondientes a *AtPUB8* una molécula implicada en la pseudo-autocompatibilidad (PSC) en especies SI. En dicho estudio se determinó que los niveles de expresión génica de esta proteína no exhiben diferencias significativas en flores de *A. lyrata* (una especie SI), tanto en condiciones normales como sometidas al tratamiento con GA. Por el contrario, se observaron aumentos significativos en la expresión de los transcritos correspondientes a *AtPUB8*, en presencia de GA en genotipos salvajes de *A. thaliana*. Dado el rol de *AtPUB8* como regulador de la transcripción del receptor SRK en los procesos de PSC, su aumento en una especie SC, podría sugerir su participación en vías que refuerzan la SC en *A. thaliana*.

Los hallazgos presentados en esta tesis doctoral, permiten comenzar a dilucidar el rol clave de las proteínas ARM en el mecanismo de polinización de *A. thaliana* y asimismo, la sensibilidad diferencial que este conjunto de moléculas tienen frente a diferentes condiciones de tratamiento. En particular, se determinó que *AtPUB16* actuaría como una ligasa de ubiquitina E3, clave en la promoción de los contactos polen-estigma en

flores de *A. thaliana* sometidas a tratamiento con GA, potenciando los mecanismos de autopolinización.

ABSTRACT

Cell adhesion in plants is an essential fact in cell-cell communication. Different types of adhesion can occur in plant cells, namely: between cell wall and substrate, between two cell walls, or between cell wall and plasma membrane. Adhesion has been proposed as an essential step in the angiosperms reproduction, mediating the initial contact between the pollen grain and the stigma. Pollination is a crucial step in the life cycle of plants, being the most important cell-cell interaction in flowering plants, where the success of sexual reproduction depends of multiple interactions between the pollen grain and different pistil tissues. These interactions can be protein-protein, such as ligand-protein kinase, or may involve simple molecules such as water, calcium ions, lipids and sugars. After that adhesion, a cross communication between the two structures is generated, culminating in the rejection or acceptance of own pollen grain. In the second one, the acceptance of own pollen is produced and is known as a self-compatibility (SC) mechanism, and has not been characterized in depth yet. In the SI mechanism are involved proteins belonging to the superfamily of armadillo repeats (ARM) proteins. This superfamily, is present in both animals and plants, and is known to play a key role in several cellular processes, including signal transduction, cytoskeletal organization regulation, nuclear import mechanisms, transcriptional regulation and ubiquitination. Plant ARM domains are frequently coexisting with U-box domains and performing specialized functions, most of them as E3 ubiquitin ligases (PUB-ARM). At present, the biological roles of many ARM proteins remain unassigned and many recent studies have highlighted their importance in multiple processes (SI, hormone signaling, disease resistance) and have shown that most *A. thaliana* ARMs possess domains U-box (AtPUB-ARMs), playing roles as E3 ubiquitin ligases. In this thesis, using bioinformatic tools, 113 polypeptides belonging to this superfamily of proteins in the *A. thaliana* (AtARMs) genome, were identified. The general objective of the present study, was the characterization of the cell adhesion mechanism in a SC species and also, to study the possible biological role of AtARM proteins in the pollination process. To this, it was initially characterized the chemical nature of the

pollen-stigma interaction, confirming that it is a lipo-protein contact. In parallel, morphological studies using conventional optical, electron transmission and scanning microscopy techniques were conducted. Using these approaches, were detected particularities of the pollen-stigma interaction not previously described, as the discontinuity osmiofilic stands trace of the contact, and others corroborated, as the vacuolar network reorganization on the stigmatic papillae in the point of contact with the pollen grain. By bioinformatic techniques, the existence of putative AtARMS proteins, phylogenetically related to BnARC1, an E3 ubiquitin ligase involved in the SI mechanism, was determined. By immunodetection techniques (immunoblotting and immunohistochemistry), three groups of AtARMS proteins with different molecular weights were characterized showing different expression profiles when plants are subjected to hormone treatment and salin stress. In this work, the gene expression studies using RT-*sq*PCR showed that, from all transcripts of AtPUB-ARMS phylogenetically more related to BnARC1 and whose protein expression levels become increased under abiotic stress, AtPUB16 emerged as a candidate to be studied. This putative E3 ubiquitin ligase exhibits high levels of gene expression in wild plants GA treated, where by immunofluorescence techniques, ARM proteins were detected inside stigma papillae during contact with the pollen grain. Such proteins are absent in plant stigmas under normal growth conditions. By epifluorescence microscopy it also was observed a significantly increased number of adhered pollen grains in stigmas of plants subjected to GA treatment. To corroborate the possible role of this molecule, *pub16* mutants were used. In such GA treated plants, compared to wild types, no increases expression, or the number of pollen grains adhered were verified. Furthermore, the *gid1a* receptor mutants showed, for both treatments, a number of pollen grains adhered, similar to untreated wild genotype. This suggests that activation of AtPUB16 gene expression would mediated by GA.

In a further analysis, and in order to find possible target molecules for the E3 ubiquitin ligase: AtPUB16, it was observed than in flowers under treatment with GA, the gene expression of EXO70A1, a homolog of EXO70 of *B. napus*, which is involved in the secretory activity of the stigmatic papillae, was significantly increased. This suggest their possible involvement in the hydration path of the own pollen in *A. thaliana*. In a

complementary study, the gene expression of *AtPUB8*, a molecule involved in the pseudo-self-compatibility in SI species, was studied both in *A. lyrata* and *A. thaliana*. In this study, it was determined that the gene expression levels of this protein does not exhibit significant differences in *A. lyrata* flowers (a SI species), both in normal conditions or GA treatment. In contrast, *AtPUB8* expression significantly increases in *A. thaliana* under GA treatment. Because of the *AtPUB8* role as a transcription regulator of the SRK receptor in the pseudo-self-compatibility (PSC) processes, their increase in a SC species could suggest its involvement in ways that could enhance the SC in *A. thaliana*.

The findings presented in this Doctoral Thesis, allow begin to elucidate the key role of ARM proteins in the pollination mechanism of *A. thaliana* and also, their differential sensitivity to various conditions. In particular, it was determined that *AtPUB16*, act as an E3 ubiquitin ligase promoting the pollen-stigma interactions in *A. thaliana* under GA treatment, enhancing the selfing mechanisms.

INTRODUCCIÓN

MECANISMOS DE ADHESIÓN CELULAR EN PLANTAS

Los mecanismos de adhesión celular, en su sentido más amplio, incluyen tanto las interacciones célula-célula como las de célula-matriz extracelular (MEC). Ambos contactos son fundamentales en los tejidos animales, donde desempeñan diversas funciones. En la actualidad se sabe que las moléculas de adhesión celular (cell adhesion molecules, CAMs) además de su clásica función, actúan como receptores de señales, provocando cambios en el citoesqueleto y según se ha determinado más recientemente, participando en la regulación de la expresión génica. Para la mayoría de los eucariotas vegetales y los hongos, la estrecha yuxtaposición de las membranas plasmáticas de células adyacentes es poco frecuente ya que las células están rodeadas por una pared celular. Cuando el contacto directo se lleva a cabo entre las células, como ocurre en las plantas a través de los plasmodesmos, no se ha reportado que lo hagan vía proteínas homólogas a las CAMs de las células animales. Aunque recientemente se han caracterizado proteínas con un alto grado de homología con las CAMs en protozoos, algas y metazoos (Huber y Sumper, 1994; Escobar y col., 2003; Harwood y Coates, 2004).

Sin embargo, la adhesión celular puede ser considerada un mecanismo esencial en la comunicación célula-célula en las plantas, tanto como lo es en los animales (Lord y col., 1996). Pueden reconocerse diferentes tipos de adhesiones entre las células vegetales: la que se da entre la pared y un sustrato, entre dos paredes celulares y entre la pared y la membrana plasmática. Así, las interacciones célula-MEC en las plantas son más frecuentes que las interacciones célula-célula. En las algas, se han informado varios tipos de moléculas que participan en la adhesión celular tales como proteoglicanos (Wustman y col., 1998), peroxidasas (Fowler y Quatrano, 1997), polifenoles-polisacáridos ácidos (Vreeland y col., 1998) y algunas proteínas con homología a las CAMs de animales (Huber y Sumper, 1994). Las lectinas han sido reportadas como moléculas involucradas tanto en el reconocimiento y en la unión a proteínas

sintetizadas por las células vegetales, como en la interacción con células bacterianas en la formación de nódulos radicales (Hirsch, 1999). En el caso de la adhesión intercelular en las plantas, las pectinas de la lámina media participan como moléculas de unión entre las células (Knox, 1997; Willats y col., 1999; Fry y col., 1993; Satoh, 1998; Sinha y Lynch, 1998). En los procesos de reproducción sexual de las plantas, varias moléculas con propiedades adherentes han sido aisladas, incluyendo la proteína arabinogalactano: TTS (Cheung y col., 1995), y las proteínas PEX-extensina del polen (Rubinstein y col., 1995). Por otro lado, se ha propuesto la participación de moléculas lipofílicas para mediar la adhesión del grano de polen al estigma en el género *Arabidopsis* (Zinkl y col., 1999).

Debido a la rigidez de las paredes celulares de las plantas, las asociaciones estables entre las células vegetales no parecen requerir la formación de enlaces al citoesqueleto, tales como los proporcionados por los desmosomas y uniones adherentes de las células animales (Cooper, 2013). En las plantas, los contactos entre las células se producen debido a la presencia de plasmodesmos, estructuras en las que aún no han sido caracterizadas proteínas con grados de homología significativos con las CAMs animales (Escobar y col.; 2003).

Todos los organismos multicelulares poseen alguna forma de MEC. Los tejidos de las plantas se encuentran asociados mediante una extensa MEC, denominada pared celular. Sin embargo, la naturaleza de esta pared difiere en las distintas especies de plantas y aun en los distintos tejidos de una misma planta.

La pared celular vegetal ha sido clásica- y erróneamente considerada como una estructura inerte. Se le han atribuido funciones limitadas relacionadas al soporte mecánico de protección y apoyo; aunque pese a sus diferencias estructurales y bioquímicas se la ha comparado con la MEC de las células animales. Actualmente, los estudios estructurales, bioquímicos y funcionales de la pared celular durante la ontogenia de las plantas y su comportamiento en respuesta a los diferentes ambientes a los que está sometida, han llevado a reevaluar su rol y permiten describirla como un componente celular clave en la comunicación celular y la regulación de procesos durante el desarrollo y crecimiento de estos organismos (Carpita y Gibeaut, 1993; Roberts, 1994).

Tanto en animales como en plantas, la MEC es estructuralmente compleja, en los primeros, la MEC se compone principalmente de glicosaminoglicanos (GAG), tales como ácido hialurónico y proteínas fibrosas, tales como el colágeno. Los GAGs forman una matriz de tipo gelatinosa dentro de la cual se encuentran embebidas las proteínas fibrosas. Las paredes celulares de las plantas tienen una estructura análoga (Figura 1). En este caso, la matriz gelatinosa la conforman las pectinas, heteropolisacáridos altamente cargados, en la que se incrusta un entramado de fibrillas de celulosa y de hemicelulosa a las que se asocian una serie de proteínas, algunas de las cuales se ha propuesto que cumplen papeles estructurales fundamentales. La función principal de esta MEC es proporcionar soporte y resistencia mecánica a las células. Su estructura de gel hidratado le confiere resistencia a la compresión, mientras que los componentes fibrosos proporcionan fuerza de tracción. La MEC en células animales también sirve como un sustrato para la adhesión celular, la regulación de la migración celular y el control de la diferenciación celular así como también algunas funciones metabólicas (Naranjo y col., 2009). Como ya se indicó previamente, en el seno de la MEC, existen mecanismos que intervienen tanto en el anclaje de las células dentro del tejido, como actuando como sistemas de señalización entre la MEC y el citoesqueleto. Estos sistemas de señalización también participan en la comunicación célula-célula y median las respuestas celulares a diversos estímulos, tales como la tensión mecánica. Los requisitos para las moléculas de señalización celular son diferentes en células vegetales y animales, ya que en las primeras los mecanismos de conexión se dan a través de canales citoplasmáticos o plasmodesmos (Seymour y col., 2004).

En las plantas, se han descrito CAMs similares a las encontradas en las células animales, que desempeñan funciones en procesos altamente selectivos. Estas moléculas median tanto el reconocimiento de los gametofitos “propios” como los “no propios” en el proceso de polinización, así como en las posibles interacciones de agentes patógenos-hospedador. Una de las interacciones mejor documentadas, es el reconocimiento y rechazo del polen propio en las reacciones de autoincompatibilidad, que se producen cuando se establece la interacción en la MEC entre el polen propio y las papilas del estigma (Barrett y Cruzan, 1994; Schopfer y col., 1999).

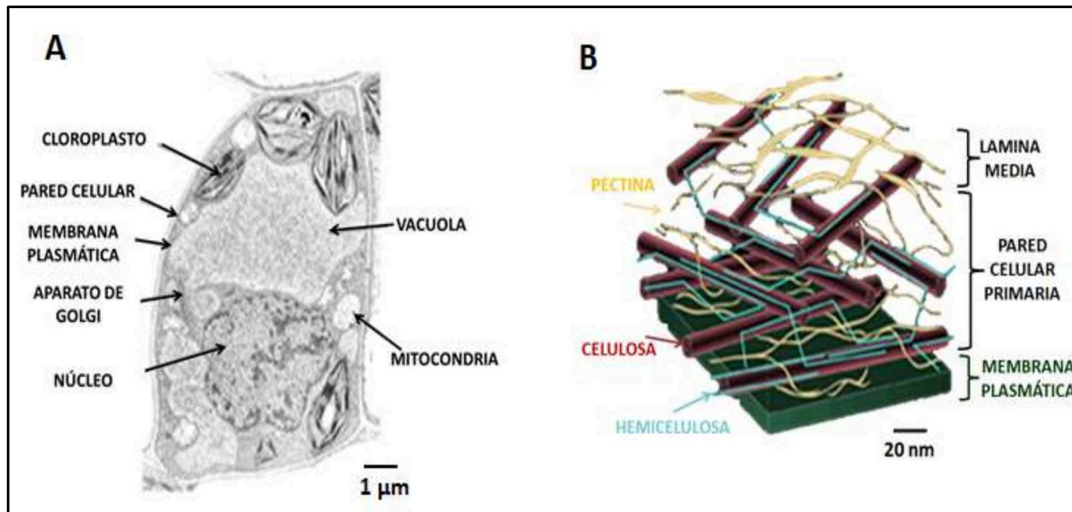


Figura 1: Pared celular vegetal. (A) Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de una célula vegetal. Se destacan la gran vacuola central, cloroplastos fusiformes cercanos a la membrana plasmática, mitocondrias, núcleo, aparato de Golgi y pared celular primaria. (B) Esquema que ilustra la composición de la pared celular. Las células están unidas entre sí por la laminilla media formada principalmente por pectato de calcio y magnesio. Sobre la laminilla media se forma la pared primaria que contiene tres clases principales de polisacáridos: celulosa, un polímero no ramificado de subunidades de glucosa que sintetiza y deposita en la pared la celulosa sintasa formando una estructura resistente (microfibrillas) pero que permiten el crecimiento celular; hemicelulosa y pectina, de composición variable, sintetizados en el aparato de Golgi y depositados en la pared a través de la secreción. Adaptado de Alberts y col., 2002.

En este sentido, el proceso de polinización emerge como un mecanismo multifactorial crítico para el estudio de CAMs en plantas (Harwood y Coates, 2004) y ha sido el mecanismo en el que se focalizará el presente trabajo de tesis.

MECANISMO DE POLINIZACIÓN EN BRASSICACEAE

Aspectos estructurales del desarrollo floral

Las brasicáceas (Brassicaceae) o crucíferas (Cruciferae) son una familia de angiospermas dicotiledóneas incluidas en el orden Brassicales. Constituyen un grupo monofilético con aproximadamente 338 géneros y 3.709 especies de plantas, preponderadamente herbáceas, distribuidas en todo el planeta, aunque particularmente concentradas en regiones de regímenes templados a fríos. Incluyen cultivos hortícolas, ornamentales, oleaginosos, forrajeros y condimentos de gran importancia económica. *A. thaliana*, la especie vegetal considerada como organismo modelo en investigaciones moleculares y biológicas de las plantas vasculares superiores, se encuentra dentro de esta familia (Figura 2).

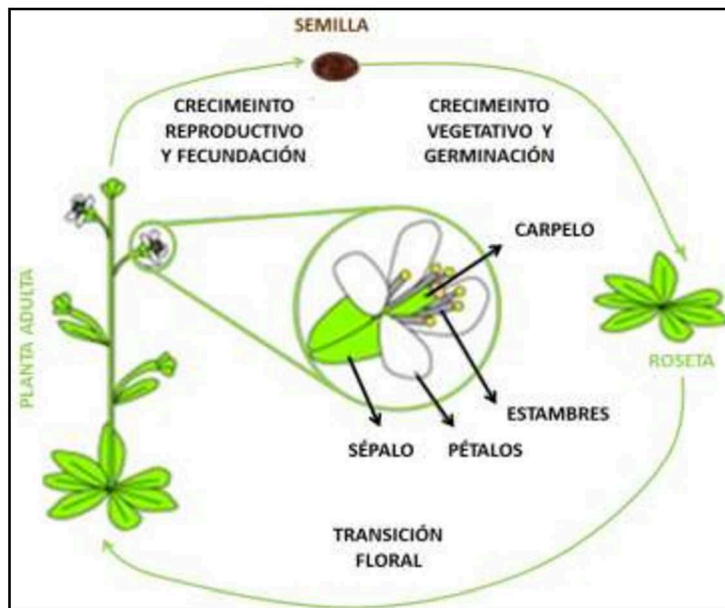


Figura 2: Esquema del ciclo de vida y arquitectura de la flor de *A. thaliana*.

Después de la germinación de la semilla, la planta crece en tamaño durante la fase vegetativa. Al recibir señales del ambiente y endógenas, la planta se somete a la transición floral (el cambio de crecimiento vegetativo al reproductivo) lo que resulta en la formación continua de flores en la inflorescencia. Una típica flor se compone de sépalos, pétalos, estambres y carpelos (desde el más externo de los anillos al más interno). Por lo general, los sépalos protegen la flor, mientras que los pétalos atraen a los insectos para la polinización a través de sus colores brillantes. Los estambres y carpelos, son responsables de la fecundación para la generar descendencia a través de la producción de semillas viables. Adaptado de Liu y col., 2009.

Las flores son las estructuras de las plantas de mayor complejidad estructural y son los órganos responsables de la distinción del linaje de las angiospermas, respecto del resto de las plantas. El primer paso para la formación de las flores es la transición entre el meristema vegetativo y el meristema apical de la inflorescencia, a partir del cual se formarán los meristemas florales. En la figura 3 se resumen los factores ambientales y genéticos que regulan la formación de los meristemas de inflorescencia (MI) y florales (MF) (Liu y col., 2009).

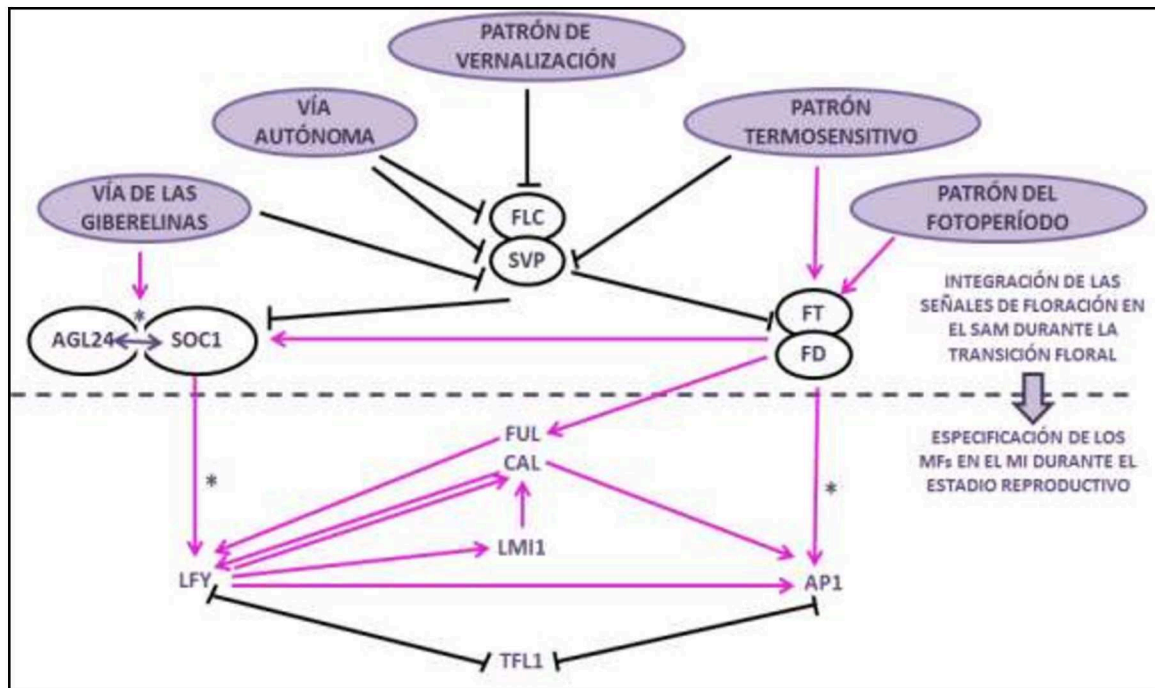


Figura 3: Regulación de la identidad del meristema floral (MF). Se da por la integración de múltiples señales de floración que sensan las señales del entorno y las del desarrollo a través de varias vías. Durante la transición floral, el complejo FLC-SVP reprime la expresión de SOC1 y FT en la hoja, mientras que el complejo FT-FD promueve la expresión de SOC1, AP1 y FUL en el meristema apical del tallo (SAM). La expresión de SOC1 y AGL24 se regulan positivamente el uno al otro, formando un complejo proteico, localizado en el SAM. En el meristema de la inflorescencia (MI), el aumento de la actividad de SOC1 y FT promueven la expresión de varios genes de identidad del MF, incluyendo LFY, AP1, CAL y FUL, que a su vez especifica la identidad del MF en los flancos del MI. Los asteriscos indican regulación transcripcional directa. AGL24: Agamous-Like 24; AP1: Apetala1; CAL: Cauliflower; FLC: Flowering Locus C; FT: Flowering Locus T; FUL: Fruitfull; LFY: Leafy; SOC1: Suppressor of Overexpression of Constans 1; SVP: Short Vegetative Phase. Adaptado de Liu y col., 2009.

Una vez que se han establecido los primordios florales, comienzan a expresarse los genes que confieren identidad a los diversos órganos florales (van Mourik y col., 2010). En *A. thaliana*, el modelo ABCDE explica la formación de los 4 verticilos florales (sépalos, pétalos, anteras y carpelos) y de los óvulos. Los genes de tipo A están representados por *APETALA1* (AP1) y *APETALA2* (AP2). Los de tipo B por AP3 y *PISTILLATA* (PI), los de tipo C por *AGAMOUS* (AG), los de tipo D por *SHATTERPROOF1* (SHP1), *SHP2* y *SEEDSTICK* (STK), mientras que los de tipo E, por los genes *SEPALLATA* (SEP1, SEP2, SEP3 y SEP4). En la figura 4 se muestra un esquema del patrón de expresión de estos genes y el de los órganos que determinan cada uno (Thompson y Hake, 2009).

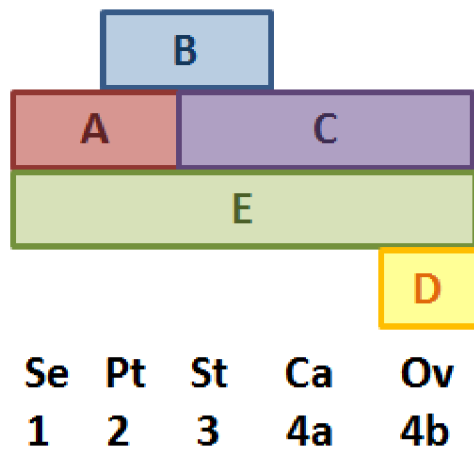


Figura 4: Modelo de desarrollo floral de *A. thaliana*. El modelo básico ABC postula que los genes de clase A especifican los órganos del verticilo 1, los de clase A y B especifican los órganos del verticilo 2, los genes de clase B y C especifican los órganos del verticilo 3, y los genes de clase C especifican los genes del verticilo 4. El modelo ampliado ABCDE incluye genes de clase D que promueven genes de identidad de óvulos y la clase E que actúan como cofactores para la clase A, B, C, y D. Verticilo 1: sépalos (Se); verticilo 2: pétalos (Pe); verticilo 3: anteras (An); verticilo 4a: carpelos (Ca); verticilo 4b: óvulos (Ov). Adaptado de Liu y col., 2009.

El establecimiento del patrón de expresión de los genes del modelo ABCDE permite la formación de los diversos órganos florales. El desarrollo de las flores de *A. thaliana* es un proceso complejo y para su estudio se han establecido 20 estadios (Figura 5) (Alvarez-Buylla y col., 2010). De los órganos florales que forman los 4 verticilos, los sépalos y los pétalos, forman el perianto. Ambos órganos tienen una estructura laminar simple, la cual está formada por la epidermis, las células del mesófilo y un fino patrón venular. Los 4 primordios de sépalos son los primeros que se forman, alrededor del estadio 3 del desarrollo. La epidermis de la cara abaxial de los sépalos presenta células con diferentes tamaños, algunas pequeñas y otras grandes y alargadas, que desarrollan estomas y tricomas. Los 4 pétalos se originan alrededor del estadio 5 del desarrollo floral. Las células de la epidermis adaxial son cónicas, mientras que las de la epidermis abaxial son aplanadas. Los estambres son los órganos reproductivos masculinos y sus primordios comienzan a desarrollarse a partir del estadio 5. Están formados por el filamento y la antera. Esta última es una estructura bilocular con dehiscencia longitudinal. A medida que los granos de polen se forman en las anteras (proceso dividido en 14 etapas en *A. thaliana*), el filamento se alarga hasta alcanzar la altura del gineceo en el estadio 13, donde se produce la dehiscencia de las anteras, la polinización y la antesis floral (Alvarez-Buylla y col., 2010).

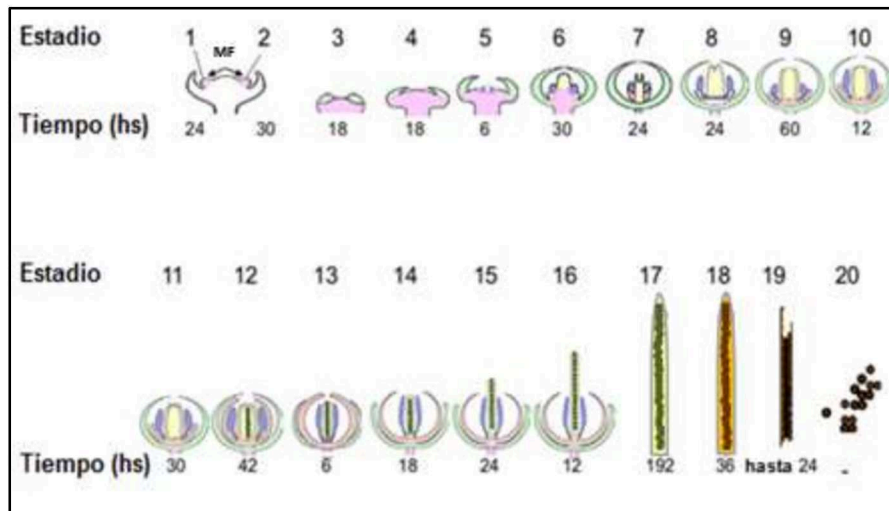


Figura 5: Representación esquemática de los estadios del desarrollo floral de *A. thaliana*. La formación del primordio floral ocurre en los estadios 1 y 2. En la etapa 3, los primordios de los sépalos ya son visibles y siguen creciendo hasta que encierran el meristema de la flor (estadios 4 a 6). En el estadio 5, los pétalos y primordios de estambres comienzan a ser visibles y comienza a formarse el gineceo (estadio 6). El desarrollo de órganos continúa hasta la etapa 9, en la que se diferencian las papilas estigmáticas en la parte superior del gineceo. En el estadio 12, los pétalos son similares en longitud a los estambres. La antesis ocurre en la etapa 13, donde se produce la fecundación. La apertura floral se produce en el estadio 14. Las silicuas alcanzan su tamaño máximo en el estadio 17, luego se deshidratan y se tornan amarillentas (estadio 18) hasta que las valvas se separan de las silicuas secas (estadio 19) y las semillas caen (estadio 20). Los meristemas florales (FM): rosa; sépalos: verde; pétalos: de color rosa; estambres: azul; gineceo: amarillo; óvulos: verde oscuro; semillas: naranja y marrón. Adaptado de Alvarez-Buylla y col., 2010.

El gineceo de *A. thaliana* es una estructura sincárpica, compuesta por dos carpelos fusionados. Se encuentra conectado a la base de la flor a través de un internodo corto denominado ginóforo. El ovario se encuentra en la parte superior de éste último y contiene entre 50 y 80 óvulos, constituyendo la mayor parte de la longitud del gineceo. El ovario está dividido longitudinalmente en dos por un *septum*, el cual se forma posgenitalmente (Figura 6). Las paredes de cada ovario se denominan valvas y la parte externa del *septum* corresponde al *replum*. En el extremo apical del ovario se ubican el estilo y el estigma. El estigma está formado por células epidérmicas alargadas y especializadas, llamadas papilas estigmáticas que forman una capa única. Esta superficie es la que recibe los granos de polen y permite su germinación. Una vez que esto ocurre, los tubos polínicos son guiados a través del tracto de transmisión hacia los óvulos. Luego de la fecundación, los óvulos se desarrollan en semillas y el gineceo se transforma en un fruto con dos cámaras, llamado vaina o silicua. Esta estructura se abre al madurar para liberar las semillas, a lo largo de 4 zonas de dehiscencia, constituidas por los finos márgenes de las valvas a cada lado del *replum*. La lignificación de las células de estas zonas específicas contribuye al proceso de

dehiscencia, generando una tensión mecánica que estimula el desprendimiento de las valvas (Ferrandiz y col., 2010).

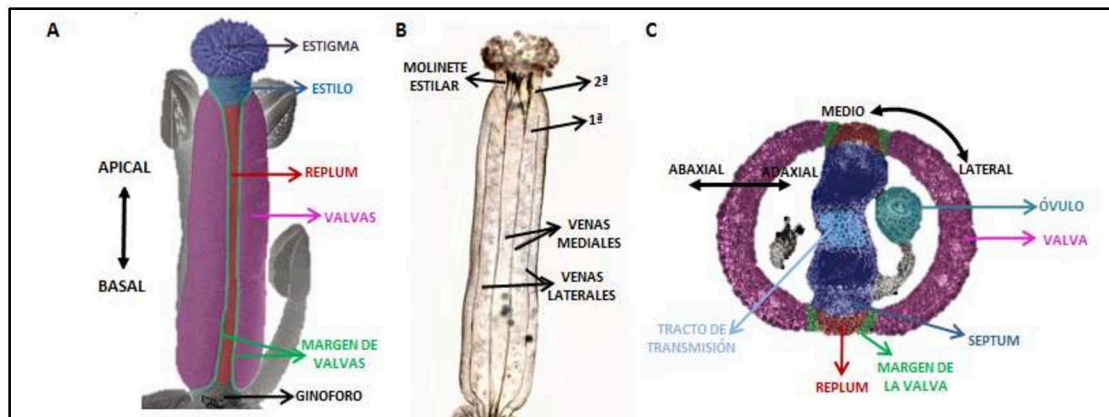


Figura 6: Estructura del gineceo de *A. thaliana*. (A) Microscopía electrónica de barrido del gineceo maduro en antesis. (B) Gineceo maduro en antesis, clarificado con hidrato de cloral para revelar el patrón vascular. Las bifurcaciones primarias y secundarias de las venas se indican con las flechas. (C) Sección transversal del ovario en antesis. En A y C el color es artificial para marcar dominios funcionales diferentes. Adaptado de Ferrandiz y col., 2010.

El primordio del gineceo se origina en el centro del meristema floral como un anillo de células que encierran una pequeña depresión y se desarrolla como un tubo abierto durante los estadios 6 a 8. En las regiones mediales internas del cilindro se forman y fusionan dos crestas meristemáticas opuestas, formando el *septum*. Los tejidos placentarios, que luego dan lugar a los óvulos, se desarrollan en las zonas donde se encuentran el *septum* y las valvas. En el estadio 9 comienza la diferenciación de las valvas, la placenta, el *septum*, el estilo y las papilas estigmáticas. En los estadios 11 y 12 se cierra la porción apical del gineceo, las papilas estigmáticas completan su desarrollo y el estilo se diferencia del ovario. El gineceo está completamente maduro en el estadio 13, al momento de la antesis, cuando ocurre también la fecundación. Todos los tejidos necesarios para la maduración del fruto y la dehiscencia se encuentran presentes en este estadio y completarán su desarrollo luego de la fecundación de los óvulos (Alvarez-Buylla y col., 2010).

Reproducción sexual: polinización

En las *Angiospermas*, el éxito de la reproducción sexual depende de una serie de interacciones entre el grano de polen y los diferentes tejidos del pistilo (estigma, estilo y ovario). La polinización comienza cuando las células del polen y del stigma entran en contacto, lo cual conduce a la germinación del tubo polínico. A diferencia de los

contactos célula-célula que median el desarrollo animal, estas interacciones son establecidas entre células con paredes complejas y matrices extracelulares.

El grano de polen

En las *Angiospermas*, los granos de polen maduros son usualmente células vegetativas que contienen en su interior las células espermáticas completas. Luego de la meiosis, este arreglo es llevado a cabo rápidamente, cuando una división mitótica asimétrica produce una gran célula que contiene en su interior una más pequeña, generativa. Esta última sufre luego mitosis para dar lugar a las dos células espermáticas rodeadas de una única pared, requeridas para la doble fecundación. En la madurez de las *Brassicaceae*, esta pared puede ser subdividida en tres estratos principales, cuyos espesores varían en las diferentes especies:

- **Intina:** constituye el estrato más interno de la pared, a menudo es una estructura multicapa que se localiza adyacente a la membrana plasmática del polen. Posee una composición relativamente simple, basada en microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectinas y hemicelulosa, secretadas por la microespora en el estadio de microespora vacuolada (Owen y Makaroff, 1995). En su parte exterior posee una gran cantidad de polisacáridos de diferente naturaleza (Sitte, 1989).
- **Exina:** es el segundo estrato de la pared, también posee estructura multicapa y está compuesta fundamentalmente de esporopolenina, un polímero químicamente resistente, que se encuentra interrumpida por aperturas llamadas cavidades. La esporopolenina está compuesta por polímeros formados a partir de hidrocarburos alifáticos, compuestos fenólicos y otros compuestos (Bedinger y col., 1994). Se caracteriza por ser extremadamente resistente y actuar como barrera protectora contra la deshidratación excesiva, las injurias bacterianas y fúngicas, durante la liberación del gameto masculino, previo a la fecundación (Bedinger, 1992). La exina se compone de dos capas (Figura 7): la más interna, nexina o endexina y la más externa, la sexina o ectexina que posee múltiples poros y pliegues (Furness y col., 2004, Punt y col., 2007). La esporopolenina es polimerizada a partir de precursores sintetizados y secretados por el *tapetum* e incorporados a la pared del grano de polen

después de la disolución de la tétrada (Scott y col., 1991) donde polimeriza en puntos específicos de la primexina (sexina) que sirve de punto de anclaje para el depósito de la esporopolenina conducente a formar el principal componente de la pared (Heslop-Harrison, 1968a; Heslop-Harrison, 1968b).

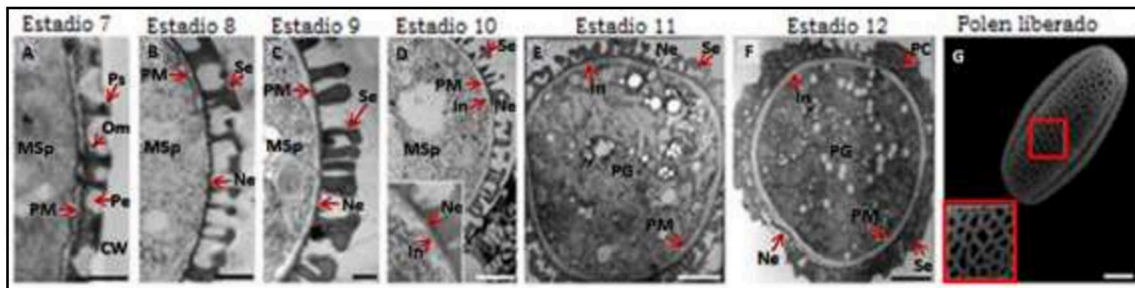


Figura 7: Microscopía electrónica de transmisión del grano de polen de *A. thaliana* en los diferentes estadios. Escala: 500 nm (A–C); 2 μ m (D–F). Microscopía electrónica de barrido del grano de polen se muestra en (G) donde se observa el reticulado. Barra de escala, 5 μ m. Ca, pared de calosa; DPG, grano de polen degenerado; In, intina; In?, materiales simil intina; MMC, células madre de microesporas; MSp, microespora; Ne, nexina; PC, cubierta del polen; Pe, primexina; PG, grano de polen; PM, membrana plasmática; Ps, pro-sexina; Se, sexina; T, tapetum; Tds, tétradas. Adaptado de Lou y col., 2013.

- Cubierta del polen o trifina:** es el estrato más externo de la pared, compuesta de lípidos, proteínas, pigmentos y compuestos aromáticos que se organizan en las cavidades de la exina. Esta es la estructura responsable de la mediación del reconocimiento por el estigma (Dobson y col., 1989; Preuss y col., 1993; Dickinson, 1995; Hülskamp y col., 1995; Stephenson y col., 1997). Antes de la anthesis del polen, se produce la transformación del *pollenkit* o trifina en la superficie de la exina (Blackmore y col., 2007), formando la cubierta del polen, la cual brinda resistencia a la desecación, mantiene la agregación de los granos de polen y colabora con la adhesión del polen a la superficie del estigma durante la polinización (Ma, 2005).

El pistilo: estigma, estilo y ovario

Los estigmas constituyen la superficie receptiva de los tejidos femeninos a la que se unen los granos de polen, mediando la migración del tubo polínico dentro del estilo. Los estigmas se clasifican generalmente en dos grupos: estigmas húmedos, cubiertos de células cuya lisis provoca la formación de una secreción viscosa, rica en proteínas, lípidos, polisacáridos y pigmentos sobre la superficie y los estigmas secos, cuyas células de recubrimiento se mantienen intactas. Éstas usualmente protruyen formando

papilas y están cubiertas por una pared celular primaria, una cutícula cerosa y una película proteica. Los estigmas han sido extensivamente estudiados en las plantas autoincompatibles, las que exhiben restricciones a los procesos endogámicos. Los estigmas incompatibles provocan el rechazo del polen propio por inhibición de su hidratación, germinación y el posterior crecimiento del tubo polínico (Nasrallah, 2000; Wheeler y col., 2001).

El estigma de *A. thaliana* se clasifica como un estigma seco, con células superficiales intactas que típicamente emergen como papilas y están cubiertas por una pared celular primaria, una cutícula cerosa y una película proteica (Edlund y col., 2004). Estas papilas son células alargadas, cada una de las cuales posee una única proyección receptiva a la unión del grano de polen. Los estigmas son asignados a una de las dos categorías basadas en la naturaleza de la MEC que los recubre. Los estigmas de tipo seco (ej.: *Arabidopsis*, *Brassica*, *Cucurbita*) no producen exudado y están recubiertos por una cutícula cerosa impermeable y una delgada película de naturaleza proteica (Edlund y col., 2004; Hiscock y Allen, 2008).

El estilo es una estructura tubular, que conecta el estigma con el ovario. Consta de un tejido externo o epidermis, un tejido intermedio o parénquima en el que se encuentran los vasos conductores y una zona central, ocupada por el tejido de transmisión, también de naturaleza secretora (Knox, 1984; Lord, 2000; de Graaf y col., 2001). El ovario es la parte inferior del pistilo. Tiene forma ovoide y en su interior hay dos cavidades (lóculos) donde se alojan los óvulos (Figura 8).

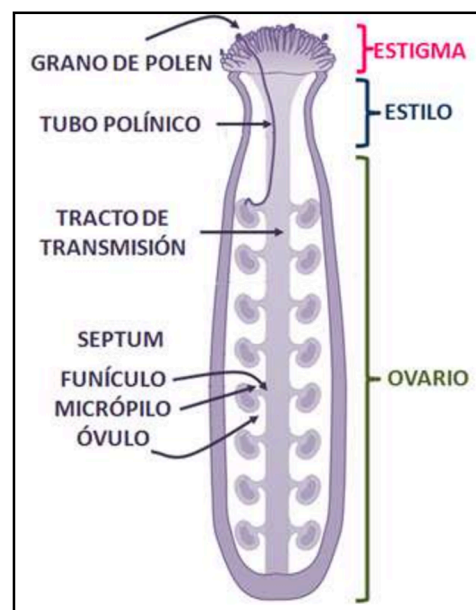


Figura 8: Pistilo de *A. thaliana*. Adaptado de Chapman y Goring, 2010.

Interacción polen-estigma

La aceptación del polen compatible y los subsiguientes pasos que conducen a una fecundación exitosa, constituyen un proceso complejo y cooperativo entre el grano de polen y el estigma receptivo. En el momento de la dispersión, los granos de polen

maduros de la mayoría de estas plantas autocompatibles, se encuentran altamente deshidratados. En la familia de las Brassicaceae, una vez que se deposita el grano de polen compatible sobre el estigma, la adhesión del grano de polen tiene lugar, seguido por la formación de un “pie” lipofílico, la posterior hidratación y germinación del grano de polen. El tubo polínico emerge y penetra en la superficie del estigma guiándose a continuación, a través del estigma, el estilo, el *septum* y finalmente el funículo para entrar en el micrópilo del óvulo donde puede ocurrir la fecundación (Figura 9).

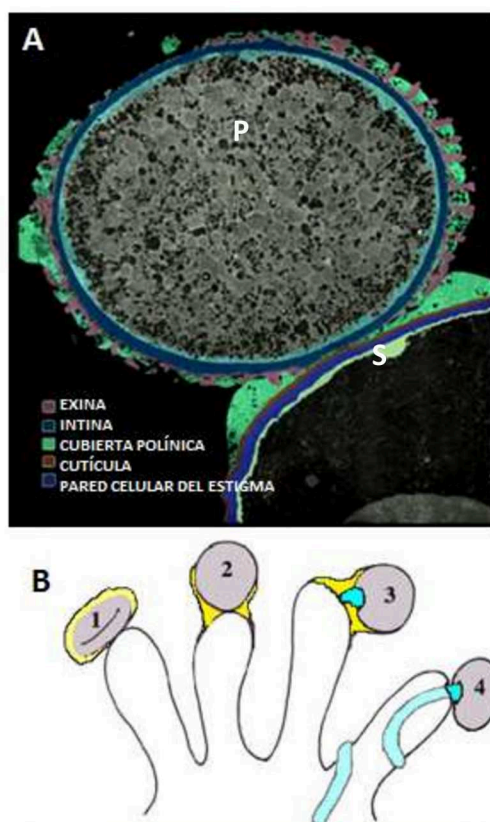
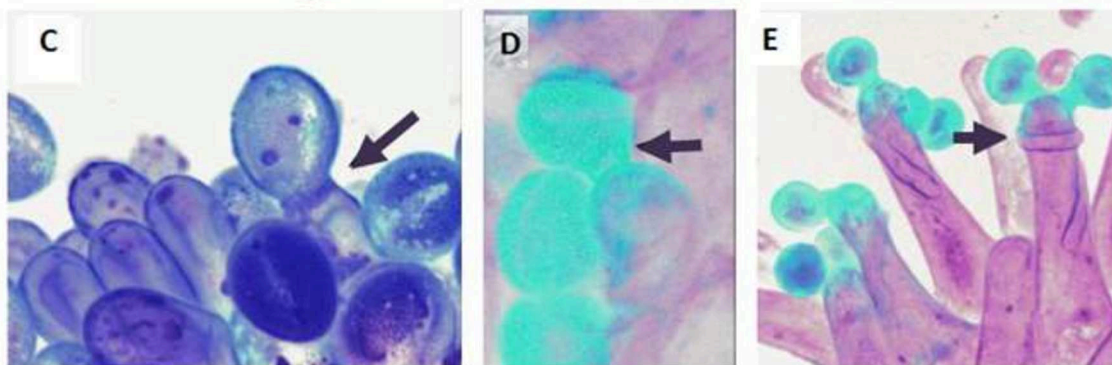


Figura 9: Polinización en *A. thaliana*. (A) Micrografía electrónica de transmisión que muestra el punto de contacto entre un grano de polen (P) y una papila del estigma (S), coloreada para resaltar la cubierta del polen (verde), intina (azul oscuro), exina (rosado), la pared celular estigma (azul claro), y la cutícula del estigma (marrón). Entre las dos superficies, se acumula un pie de compuestos ricos en lípidos (flechas). (B) Diagrama de los primeros eventos sobre una papila del estigma, incluyendo la adhesión (1), formación del "pie" por parte de la cubierta del polen e hidratación del mismo (2), emergencia del tubo polínico (3), y la invasión del tubo polínico por la pared celular de las papilas y la extensión hacia el estilo (4). (C-E) Secuencia de los primeros eventos durante la polinización *Arabidopsis*. (C) La cubierta del polen se ha movilizado al sitio de contacto entre el polen y el estigma, formando un pie entre las dos superficies (flecha), (D) El tubo polínico (flecha) ha surgido de la exina del grano y se proyecta en el papila del estigma, (E) tubos de polen (flecha) se abren paso hacia el estilo, moviéndose entre las paredes de las células de las papilas, donde se encuentran protegidos. Adaptada de Edlund y col., 2004.



Los acontecimientos secuenciales desde la adhesión del grano de polen, al crecimiento del tubo polínico a través del pistilo hasta el óvulo para la fecundación han sido cuidadosamente documentados a nivel ultraestructural tanto en *Brassica spp.*, como

en *A. thaliana* (Elleman y Dickinson, 1990; Elleman y col., 1992; Kandasamy y col., 1994; Hülskamp y col., 1995; Lennon y col., 1998). En cada uno de estos pasos, resulta necesaria la correcta diferenciación y formación de los tejidos reproductivos. Durante la polinización, los granos de polen se adhieren al pistilo y posteriormente se rehidratan reactivando de esta forma su metabolismo. En estigmas secos, la solución acuosa proviene de las células del estigma. Luego, los granos de polen hidratados germinan produciendo el tubo polínico. Esta estructura crece a través del estilo hacia el ovario. Una vez allí, el tubo polínico deposita las dos gametas masculinas en el interior del saco embrionario, donde tiene lugar la doble fecundación.

Las numerosas interacciones celulares que tienen lugar entre el grano de polen (o el tubo polínico) y los diferentes tejidos del pistilo a lo largo del proceso de fecundación involucran, probablemente, una compleja comunicación cruzada entre diversas moléculas. Estas interacciones pueden ser proteína-proteína, como por ejemplo ligando-proteína quinasa o pueden involucrar moléculas tan simples como agua, iones calcio, lípidos y azúcares (Gaude y McCormick, 1999).

Para capturar los granos de polen, los estigmas utilizan polinizadores bióticos y abióticos (como los insectos y el viento, respectivamente) generando, para retenerlos, interacciones adhesivas rápidas y fuertes. La interfase polen-estigma difiere de una especie a otra como resultado de una amplia variabilidad en la morfología y la composición del exudado del estigma, la exina del polen y la cubierta externa del mismo. Para investigar y analizar la adhesión polen-estigma, se han llevado a cabo métodos diferentes, incluyendo tratamientos químicos, lavados con detergentes y ensayos de adhesión basados en centrifugación (Luu y col., 1997a; Luu y col., 1997b; Zinkl y col.; 1999).

Las glicoproteínas receptoras símil locus S (SLR1, S locus-related *glycoprotein 1*) son sintetizadas en el estigma y participan en adhesión polen-estigma en las paredes celulares de las papilas estigmáticas maduras. Luu y col. (1999) utilizaron un ensayo biomecánico para probar la adhesión polen-estigma en *Brassica*, en las que la síntesis de la proteína SLR1 fue atenuada utilizando una construcción antisentido. En estos experimentos se demostró que la fuerza de adhesión del polen se encontraba significativamente reducida en las plantas cuya síntesis de SLR1 había sido bloqueada.

Dichos estudios llevaron a postular que estas proteínas participan en los mecanismos de adhesión del grano de polen al estigma de *Brassica*, posiblemente a través de la interacción con las proteínas de la cubierta del grano de polen (Seymour y col., 2004).

Procesos de polinización autocompatibles y autoincompatibles

La reproducción en *Angiospermas* es un proceso altamente selectivo. Los tejidos estigmáticos femeninos son capaces de discriminar entre los granos de polen, reconociendo y rechazando tanto los de las especies relacionadas, como de las alejadas evolutivamente (incompatibilidad interespecífica) o aún el de la misma planta (en especies autoincompatibles). Esta selectividad viene dada por una enorme diversidad de mecanismos en las superficies celulares de las estructuras reproductivas masculinas y femeninas.

La capacidad de una planta de ser fecundada por su propio grano de polen se denomina autocompatibilidad (*self-compatibility*, SC). La autoincompatibilidad (*self-incompatibility*, SI) es un sofisticado mecanismo de reconocimiento ampliamente utilizado por las plantas con flores para prevenir la autopolinización y, por lo tanto, es un mecanismo destinado a generar y mantener la diversidad genética dentro de las especies. La SI involucra un proceso de reconocimiento tanto del grano de polen “propio” como del “no propio” por el pistilo, arrojando específicamente el desarrollo del polen propio. Este mecanismo actúa como una barrera que evita el cruzamiento endogámico intraespecífico, previo a la fecundación y se lleva a cabo en aproximadamente la mitad de las plantas con flores. En dicho proceso, la evolución del carpelo tuvo importantes consecuencias para la biología reproductiva de las angiospermas al incrementar el aislamiento del gametofito femenino que contiene el saco embrionario en el interior del tejido esporofítico materno, complejizando el acceso al gametofito masculino. Esta separación física de los gametofitos femeninos y masculinos por el pistilo, habría otorgado un mayor nivel de discriminación por parte de la flor y habría dado lugar a la evolución de la interacción polen-pistilo (Heslop-Harrison, 1975), mediante una serie de complejas interacciones moleculares que constituyen efectivamente una comunicación entre el polen haploide y el pistilo diploide. Durante este proceso molecular tienen lugar diversos mecanismos de reconocimiento, a menudo asociados con los procesos activos de discriminación y

rechazo del polen incompatible tanto a nivel interespecífico como intraespecífico (Hiscock y Allen, 2008).

La interacción entre el polen y el pistilo es un proceso fundamental en la biología reproductiva de plantas con flores y ha sido objeto de una intensa investigación durante muchas décadas (Hiscock y Allen, 2008). En los últimos años se han producido numerosos progresos en la identificación de moléculas que median los eventos específicos de esta interacción, tales como la adhesión del polen, su hidratación y el crecimiento del tubo polínico a través del pistilo, así como en las involucradas en los mecanismos de autoincompatibilidad (SI) (Edlund y col., 2004; Swanson y col., 2004; Takayama y Isogai, 2005; Hiscock y Allen, 2008). La SI se produce cuando en la interacción polen-pistilo, este último reconoce y rechaza activamente al polen propio o el de individuos genéticamente estrechamente relacionadas. Cuando las flores de la especie que presenta autoincompatibilidad son morfológicamente idénticas entre sí, se dice que la autoincompatibilidad es homomórfica. Por el contrario, cuando en la especie se presentan dos o tres tipos morfológicos diferentes de flores, se dice que la autoincompatibilidad es heteromórfica (heterostilia). Existen dos tipos de incompatibilidad homomórfica: gametofítica (GSI) y esporofítica (SSI). El sistema GSI es característico de varias familias de angiospermas, como por ejemplo Solanaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Fabaceae, Onagraceae, Campanulaceae, Papaveraceae y Poaceae (Franklin-Tong, 2008). En estas, el fenotipo de SI del polen está determinado por su propio genotipo haploide. En la SSI el fenotipo de los granos de polen de una planta está determinado por el genotipo diploide de la antera que les dio origen. La SSI se ha identificado en las familias Brassicaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Betulaceae, Caryophyllaceae, Sterculiaceae y Polemoniaceae (Allen y col., 2011). La SSI, característica de las brasicáceas, previene tanto la autopolinización dentro de una flor, como entre flores de la misma planta así como la polinización cruzada entre plantas con el mismo tipo de incompatibilidad. Este mecanismo puede compararse con el sistema inmunitario presente en mamíferos debido a que la SI es conceptualmente similar a la interacción agente hospedador-patógeno, siendo el pistilo análogo al hospedador y el polen propio, análogo al agente patógeno invasor (Nasrallah, 2005). Los análisis genéticos clásicos han revelado que este reconocimiento está, en la

mayoría de los casos, controlado por un único *locus* multialélico: el *locus S*. Se ha postulado que el rechazo del polen ocurre cuando el alelo S se expresa tanto en el grano de polen, como en el pistilo con la misma especificidad. Estudios moleculares en varias especies SI de la familia Brassicaceae han revelado que el *locus S* de estas familias consiste en al menos dos genes altamente polimórficos: uno que codifica para la determinante masculina y otro para la femenina. Este complejo multigénico se hereda como una única unidad segregante y las variantes de este se denominan haplotipos S. Al presente, se han identificado más de cien haplotipos S en *Brassica rapa* (Nou y col., 1993). Se postula que las interacciones moleculares entre determinantes femeninas y masculinas codificadas por el mismo haplotipo S, son las responsables de desencadenar una respuesta SI (Takayama e Isogai, 2003).

Las primeras moléculas codificadas por el *locus S* en ser identificadas, fueron dos proteínas polimórficas expresadas específicamente en las células del estigma: la glicoproteína del *locus S*, SLG (*S-locus glycoprotein*), caracterizada inicialmente como una proteína soluble localizada en la pared celular y un receptor quinasa del *locus S*, SRK (*S-locus receptor kinase*), anclado a la membrana plasmática, cuyo dominio extracelular exhibe muchas similitudes con SLG. En las anteras, durante el desarrollo del grano de polen, se expresa una pequeña proteína rica en residuos de cisteína, SCR (*S-locus Cys-rich*), altamente polimórfica (Nasrallah, 2000). Una vez que se establece el contacto entre el ligando SCR de la superficie del grano de polen con SRK en la superficie del pistilo, se inicia la activación de una vía de señalización, ruta que incluye la proteína con repeticiones armadillo 1, BnARC1 (*Brassica napus arm repeat containing 1*), la cual se expresa específicamente en el estigma e interactúa con el dominio fosforilado de SRK en *B. napus* (Brugière y col., 2000). Las proteínas que contienen repeticiones armadillo (ARM) poseen en su región central un dominio de cuarenta y cinco residuos de aminoácidos denominado *armadillo* que se repiten de once a trece veces. Cada ARM tiene tres hélices alfa y múltiples ARM dispuestas en tándem que se pliegan en una estructura súperhelicoidal para conformar un dominio ARM (Huber y col., 1997). Esta nomenclatura fue utilizada inicialmente para describir las mutantes en el gen *ARMADILLO* de la familia de genes de polaridad de segmentos en *Drosophila melanogaster* (Nüsselin-Volhard y Wieschaus, 1980; Riggelman y col.,

1989). El gen *ARMADILLO* es homólogo al gen que codifica para β -catenina en mamíferos, la cual es requerida tanto para la adhesión célula-célula como para la regulación de la expresión génica durante el desarrollo (Conacci-Sorrel, 2002). Las figuras 10 y 11 representan los mecanismos de respuestas celulares de SC y SI postulados actualmente.

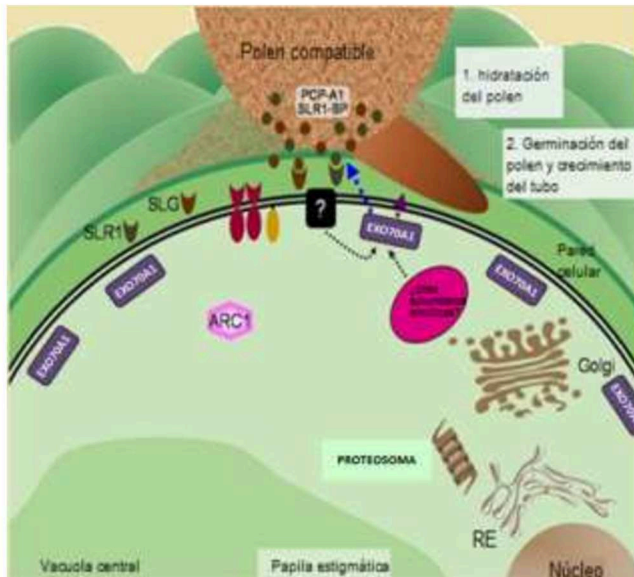


Figura 10: Modelo de la respuesta celular del grano de polen compatible. Cuando un grano de polen compatible se deposita sobre el estigma, factores putativos del polen se unen a receptores putativos de la papila estigmática activando el sistema de reconocimiento del polen compatible. Las proteínas PCP-A1 y SLR1-BP son conocidas por unirse a las proteínas estigmáticas SLG y SLR1 las que son necesarias para la adhesión del polen. EXO70A1 es requerida para promover la hidratación del polen y crecimiento del tubo polínico y puede funcionar como parte del complejo exocítico, liberando vesículas secretoras a la membrana plasmática para liberar factores esenciales para el grano de polen. Como resultado, ocurre la fecundación por el polen compatible. Adaptado de Samuel y col., 2008.

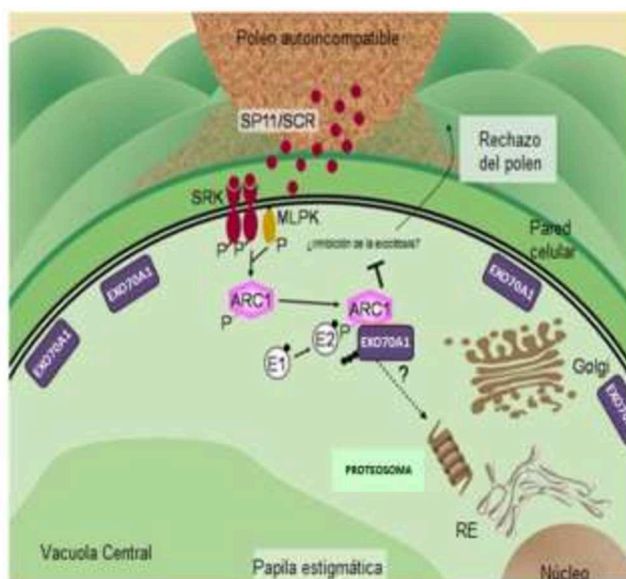


Figura 11: Modelo de respuesta celular del grano de polen autoincompatible. Cuando el polen propio se deposita sobre el estigma, el ligando del polen, SP11/SCR, se une al receptor quinasa del *locus S* (SRK). Ésta activa un patrón de señalización en la papila estigmática para el rechazo del polen. Las proteínas de señalización corriente abajo en esta vía incluyen la proteína quinasa del *locus M* (MLPK) y la ligasa de ubiquitina E3: ARC1. Cuando se activa ARC1, se inhibe EXO70A1 (un factor necesario para la hidratación del polen y su posterior crecimiento). Como resultado se previene la fecundación (y endogamia) del polen propio. Adaptado de Samuel y col., 2008.

En múltiples linajes de plantas con flores, como consecuencia de la autoesterilidad, han seguido el camino evolutivo que va desde la polinización cruzada obligatoria, a la autofecundación. Probablemente este es el camino evolutivo más común en los géneros de las plantas con flores. La transición de la autoesterilidad a la autofecundación es acompañada por una serie de cambios estructurales y funcionales

bien documentados en la organización floral (Levin y col., 1995). Adicionalmente, se ha reportado un mecanismo conocido como SI transitoria o parcial, fenómeno conocido como pseudo-autocompatibilidad (PSC) en el que las flores pierden su respuesta SI con el tiempo, lo que permite la autofecundación cuando han disminuido las oportunidades para la polinización cruzada (Levin, 1996; Good-Ávila y Stephenson 2002; Vallejo-Marín y Uyenoyama 2004; Igic y col., 2008).

A pesar de existir una componente genética para la pseudo-autofecundación, los grados de ocurrencia pueden ser influenciados por el ambiente externo y el estado fisiológico de la planta. La PSC a menudo responde positivamente al aumento de temperatura y a la reducción de la intensidad de luz (Levin, 1995). En líneas transgénicas de *A. thaliana*, Liu y col. (2007) mostraron que la PSC es influenciada por *AtPUB8*, un gen ligado al *locus S*, que codifica para una proteína AtARM con dominio U-box que regula los niveles de transcritos de SRK.

Proteínas ARM durante la interacción polen-estigma en Brassica

La proteína BnARC1 es una de las pocas proteínas ARM con dominio U-box a partir de la cual se ha determinado una función concreta. Funcionalmente, BnARC1 es una ligasa de ubiquitina E3, que en la vía de transducción de la señal actúa posteriormente al receptor quinasa SRK, promoviendo la ubiquitinación y degradación de proteínas durante el rechazo del polen autoincompatible en *Brassica sp.* (Mudgil y col., 2004). Como consecuencia de la fosforilación de BnARC1, pueden producirse dos situaciones dependiendo de la clase de SI: que el grano de polen no pueda germinar por falta de hidratación, o que pueda hidratarse y germinar, pero en estadios posteriores se inhiba el crecimiento del tubo polínico (Brugière y col., 2000).

La vía de transducción de señales que se desencadenan luego de la interacción polen-estigma, es similar a la que se lleva a cabo en las células animales, en las que la unión de ligandos produce la fosforilación del dominio quinasa de un receptor, llevando al reclutamiento de moléculas efectoras que participan posteriormente en la transducción de la señal. En especies autoincompatibles de *Brassica* es probable que SRK sea fosforilado después de la unión a SCR y que ésta fosforilación esté fuertemente regulada, ya que el efecto de la activación inespecífica de esta vía de

señalización resultaría en la obtención de plantas estériles. Claramente esta fosforilación debe estar finamente controlada en los estigmas, para evitar el rechazo espontáneo del grano de polen y es probable que en este proceso estén involucrados múltiples mecanismos de regulación (Kemp y Doughty, 2003).

La proteína BnARC1 se expresa específicamente en el estigma y fue identificada como una proteína de unión específica al dominio quinasa de los receptores SRK de especies de *Brassica*. Estas serina/treonina quinasas, por lo tanto, son requeridas para la respuesta de la SI que previene la autopolinización en las plantas. La unión de BnARC1 a SRKs *in vitro*, es dependiente de fosforilación y BnARC1 también es fosforilada por SRK. Este parecería ser el primer paso de la cascada de transducción de señales dentro de las células del estigma. La inhibición de la expresión de BnARC1 a través de construcciones antisentido produce una pérdida parcial de la SI, sugiriendo un rol como regulador positivo de dicha respuesta (Stone y col., 2003). BnARC1 podría ser direccionada al núcleo, ya que contiene tanto secuencias de localización nuclear que le permitirían interactuar y modificar diferentes proteínas nucleares, como señales de exportación nuclear que le permiten principalmente localizarse en el citosol para actuar junto con el proteosoma (Coates, 2003). Aunque estos procesos deben estudiarse más exhaustivamente, hay evidencias que sugieren que esta cascada finaliza regulando la actividad de acuaporinas en las células del estigma, limitando la disponibilidad de agua para la rehidratación del grano de polen incompatible (Wheeler y col., 2001).

Ubiquitinación durante la polinización

Las plantas han desarrollado complejas redes de señalización, como adaptación a su condición sésil, uno de los mecanismos de regulación de éstas se basa en la ubiquitinación de proteínas. BnARC1, además de las repeticiones armadillo involucradas en las interacciones proteína-proteína, también posee un dominio U-box (Stone y col., 2003). Como se describió previamente, estos dominios funcionan confiriendo propiedades de ubiquitinación a proteínas encargadas de marcar a otras proteínas blanco para su posterior degradación vía el sistema ubiquitina-proteosoma (*Ubiquitin/Proteasome System*: UPS). Se ha postulado, que es posible que BnARC1 marque proteínas específicas para la degradación, a través de su dominio U-box (Gu y

col., 1998; Stone y col., 1999; Stone y col., 2003; Mudgil y col., 2004). Los estudios *in vitro*, demuestran que esta molécula funciona como una ligasa de ubiquitina E3, pudiendo interactuar tanto con la maquinaria de ubiquitinación, como con las proteínas blanco. Esta actividad como ligasa de ubiquitina E3 requiere el dominio U-box. En células de tabaco cotransformadas con BnARC1 y SRK se ha observado colocalización de BnARC1 con el proteosoma. En el pistilo de especies de *Brassica*, polinizadas con granos de polen autoincompatibles se verifican incrementos en los niveles de proteínas ubiquitinizadas, comparados con controles polinizados compatibles y no polinizados. Este incremento no se observa en las plantas que expresan el antisentido para BnARC1 (Stone y col., 2003).

La función biológica propuesta para ARC1 durante la respuesta autoincompatible en *Arabidopsis* se muestra en la figura 12. *ARC1* fue identificado en el genoma de *Arabidopsis lyrata* y se encuentra deletado en los ecotipos Col-0 y C24 de *A. thaliana* (Kitashiba y col., 2011; Indriolo y col., 2012). *ARC1* se expresa en estigmas de *A. lyrata*, pero también se expresa en menores niveles en otros tejidos (Indriolo y col., 2012). Teniendo en cuenta que algunos ecotipos como Wei-1 y Old-1 contienen el gen que codifica para el receptor SRK funcional (Tsuchimatsu y col., 2010), se investigó si *ARC1* estaba presente en cualquiera de ellos. De los 357 diferentes ecotipos de *A. thaliana* evaluados, todos llevan la misma delección que resulta en un gen *BnARC1* no funcional. Estos hallazgos han permitido postular que la delección de *BnARC1* probablemente debió ocurrir antes que se diesen las diferentes mutaciones que inactivan *SP11*, *SRK* y *SCR* (Indriolo y col., 2012). Un análisis adicional sobre genomas secuenciados de otras especies de Brassicaceae autocompatibles reveló que en estas especies se observa que *ARC1* no es funcional debido a grandes delecciones o a múltiples mutaciones más pequeñas (Indriolo y col., 2012) mientras que, en las especies autoincompatibles el gen *ARC1* se encuentra intacto. En *A. lyrata*, *ARC1* resulta necesaria para el rechazo total de polen autoincompatible, apoyando la idea sobre la conservación del rol de *ARC1* corriente abajo de *SRK* en especies de *Brassica* y *Arabidopsis* (Indriolo y col., 2012). Se ha probado que la expresión en las papilas estigmáticas de la proteína EXO70A1 es clave para la aceptación del grano de polen compatible, convirtiéndola en un excelente blanco de *ARC1* en la vía de la

autoincompatibilidad (Samuel y col., 2009). Si la actividad de EXO70A1 se inhibe a través de la ubiquitinación por ARC1, entonces la actividad secretora requerida en la papila para la aceptación del grano de polen se bloquea interrumpiendo el contacto polen-estigma (Figura 12).

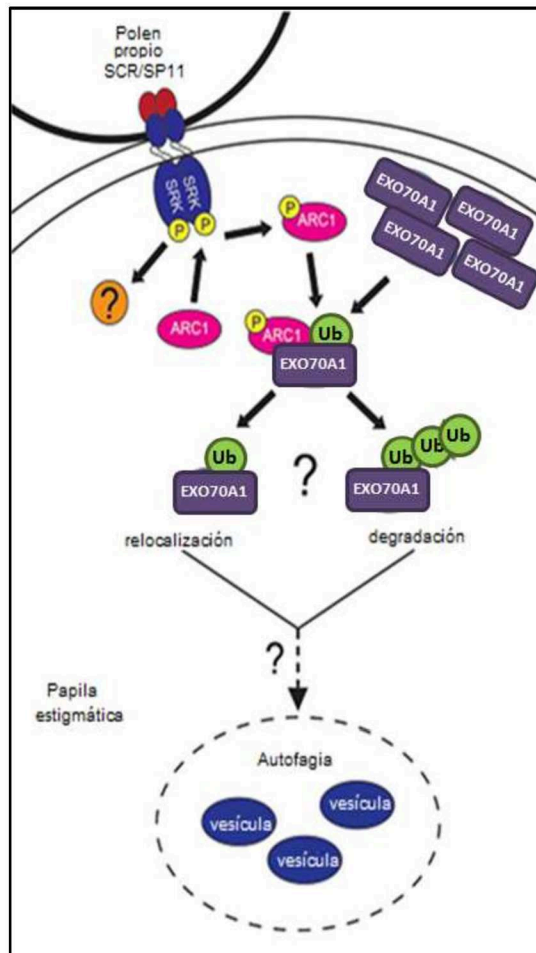


Figura 12: Modelo para la autoincompatibilidad en *Arabidopsis*. Luego del contacto entre el polen con la papila estigmática, ésta determina si el mismo es propio o no propio. Para un grano de polen propio, el ligando SCR/SP11 se une a SRK y éste luego es fosforilado. ARC1 interactúa con el dominio citoplásmico quinasa fosforilado de SRK y se torna fosforilado y activado. ARC1 recluta, como su proteína blanco para la ubiquitinación, a EXO70A1 que se localiza en la membrana plasmática para ser liberada por exocitosis. ARC1, con la cooperación de las enzimas E1 (de activación) y E2 (de conjugación) ubiquitina a EXO70A1. La naturaleza de esta ubiquitinación es desconocida, pudiendo ser tanto una monoubiquitinación que resulta en la relocalización, como poliubiquitinación que lleva a la degradación de EXO70A1 por el proteosoma 26S. Ambas vías, que conducen a la inhibición de EXO70A1, parecen activar una respuesta autofágica que lleva a la degradación de las vesículas secretoras. Existe asimismo otro factor (no conocido) que funciona corriente abajo de SRK en esta vía. Una vez que las vesículas secretoras han sido removidas, el grano del polen propio no recibe la fuente de hidratación necesaria para la germinación y como resultado será rechazado. Adaptado de Indriolo y Goring, 2014.

PROTEÍNAS ARM EN EUKARIOTAS

Los genes de las proteínas ARM se encuentran en los genomas de todos los organismos eucariotas. El análisis genómico de 52 de ellos revela que las repeticiones armadillo a menudo se asocian con una multiplicidad de dominios diferentes y algunos de estos arreglos, son únicos en plantas o animales. Las proteínas ARM se caracterizan por mediar diferentes procesos celulares, incluyendo la transducción de señales, la regulación de la organización del citoesqueleto, la importación nuclear, la regulación transcripcional y la ubiquitinación. Las proteínas ARM más conocidas incluyen a las α -importinas (que se encuentran en todos los eucariotas), β -catenina, plakoglobina y

proteína *adenomatous polyposis coli* (APC) (en metazoos); la proteína vacuolar de levadura 8 (VAC8P); y las proteínas U-box-ARM de plantas (Coates, 2003; Samuel y col., 2006). En la figura 13 se esquematiza la comparación funcional de proteínas ARM de plantas y animales.

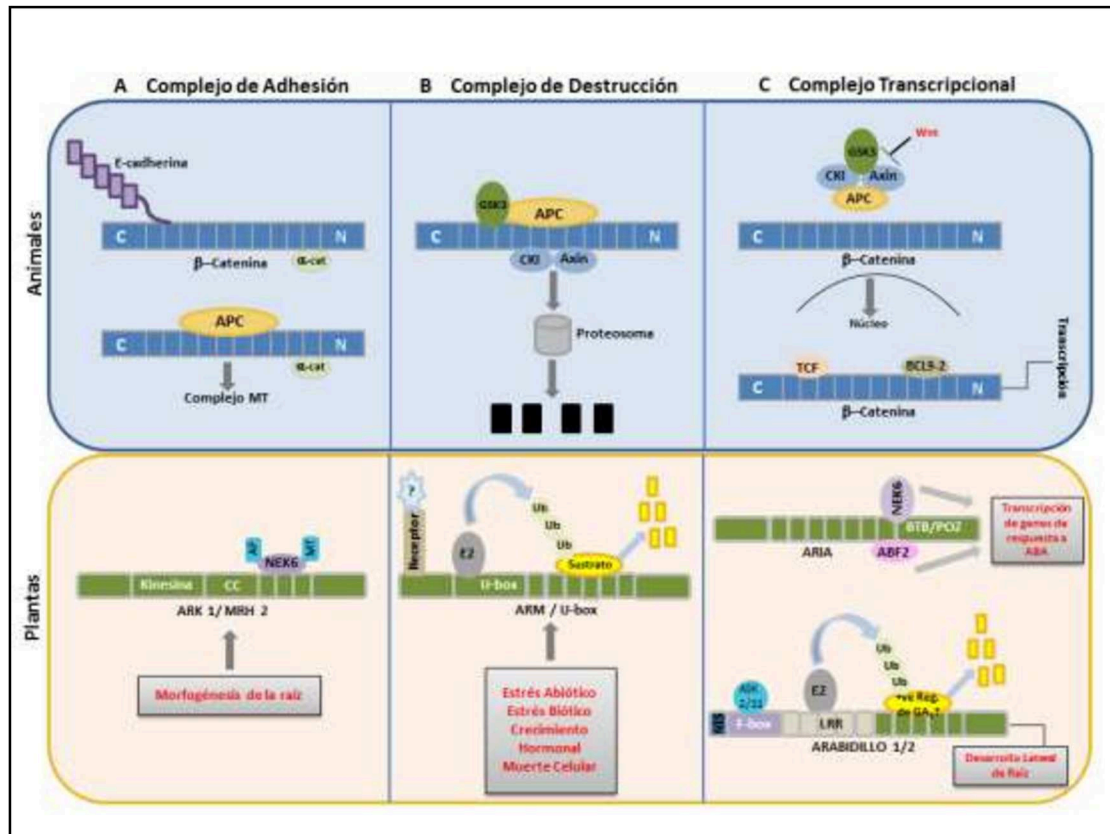


Figura 13: Comparación funcional de proteínas ARM en plantas y animales. (A): Complejo de Adhesión. En células animales, β -catenina se une a la cola citoplasmática de cadherina, facilitando su enlace con α -catenina. Además, β -catenina junto con APC interactúan con complejos de microtúbulos. En plantas ARK1/MRH2 interactúa con la proteína quinasa Nek6 mediando la morfogénesis de las células epidérmicas de la raíz. CC representan dominios *coiled-coil*. (B) Complejo Destrucción: β -catenina está destinada a la degradación proteosomal por un GSK3, APC, CKI, y el complejo Axina en el citoplasma. De forma similar en plantas, proteínas ARM/U-box, en respuesta a diversos estímulos, marcan proteínas para degradación proteosomal. (C) Complejo transcripcional: las señales de Wnt inhiben al complejo de destrucción, libera a β -catenina y ésta entra en el núcleo donde se enlaza con los reguladores transcripcionales para activar la transcripción de genes diana. En las plantas, ARIA una proteína ARM con dominio BTB/POZ que une a factores de transcripción ABF2 y Nek6, estimula la transcripción de genes de respuesta a ABA. Además, ARABIDILLO1/2 interactúa con ASK2/11 a través de su dominio F-box para mediar la degradación de posibles reguladores positivos de señalización por GA para promover la transcripción de genes relacionados al desarrollo lateral de la raíz. Adaptado de Sharma y col., 2014.

Las proteínas de la familia ARM han sido identificadas con múltiples dominios funcionales en más de una especie. Los estudios de los genomas completos de varias plantas muestran la existencia de un gran número de homólogos de *ARMADILLO* en

Physcomitrella patenas, *Arabidopsis* y *Oryza sativa* (Mudgil y col., 2004; Sharma y col., 2014).

Una de las hipótesis más aceptadas es que la familia de proteínas ARM, siendo evolutivamente conservada, desempeñe funciones similares en todos los organismos. Sin embargo, la existencia de familias ARM multigenicas con varias subfamilias en diferentes especies sugieren nuevas funciones específicas de estas proteínas en las plantas. Varios estudios recientes han revelado la función de numerosas proteínas ARM en *Arabidopsis* y arroz. Además de su papel análogo en la regulación de la expresión génica y el desarrollo de procesos, varias proteínas fueron caracterizadas, principalmente, en respuesta a estrés (Sharma y col., 2014).

Proteínas ARM en plantas

Como en otros organismos eucariotas, pueden predecirse una variedad de proteínas ARM en los genomas de plantas. Utilizando herramientas bioinformáticas para el análisis de los genomas secuenciados de *A. thaliana* (dicotiledónea), *Oryza sativa japonica* (monocotiledónea) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae, Volvocales), se ha podido determinar que las proteínas ARM exhiben un alto grado de conservación evolutiva aún en especies filogenéticamente tan distantes como las mencionados. Sin embargo, estas proteínas presentan algunas organizaciones de dominios que son únicos para organismos multicelulares como *Arabidopsis* y arroz.

Aún cuando esta familia de proteínas ha mostrado ser importante, las funciones generalmente son poco conocidas y sólo unas pocas ARM de plantas han sido bien caracterizadas. Estos incluyen ARC1 de *Brassica* (Gu y col., 1998), PHOR1 de papa (Amador y col., 2001), NtPUB4 de tabaco (Kim y col., 2003), SPL11 de arroz (Zeng y col., 2004), y UPL3/Kaktus, ARIA, e IMPa3/MOS6 de *Arabidopsis* (Downes y col, 2003; El Refy y col., 2003; Kim y col., 2004a; Palma y col., 2005). De dichos estudios se concluye que las funciones reguladas por la familia de proteínas ARM, comprenden una amplia gama de procesos biológicos (Samuel y col., 2006).

Sólo en *Arabidopsis* se han reportado más de un centenar de proteínas ARM, un subconjunto de las cuales ya han sido caracterizadas (Figura 14). Los estudios previamente detallados en la *A. thaliana*, *O. sativa*, *N. tabacum* y *B. napus* han

ayudado a clasificar las proteínas ARM en varios subgrupos específicos diferentes, sobre la base de otros grupos funcionales presentes junto con el dominio ARM. Tanto en arroz como en *A. thaliana*, el mayor grupo de proteínas con un motivo ligasa de ubiquitina E3 denominadas *plant U-box* (PUB) contienen diferentes ARMs en el extremo C-terminal, motivos que, como ya se ha indicado, están implicados en las interacciones proteína-proteína (Wang y col., 2015). Esto permite dirigir a una proteína para su degradación, funcionando como componentes del sistema UPS, un mecanismo bien conservado en la filogenia eucariótica. Aunque se ha llevado a cabo una considerable cantidad de trabajo para la caracterización de las proteínas de ARM en las plantas, las funciones de la mayoría de los miembros de esta familia aún no han sido dilucidadas (Zeng y col., 2008; Yee y Goring, 2009).

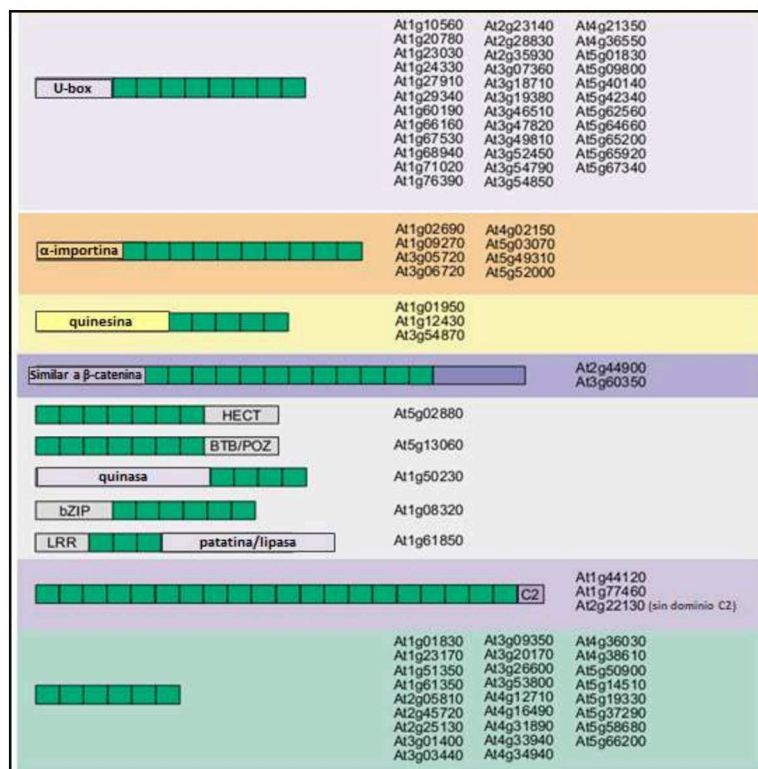


Figura 14: Proteínas ARM en *A. thaliana*. Genes putativos que codifican para proteínas con ARM en *tándem* recopiladas del genoma de *Arabidopsis*. Las proteínas ARM pueden subdividirse en base a su homología (entre sí y con las proteínas de otros organismos). Fondo azul claro: predice proteínas similares a PHOR1/ARC1 que contienen U-box-; fondo naranja: familia de la importina-alfa; fondo amarillo: las proteínas con un dominio kinesina; fondo azul oscuro: proteínas ARM con similitud a catenina beta; fondo gris: proteínas que contienen un motivo adicional además del ARM (dominio hect (Pfam PF00632), BTB/POZ (PF00651), serina / treonina quinasa (PF00069), bZIP (PF00170), repetición rica en leucina (LRR) (PF00560) y fosfolipasa tipo patatina (PF01734)); fondo malva: proteínas con cerca de 20 ARM (dos de las cuales también tienen un dominio C2 C-terminal); fondo verde claro: proteínas ARM, pero no hay otros motivos de proteínas reconocibles. En las diferentes categorías de proteínas, las cajas verdes indican ARM y las otras cajas de colores representan dominios adicionales. Adaptado de Coates, 2003.

Factores que Modifican la Expresión Génica de Proteínas ARM

Estrés salino

Las plantas, como se ha descrito previamente, han desarrollado una enorme capacidad para llevar a cabo su programa de desarrollo predeterminado genéticamente, a pesar de las condiciones cambiantes del ambiente. En consecuencia, son capaces de hacer frente a las condiciones ambientales, como los cambios en la salinidad (Kilian y col., 2007). Una de las posibles condiciones de crecimiento es el tratamiento frente a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), lo que aumenta la expresión de muchos genes para PUB-ARMs. Por ejemplo se han caracterizado genes (ej.: *PUB BG55* de *Bruguiera gymnorhiza*, *LjTDF-5* de *Lotus japonicus*) de plantas crecidas bajo condiciones de alta salinidad en las que se observa que exhiben, en respuesta a dicho estrés, un aumento de los niveles de expresión de los genes para proteínas ARM (Banzai y col., 2002; Bauer y col., 2007; Yee y col., 2009; Kojima y col., 2013).

Fitohormonas

Las diferentes hormonas de las plantas afectan procesos superpuestos, de manera tal que la acción de las mismas, depende de combinaciones específicas de diferentes hormonas, más que de la actividad independiente de cada una. En las últimas dos décadas, se han identificado numerosos componentes de las vías de transducción de señales de varias hormonas vegetales, llevando a la dilucidación de la señalización parcial o total de dichas cascadas. Estos

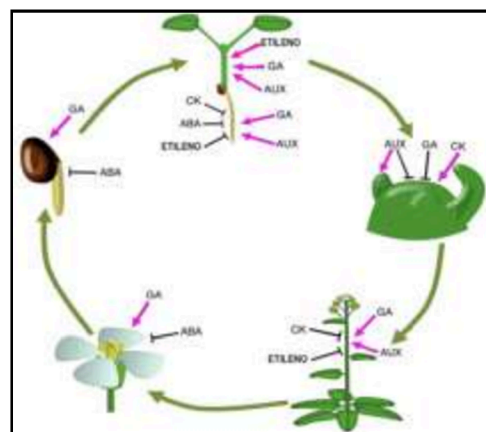


Figura 15: Efecto de algunas hormonas vegetales en el ciclo de vida de la planta.

GA: giberelinas, ABA: ácido abscísico, CK: citoquininas, AUX: auxinas. Adaptado de Weiss y Ori 2007.

hallazgos han proporcionado las herramientas para empezar a abordar los mecanismos de las vías de transducción. Dicha comunicación cruzada implica diversos mecanismos que actúan en la respuesta hormonal así como también a nivel de biosíntesis, creando una compleja red de respuestas. La figura 15 ilustra sobre cómo las giberelinas (GA)

interactúan con otras hormonas vegetales, el ácido abscísico (ABA), auxina, etileno, y citoquinina (Weiss y Ori 2007).

Ácido abscísico

El ABA ha demostrado ser un importante regulador del crecimiento de las plantas y responde al estrés abiótico y biótico alterando diferentes respuestas transcripcionales (Giraudat, 1995; Chinnusamy y col., 2004; Gubler y col., 2005; Mauch-Mani y Mauch, 2005; Kim y col., 2012). El ABF2 es un factor de transcripción implicado en la mediación de la regulación de los genes de respuesta al tratamiento con ABA (Rushton y col., 1995; Kim y col., 2004b; Fujita y col., 2009). En ensayos de doble híbrido en levaduras para las proteínas que interactúan con ABF2, la proteína ARIA fue una de las dos proteínas aisladas. ARIA posee nueve ARM con un dominio BTB C-terminal (Kim y col., 2004a). El dominio BTB es un dominio de interacción proteína-proteína asociada con ligasas de ubiquitina E3 (Pintard y col., 2004). Estudios *in vitro* confirmaron que ARIA, ya sea a través de los dominios ARM o BTB, es capaz de unirse a ABF2. Tanto *ABF2* como *ARIA* exhiben incrementos en su expresión génica luego del tratamiento salino o con ABA y ambas proteínas se localizan en el núcleo, aunque *ARIA* también puede observarse en la membrana plasmática (Kim y col., 2004a). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *ARIA* exhibieron características muy similares a las plantas de tipo salvaje en condiciones normales de crecimiento, aunque incrementan su sensibilidad a ABA durante la germinación. Estas mismas líneas también resultaron más sensibles al estrés osmótico, al de glucosa y al estrés salino durante la germinación. A pesar de que en presencia de NaCl exhibieron reducción en la tasa de germinación, mostraron una mayor tasa de supervivencia cuando se cultivaron en medios salinos (Kim y col., 2004a). En *aria*, una mutante nula causada por una inserción de T-ADN, se verificó un adelanto de la fase de germinación y una tasa ligeramente más alta, que las plantas de tipo salvaje (Kim y col., 2004a). Esto sugiere que *ARIA* es un regulador negativo de la germinación de semillas y del desarrollo temprano de la plántula. En contraste con las líneas que sobreexpresan *ARIA*, las mutantes *aria* resultaron menos sensibles a ABA durante la germinación y elongación de las raíces primarias. Adicionalmente, las plántulas mutantes también resultaron insensibles a glucosa, mientras que el manitol no ejerció efectos significativos (Kim y

col., 2004a). Estos datos soportan la hipótesis sobre el rol de ARIA en respuestas al estrés abiótico y a ABA, posiblemente a través de interacciones con el factor de transcripción ABF2. Queda aún por determinar si ARIA funciona como un coregulador de ABF2 o es parte del complejo ligasa de ubiquitina E3 para regular ABF2.

Es importante destacar que ABA actúa mediando muchas de las respuestas fisiológicas al estrés ambiental, como la sequía, el frío y la salinidad (Shinozaki y col., 2002). Diferentes experimentos han demostrado que el estrés abiótico también activa los procesos ABA subyacentes (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Finkelstein y col., 2002; Zhu, 2002). Un gran número de genes, que específicamente responden al estrés abiótico, son también inducibles directamente por tratamiento con ABA (Seki y col., 2002), proporcionando evidencia directa que dicha fitohormona debe participar en los procesos que responden a estos estreses ambientales (Zhang y col., 2005).

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales que controlan muchos procesos del desarrollo que incluyen la germinación de semillas y el desarrollo y diferenciación de los frutos (Olszewski y col., 2002; Peng y Harberd, 2002; Thomas y Sun, 2004). Las GAs estimulan las etapas críticas en el crecimiento y el desarrollo de la planta mediante la activación de la destrucción de reguladores negativos, como las proteínas DELLA. Las GAs estimulan también la elongación del tallo, la transición a la floración y el desarrollo de la flor en la mayoría de las especies de plantas. Los genes de la familia DELLA actúan como represores de estas respuestas a GAs, causando la destrucción de proteínas DELLA a través de la vía UPS en diversas especies, incluyendo el arroz, la cebada y *Arabidopsis* (Gubler y col., 2002; McGinnis y col., 2003; Sasaki y col., 2003).

Proteínas DELLA

Las proteínas DELLA son una subfamilia de los factores de transcripción putativos GRAS (GAI, RGA, y SCARECROW) cuyo nombre deriva de la secuencia conservada de aminoácidos D-E-L-L-A en el dominio N-terminal (Peng y col., 1999; Pysh y col., 1999). Dicho extremo contiene el dominio DELLA conservado, requerido para la regulación negativa que evita la acumulación de proteínas por acción de GA. El extremo C-terminal contiene el dominio funcional GRAS. En *Arabidopsis* pueden identificarse

cinco proteínas DELLA: RGA (Represor de GA1-3), GAI (GA-Insensitive), RGL1, RGL2 y RGL3 (RGA-like 1-3), (Thomas y col., 2005). Estas cinco proteínas comparten una alta homología y elevado grado de conservación de secuencias en tres regiones: la secuencia del dominio DELLA, la señal de localización nuclear y los dominios funcionales.

La pérdida de función por mutaciones en los genes DELLA, resultan en una disminución de los requerimientos de GA, mientras que las mutaciones en el dominio regulador DELLA resultan en la señalización constitutiva por GA (Thomas y col., 2005). Aunque las funciones de los cinco genes DELLA se superponen parcialmente, algunas de las proteínas DELLA poseen roles predominantemente particulares en respuesta a GA.

Si bien las proteínas DELLA reprimen respuestas a GA en diversas etapas del desarrollo de las plantas, RGA, RGL2 y GAI desaparecen rápidamente tras la aplicación de GA (Dill y col., 2004; Fu y col., 2004; Tyler y col., 2004). Esta degradación desencadenada por GA alivia la "represión del crecimiento" por las proteínas DELLA. Así, GA parece apuntar a las proteínas DELLA para su destrucción por ubiquitinación.

El vínculo entre el UPS y las vías de señalización, es la ligasa de ubiquitina E3, que reconoce y actúa ubiquitinando una proteína diana específica. Ejemplos de ligasas de ubiquitina E3 incluyen los dominios HECT, RING y U-box (que serán descriptos posteriormente), el Complejo Promotor de la Anafase y SCF (Skp1, cullina, F-box). Los complejos SCF han demostrado ser importantes reguladores de proteínas DELLA en *Arabidopsis* y en arroz (McGinnis y col., 2003; Sasaki y col., 2003). Los complejos SCF se componen de cuatro subunidades-Skp1, cullina, *RING-finger protein* y la proteína F-box (Figura 16, Zheng y col., 2002). La proteína F-box se une a una proteína diana específica, a través de un dominio de interacción proteína-proteína, en el extremo C-terminal. La proteína F-box se une a Skp1 a través de un dominio F-box N-terminal conservado. Skp1 une la F-box al N-terminal de cullina, la cual une a la proteína *RING-finger* que a su vez se une a una enzima de conjugación E2. La función de E3 es catalizar la transferencia de ubiquitina a la proteína diana, tal como una proteína DELLA. Hay 698 posibles proteínas F-box en el genoma de *Arabidopsis* (Gagne y col., 2002).

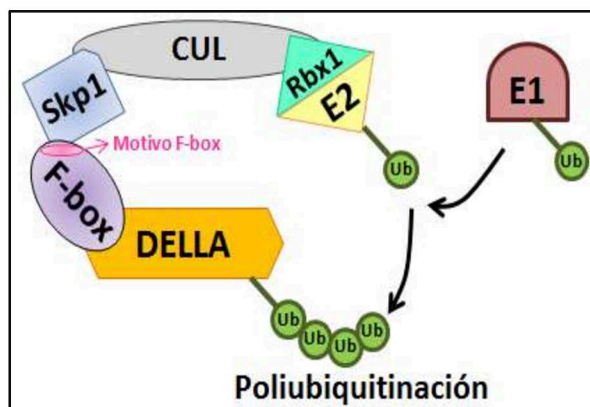


Figura 16: Estructura del complejo ligasa de ubiquitina E3-SCF basado en la estructura cristalina SCF^{SKP2}. La proteína DELLA es el blanco para la degradación. La proteína SLY1 F-box se une a DELLA a través de su dominio C-terminal e interactúa con Skp1 a través del motivo F-box N-terminal. Culina 1 (CUL) une a Skp1 y las proteínas *RING-finger*: RBX1. RBX1 une a la enzima de conjugación de ubiquitina E2, fuente de ubiquitina (Ub). La Ub se une a E1 a través de un enlace tioéster. El resto de Ub se transfiere a la E2, que se une a la SCF E3, catalizando la transferencia de Ub de E2 al sustrato DELLA. Adaptado de Zheng y col., 2002.

Aunque la ligasa de ubiquitina SCF^{SLY1} E3 es un importante regulador de las proteínas DELLA, es posible que éstas también sean blanco de destrucción por otras ligasas de ubiquitina E3 incluyendo, SCF^{SNE} y la U-box PHOR1. SNE (SNEEZY) es un homólogo de SLY1 en *Arabidopsis* (Fu y col., 2004; Strader y col., 2004). PHOR1 (proteína de respuesta al fotoperiodo 1, *Photoperiod-Responsive protein 1*) es una ligasa de ubiquitina E3 putativa que se identificó como un transcripto cuya abundancia es mayor en plantas de papa de días cortos, en comparación con las plantas crecidas en días cortos, con un descanso nocturno. Los niveles de expresión de PHOR1 también son regulados durante el día en el tejido foliar (Amador y col., 2001). Se postula que la proteína PHOR1 contiene siete ARM en el extremo C-terminal y un dominio U-box en la región N-terminal (Amador y col., 2001; Monte y col., 2003). La presencia del dominio U-box sugiere, que PHOR1 podría actuar como una ligasa de ubiquitina E3 (Hatakeyama y Nakayama, 2003). Los estudios de Amador y col., demostraron que la proteína PHOR1 es sensible al tratamiento con GA, hormona que induce rápidamente la acumulación de PHOR1, proveniente del citosol, en el núcleo (Amador y col., 2001). Así, la proteína PHOR1 está involucrada en la respuesta a GA y podría funcionar como una ligasa de ubiquitina E3, actuando en la regulación de proteínas DELLA por ubiquitinación (Monte y col., 2003).

Vía de señalización por GA

En la figura 17 se resume el modelo actualmente más aceptado, de la vía de señalización por GA basado en datos recientes obtenidos en monocotiledóneas y dicotiledóneas. En ausencia de GA, las proteínas DELLA regulan negativamente las

respuestas por GA. En presencia de GA, la hormona se une al receptor GID1 (del inglés *Gibberellin-Insensitive Dwarf*). El complejo GID1-GA a su vez se puede unir a la proteína DELLA (probablemente en el núcleo) y esta interacción desencadena la ubiquitinación de DELLA por el SCF y su posterior degradación por el proteosoma 26S.

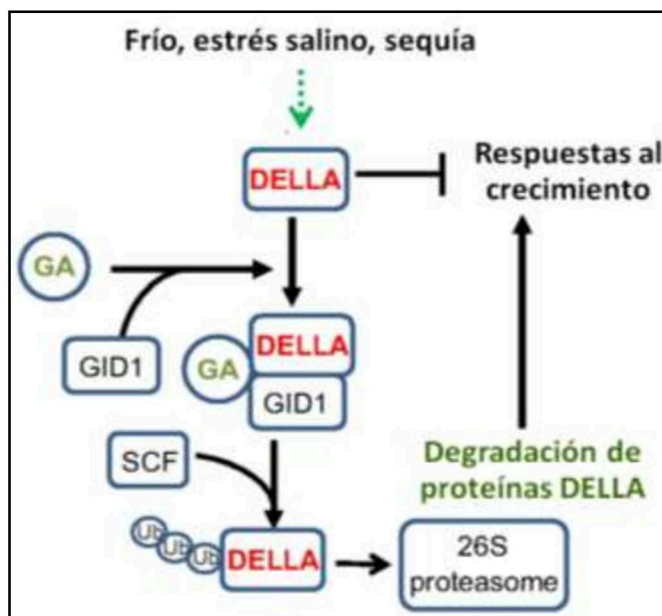


Figura 17: Vía de señalización por GA. La atenuación de la concentración de GA permite la estabilización de los supresores de crecimiento DELLA, que de otro modo serían degradados por el proteosoma 26S a través de la interacción con el receptor GA, GID1, y SCF una ligasa de ubiquitina E3. Las puntas de flecha denotan un efecto positivo, mientras que la barra en T indica una relación negativa (inhibitoria). Las flechas de puntos verdes indican puntos de intervención de los factores de estrés ambiental. Ub: ubiquitina. Adaptado de Colebrook y col., 2014.

La vía de señalización por GA está muy conservada en el reino vegetal. Como se describió previamente, el primer paso en la señalización por GA es su percepción por un receptor. En el arroz, se ha identificado el receptor de GA: GID1 (Ueguchi-Tanaka y col., 2005). Aunque GID1 codifica una proteína soluble, homóloga a la lipasa sensible a hormonas de mamíferos (HPL), no parece funcionar como tal. La proteína GID1 se localiza principalmente en el núcleo, aunque también puede ser detectada en el citoplasma. Hay tres homólogos GID1 en *Arabidopsis* (AtGID1A, AtGID1B y AtGID1C) que pueden funcionar como receptores de GA (Nakajima y col., 2006). GID1 tiene una alta afinidad por GA bioactivos: GA₃, GA₄ y GA₁. Una vez que GID1 une un GA bioactivo, su interacción con DELLA se vuelve más fuerte y estable. De alguna manera, esta interacción parece desencadenar la ubiquitinación y degradación de DELLA a través SCF^{GID2/SLY1} y la vía del UPS. El mecanismo exacto por el cual GA estimula la ubiquitinación de la proteína DELLA por SCF^{GID2/SLY1} aún no se ha clarificado. Aunque los modelos anteriores sugieren que se requiere la fosforilación de la proteína DELLA para su reconocimiento por SCF^{GID2/SLY1} (Fu y col., 2004; Gomi y col., 2004), los datos

más recientes sugieren que este no es el caso (Figura 18) (Hussain y col., 2005; Itoh y col., 2005; Hirano y col., 2008).

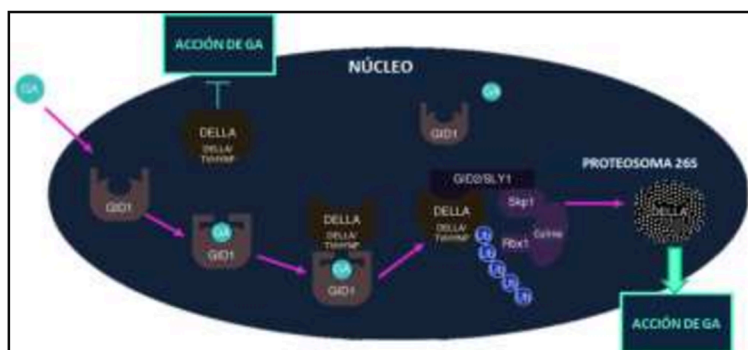


Figura 18: Modelo para la acción de GA a través de la degradación de proteínas DELLA. En ausencia de GA, la acción por GA es reprimida por proteínas DELLA. Cuando GA está presente, el receptor se une GID1. El complejo GID1-GA interactúa con los motivos DELLA y TVHYNP de la proteína DELLA, lo que resulta en el reconocimiento de proteínas DELLA por el complejo SCF^{GID2/SLY1} (que consta de Skp1, Cullin, la proteína F-box, y Rbx1). Después de que las proteínas DELLA se poliubiquitinan por el complejo SCF^{GID2/SLY1}, se degradan a través de la vía del proteosoma 26S, y como consecuencia se activa la acción por GA. Esta reacción consecutiva se prevé que se produzca en el núcleo. Abreviatura: Ub: ubiquitina. Adaptado de Hirano y col., 2008.

Las plantas parecen haber desarrollado una buena estrategia de control de las funciones proteicas basada en su inactivación por destrucción. (Smalle y Vierstra, 2004). El uso del sistema UPS para controlar la señalización de GA se conserva en especies que van desde las monocotiledóneas (como el arroz y la cebada) hasta

las dicotiledóneas (como *Arabidopsis*).

Ligasas de Ubiquitina E3 de plantas

En las plantas, la integración de las señales internas con los estímulos ambientales externos en una rápida respuesta celular (del orden de minutos) se basa en una red de regulación importante que implica la vía del UPS (Hua y Vierstra, 2011). Esta vía se encuentra altamente conservada entre los eucariotas y consiste en actividades concertadas de una enzima ubiquitina E1, que permite la unión covalente de ubiquitina dependiente de ATP; una enzima conjugante de ubiquitina E2, que recibe la ubiquitina de la E1 y físicamente se ensambla con una ligasa de ubiquitina E3. Ésta última a la vez, se une a la/s proteína/s sustrato y facilita la transferencia de la ubiquitina a su blanco. Este mecanismo puede resultar tanto en la mono- como la poliubiquitinación del sustrato (Katzmann y col., 2004; Carter y col., 2005; Chastagner y col., 2006; Pavri y col., 2006; Schulman, 2011). La poliubiquitinación lleva a la degradación proteolítica de sustratos por el proteosoma 26S (Hellmann y Estelle, 2002) (Figura 19), mientras que la monoubiquitinación conduce a la translocación de las

proteínas en la célula, lo que puede resultar posteriormente en su degradación lisosomal (Tanaka y col., 2008; Ikeda y Dikic, 2008; Cai y col., 2012). Las plantas generalmente codifican sólo para una o dos proteínas E1, que se expresan y son activas en la mayoría de los tejidos (Callis y col., 1995). El número de proteínas E2 es significativamente mayor, por ejemplo, en *Arabidopsis* existen 36 isoformas que son agrupadas en 12 grupos. Así, estas enzimas conjugantes proveerían la especificidad con respecto a la expresión tisular, a las etapas de desarrollo y al ensamblaje con las ligasas de ubiquitina E3 (Callis y Vierstra, 2000). Sin embargo, la mayor diversidad se encuentra en las E3, que se estima que en las plantas, superan los 1000 tipos. Esta diversidad en la vía de señalización y su rápida velocidad de acción, es típica de un adecuado mecanismo de regulación que permite a las plantas responder a los cambios del entorno permitiendo una sincronización de pasos precisa para su desarrollo y su crecimiento (Hotton y Callis, 2008; Hua y Vierstra, 2011). Actualmente, el mecanismo básico de ubiquitinación es bien comprendido y los principales aspectos sobre los que debe focalizarse el análisis son: (1) los factores de regulación que disparan el ensamblaje del sustrato con una ligasa de ubiquitina E3, (2) el tipo de ubiquitinación (mono- o poliubiquitinación), (3) cuáles son las ligasas de ubiquitina E3 activas en un proceso tisular específico y durante una ventana de tiempo dada y (4) cuáles son sus impactos en las respuestas celulares (Chen y Hellmann, 2013).

etapas de desarrollo y al ensamblaje con las ligasas de ubiquitina E3 (Callis y Vierstra, 2000). Sin embargo, la mayor diversidad se encuentra en las E3, que se estima que en las plantas, superan los 1000 tipos. Esta diversidad en la vía de señalización y su rápida velocidad de acción, es típica de un adecuado mecanismo de regulación que permite a las plantas responder a los cambios del entorno permitiendo una sincronización de pasos precisa para su desarrollo y su crecimiento (Hotton y Callis, 2008; Hua y Vierstra, 2011). Actualmente, el mecanismo básico de ubiquitinación es bien comprendido y los principales aspectos sobre los que debe focalizarse el análisis son: (1) los factores de regulación que disparan el ensamblaje del sustrato con una ligasa de ubiquitina E3, (2) el tipo de ubiquitinación (mono- o poliubiquitinación), (3) cuáles son las ligasas de ubiquitina E3 activas en un proceso tisular específico y durante una ventana de tiempo dada y (4) cuáles son sus impactos en las respuestas celulares (Chen y Hellmann, 2013).

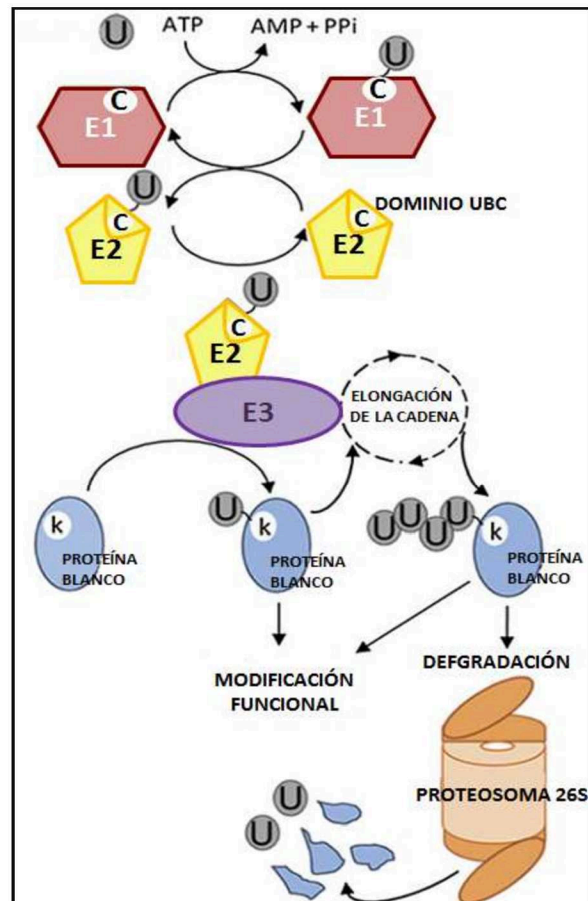


Figura 19: El patrón de Ubiquitinación. La ubiquitina es activada por la enzima E1 y luego es transferida a un residuo de cisteína sobre la enzima E2 formando el intermediario ubiquitina-E2. La ubiquitina es transferida del este intermediario a un residuo lisina de una proteína blanco unida a la E3 (monoubiquitinación). Puede ocurrir la adición de otras moléculas de ubiquitina a la proteína blanco originalmente monoubiquitinada. Adaptado de Lyzenga y Stone, 2011.

Existen tres clases de ligasas E3: HECT, RING y U-box (Figura 20). En *Arabidopsis*, las ligasas E3 con dominios HECT (*Homology to E6-Ap C-terminus*) se han denominado UPL17 (*Ubiquitin Protein Ligase*) y se agrupan en cuatro subfamilias (UPL1/2, UPL3/4, UPL5 y UPL6/7) (Huibregtse y col., 1995; Downes y col., 2003; Marín, 2013).

El motivo RING fue descrito por primera vez en 1991 por el grupo de Hatakeyama y col., 2001 como una proteína que llamaron *Real Interesting New Gene* (Freemont y col., 1991). Este grupo de E3 es el más abundante entre las ligasas de ubiquitina monoméricas y la tercer mayor familia de genes en *Arabidopsis* (Kraft y col., 2005; Stone y col., 2005; Vierstra, 2009). Esta abundancia es una característica propia de las plantas, sugiriendo una correlación potencial entre la diversidad de ligasas de ubiquitina E3 y el ciclo de vida sésil de los vegetales (Vierstra, 2009). En *Arabidopsis* se han descrito 477 proteínas RINGs diferentes (Kim y Kim, 2013).

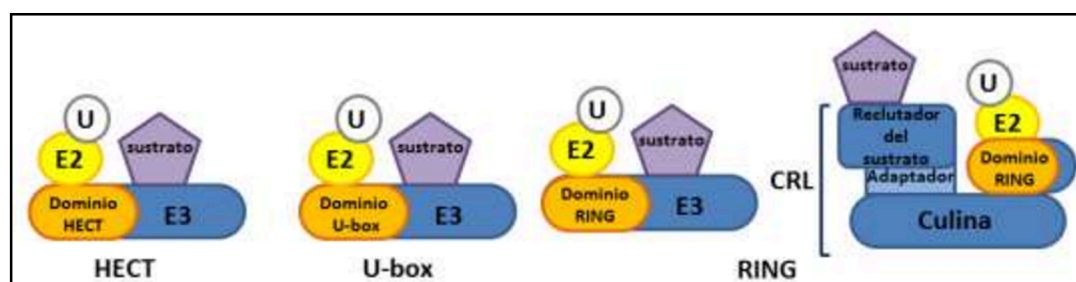


Figura 20: Ligasas de ubiquitina E3 de vegetales. Las ligasas de ubiquitina E3 se clasifican según posean un dominio HECT, U-box o RING para la unión a E2. Las ligasas de ubiquitina E3 con dominios RING y U-box median la transferencia de ubiquitina desde E2-Ub a la proteína sustrato. Las ligasas de ubiquitina E3 con dominios HECT forman un intermediario E3-ubiquitina antes de la transferencia de la misma a la proteína sustrato. Los dominios RING se encuentran en E3s monoméricas y multiméricas CRL. Adaptada de Stone, 2014.

Las ligasas U-box E3 han sido muy estudiadas en arroz y *Arabidopsis* (PUB), comprenden un grupo dentro de las principales familias de proteínas con 64 y 77 miembros anotados, respectivamente (Azevedo y col., 2001; Wiborg y col., 2008; Zeng y col., 2008). El número de PUBs en plantas parece ser significativamente mayor que el encontrado en *Saccharomyces cerevisiae* (2 miembros) o humanos (21 miembros) (Koegl y col., 1999; Hatakeyama y col., 2001; Ohi y col., 2003), indicando que estas proteínas pueden haberse multiplicado para cumplir un amplio espectro de funciones en las plantas. El motivo U-box comprende aproximadamente 70 residuos de aminoácidos y, aunque su organización terciaria se asemeja a la del motivo FINGER-RING, carece de residuos de cisteína e histidina (Ohi y col., 2003).

En *Arabidopsis* y en arroz, las ligasas de ubiquitina E3 pueden agruparse en ocho subfamilias cuyos miembros se encuentran representados en la mayoría de las especies de plantas. La agrupación se basa principalmente en sus dominios secundarios, la mayoría de los cuales representan motivos de interacción proteína-proteína clásicos: como, por ejemplo, ARM, HEAT (HUNTINGTON), factor de elongación 3 (EF3), proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la quinasa de levaduras TOR1 (Andrade y Bork, 1995; Hatzfeld, 1999; Zeng y col., 2008). En la última década se han logrado importantes avances en el estudio de la función de varias ligasas de ubiquitina E3 de la subclase ARM. En general, sus actividades, parecerían estar ampliamente relacionadas con aspectos vinculados a la regulación de las respuestas de las plantas al estrés ambiental.

PUBs en *Arabidopsis* (AtPUBs) y su rol durante el estrés abiótico

En las plantas, se han descrito diferentes funciones para las PUBs incluyendo señalización para defensa y control de la floración (PUB13 de *A. thaliana*; Guerra y col., 2012; Li y col., 2012), la nodulación en *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* (Cerberus y PUB1, respectivamente; Yano y col., 2009; Mbengue y col., 2010), carencia de fosfato en arroz (OsUPS; Hur y col., 2012), la autoincompatibilidad en *B. napus* (ARC1; Stone y col., 2003; Kitashiba y col., 2011) y señalización por GA en la papa (PHOR1; Amador y col., 2001). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los mecanismos precisos de cómo estas proteínas median diferentes respuestas aún no han sido estudiados en profundidad, ni clarificados, por lo que constituyen un área de investigación importante para ser abordada.

En *Arabidopsis* se ha postulado que las AtPUBs como AtPUB9, 18, 19, y AtPUB44/SAUL1 participarían en las respuestas a ABA, ya sea a través de señales de transducción, o afectando a su biosíntesis (Samuel y col., 2008; Salt y col., 2011; Seo y col., 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que la carencia de AtPUB9 causa un incremento de la sensibilidad a ABA durante la germinación de plántulas y los estudios genéticos permiten establecer que estas proteínas actúan corriente arriba del factor de transcripción ABI3 (Samuel y col., 2008). Del mismo modo, mutantes puntuales y dobles de *AtPUB18* y *AtPUB19* se comportan como hipersensibles a ABA y se los ha descrito como factores importantes en la regulación de la respuesta negativa del ABA

(Seo y col., 2012). Por el contrario, se ha demostrado que AtPUB44/SAUL1 afectan la biosíntesis de ABA por ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S de la enzima Aldehído Oxidasa 3 del Ácido Abscísico (AAO3), (responsable del paso final de la biosíntesis de ABA) (Raab y col., 2009; Bergler y Hoth, 2011; Liu y col., 2011).

Tolerancia al estrés abiótico mediado por ubiquitinación de proteínas

La identificación de un número creciente de ligasas de ubiquitina E3 que regulan las respuestas a estreses abióticos, ha permitido avanzar en la dilucidación de los mecanismos de señalización frente a condiciones de estrés (Figura 21). Se ha propuesto que las E3 podrían actuar suprimiendo la vía de señalización de estrés, bajo condiciones de crecimiento favorables, y por el contrario, mediante la eliminación de los reguladores negativos de la vía de señalización por estrés, en respuesta a un estímulo, o por atenuación de la vía de señalización para permitir un mayor crecimiento una vez que se revierten las condiciones de estrés (Figura 21).

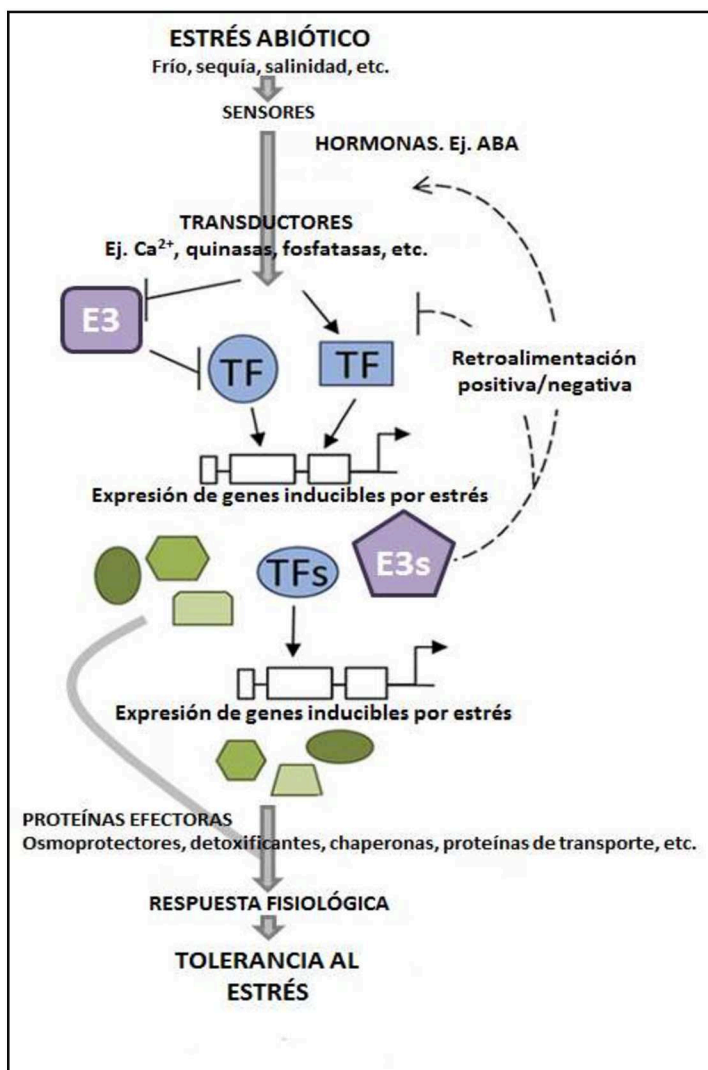


Figura 21: Esquema representando la regulación del estrés abiótico mediando la vía de señalización de ligasas E3. La planta percibe las señales de estrés vía sensores (aún desconocidos) y la señal es transducida vía hormonas, mensajeros secundarios y reguladores transcripcionales. La expresión de genes inducibles por estrés es facilitada por factores de (TFs) muchos de los cuales son regulados por estrés. Las ligasas E3 tienden a regular componentes del patrón de señalización. En ausencia de señales de estrés, las ligasas E3 pueden suprimir la vía de señalización por ej., vía la degradación de TFs. Las ligasas E3 pueden funcionar dentro de mecanismos de retroalimentación para aumentar o atenuar la señal de estrés. Adaptado de Lyzenga y Stone, 2011.

Las ligasas de ubiquitina E3 también pueden funcionar por retroalimentación positiva mejorando la señalización por estrés (Figura 21 y 22). Al presente se conoce muy poco acerca de cómo la señalización por estrés abiótico regula la actividad de estas ligasas de ubiquitina E3. En algunos casos, se ha verificado que la expresión y localización celular de las E3 es regulada por el estrés (Ko y col., 2006; Zhang y col., 2007; Molinier y col., 2008).

Los blancos de las ligasas de ubiquitina E3 conocidos, incluyen muchos reguladores transcripcionales. Un ejemplo típico son las proteínas DELLA de *Arabidopsis* que, como se describió previamente, reprimen la respuesta a GA en ausencia de ésta hormona del crecimiento. Otros objetivos potenciales de ligasas de ubiquitina E3 pueden incluir enzimas de la biosíntesis de la hormona y proteínas efectoras que median la tolerancia al estrés abiótico. El análisis del genoma de *Arabidopsis* para el UPS permitió identificar diferentes tipos de estreses relacionados a proteínas (Manzano y col., 2008; Igawa y col., 2009). De hecho, la mayoría de las proteínas ubiquitinadas, que fueron aisladas en cada estudio, fueron funcionalmente categorizadas como de respuesta al estrés o proteínas de estrés abiótico. El hecho de que las plantas focalicen en los sistemas UPS la respuesta al estrés abiótico no debería sorprender ya que éste permite una respuesta rápida y eficiente al estrés, mediante la regulación de la biosíntesis de la hormona y la abundancia de proteínas reguladoras (Figura 22).

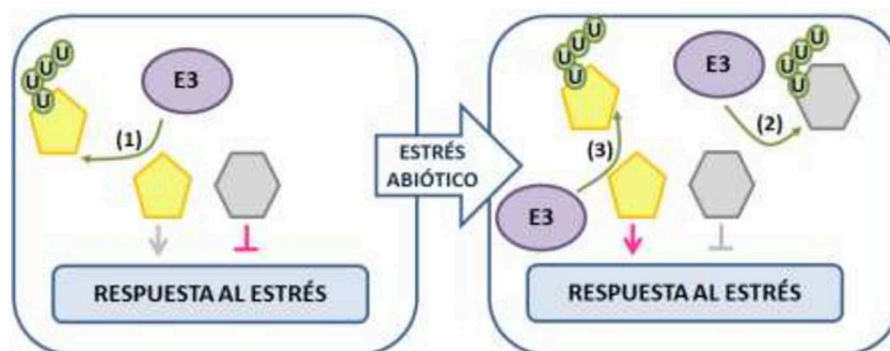


Figura 22: Modelo que resume los modos de acción más comunes para ligasas de ubiquitina E3 en la regulación de respuestas del estrés abiótico. (1) Las ligasas de ubiquitina E3 pueden funcionar como reguladores de una respuesta negativa necesaria para suprimir las vías de respuesta al estrés por la reorientación reguladores positivos para la degradación. (2) Las ligasas de ubiquitina E3 pueden promover la señalización dirigiendo a reguladores negativos para su degradación luego de la percepción del estrés ó (3) Las ligasas de ubiquitina E3 pueden funcionar también para atenuar la señalización de estrés por la reorientación reguladores positivos para la degradación. Adaptado de Stone, 2014.

PROTEÍNAS PUB-ARM

Las proteínas PUB-ARMs representan una clase de ligasas de ubiquitina E3 que participan en la ubiquitinación de proteínas diana. Las proteínas PUB-ARMs se localizan en el citoplasma, en el núcleo o asociadas a la membrana plasmática (Drechsel y col., 2011). En las distintas localizaciones cumplen diversas funciones durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas tales como la regulación del fotoperiodo, mecanismos de señalización y de autoincompatibilidad, muerte celular, senescencia, respuestas al estrés y a patógenos. En la actualidad, este último grupo incluye el mayor número de proteínas PUB-ARMs indicando una función importante para este tipo de ligasas de ubiquitina E3 para la supervivencia de la planta posestrés o frente al ataque de patógenos (Raab y col., 2009; Yee y Goring, 2009; Mbengue y col., 2010; Bergler y Hoth, 2011; Liu y col., 2011; Park y col., 2011; Salt y col., 2011; Li y col., 2012; Vogelmann y col., 2012, Vogelmann y col., 2014).

Las funciones específicas de las proteínas PUB-ARMs dependen de su localización intracelular, probablemente definida por la presencia de los dominios ARM ya que generalmente éstos se han implicado en la localización de dichas proteínas eucarióticas en el núcleo, en el citoplasma, o asociadas a la actina-f (Aberle y col., 1994; Hülsken y col., 1994; Graham y col., 2000; Coates y col., 2006; Yang y col., 2007), demostrando que las proteínas PUB-ARMs poseen localización nuclear, citoplasmática o asociadas con el retículo endoplasmático o con la membrana plasmática (Amador y col., 2001; Stone y col., 2003; Cho y col., 2008; Samuel y col., 2008; Drechsel y col., 2011).

PUB-ARMs EN *A. THALIANA*: AtPUB-ARMs

A. thaliana contiene 41 proteínas con similitud a BnARC1. Todas contienen el dominio U-box seguido por el tándem ARM. Un tercer dominio presente en 17 miembros de las AtPUB-ARMs es el llamado dominio UND (U-box N-terminal Domain; Mudgil y col., 2004) que también se encuentra en BnARC1, aunque su función es desconocida. Dado que *A. thaliana* es una planta autocompatible, estos miembros de las AtPUB-ARMs probablemente poseen diferentes funciones biológicas a las que desempeña BnARC1

en una especie SI, y esto se refleja en la diversidad de sus patrones de expresión de ARN (Figura 23).

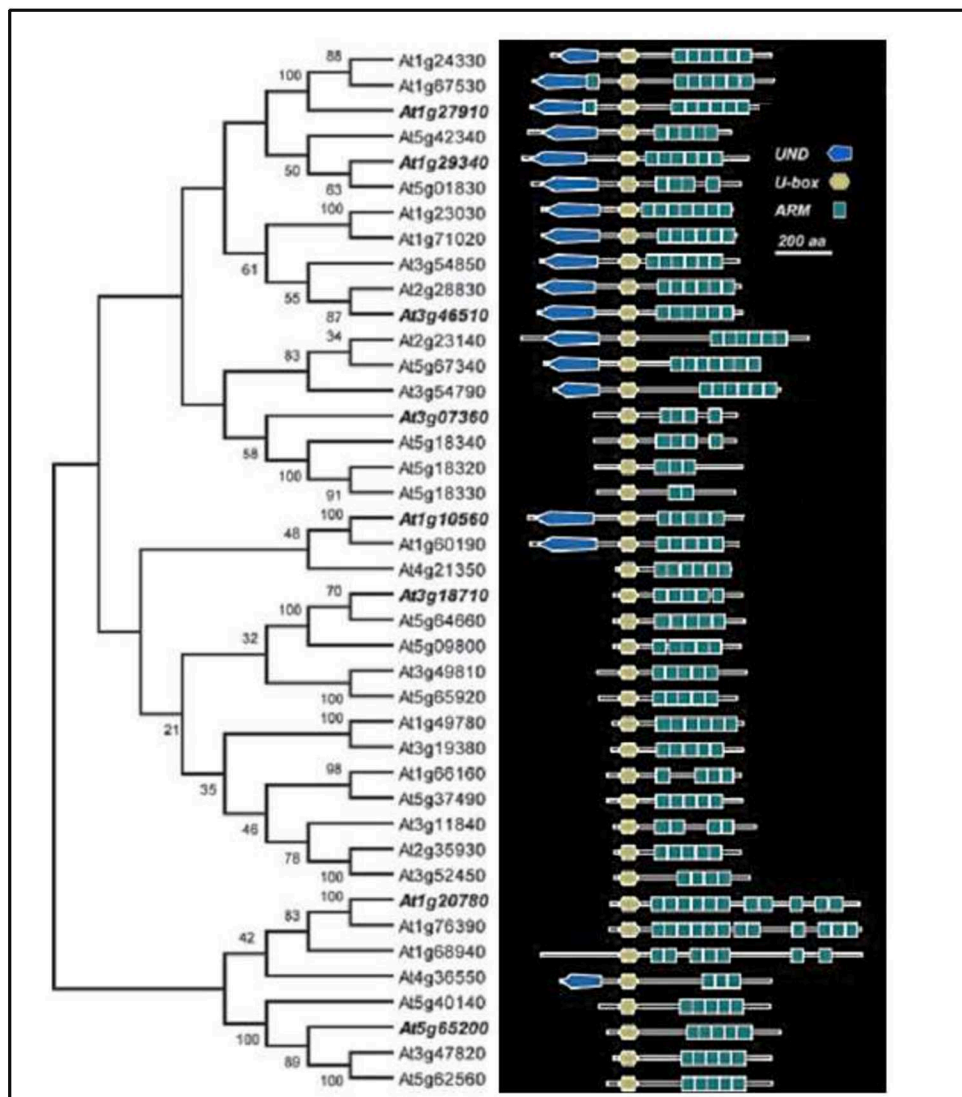


Figura 23: Filogenia de las proteínas con dominios U-box y UND. Las filogenias se generaron con el algoritmo *neighboring joining* con *bootstraps* igual a 400 y con raíz en el punto medio. Los valores de *bootstraps* se muestran como porcentajes. La filogenia se generó utilizando las secuencias de proteínas U-box de las proteínas AtPUB con ARM. Los nombres de genes AtPUB con ARM para los cuales Mudgil y col. en 2004 probaron la expresión de ARN están en cursiva. Asimismo, a la derecha de cada gen se encuentran las organizaciones de dominios de las proteínas AtPUB-ARM. Adaptado de Mudgil y col., 2004)

Aunque se han llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones para abordar la caracterización de las proteínas PUB-ARM en las plantas, se desconocen las funciones de la mayoría de los miembros de esta familia (Sharma y col., 2014).

El objetivo del presente estudio consistió en explorar la súperfamilia de proteínas PUB-ARMs en el genoma de *Arabidopsis* en la etapa de desarrollo floral, específicamente

durante el mecanismo de adhesión polen-estigma. Utilizando herramientas bioinformáticas, junto con la información derivada de las bases de datos de plantas, se realizó un detallado análisis filogenético para todo el conjunto de proteínas AtPUB-ARM. Asimismo, se analizó la expresión génica bajo diferentes tratamientos utilizando RT-*sq*PCR y PCR en tiempo real para obtener un detallado análisis molecular y evolutivo con el objetivo de comenzar a dilucidar sus posibles funciones en las plantas.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue investigar la naturaleza molecular y el rol de la adhesión celular en plantas, particularmente en el proceso de interacción polen-estigma de *Arabidopsis thaliana*. El estudio se ha focalizado en la familia de proteínas AtPUB-ARMs para intentar determinar tanto sus funciones biológicas, como las posible/s vía/s de señalización mediadas por estas moléculas.

Los objetivos específicos del plan de trabajo fueron:

- I. Estudiar las características morfológicas macroscópicas e histológicas de las estructuras reproductivas involucradas en el contacto polen-estigma, examinando el efecto de diferentes tratamientos químicos frente a dicha interacción.
- II. Analizar, mediante técnicas bioinformáticas, proteínas con dominios ARM con homología a moléculas que participan en mecanismos de adhesión celular presentes en otros organismos eucariotas.
- III. Establecer estudios sobre la estructura tridimensional de los componentes proteicos involucrados en el proceso de adhesión polen-estigma.
- IV. Caracterizar los patrones de expresión de proteínas ARM implicadas en el mecanismo de polinización.
- V. Determinar los niveles de expresión génica para la súperfamilia de proteínas ARM, caracterizando su respuesta frente a diferentes tratamientos en diferentes genotipos de *A. thaliana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

VARIANTES DE PLANTAS

Para el presente trabajo, fueron utilizados genotipos de *A. thaliana*, Heyhn, ecotipo Columbia (Col-0) de tipo salvaje, cuyas semillas fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA) y variantes mutantes *knockout* con inserciones de T-DNA de líneas SALK (Alonso y col., 2003). Estas últimas fueron adquiridas comercialmente a través del *Arabidopsis Biological Resource Center ABRC (Ohio State University)*.

Todas las líneas mutantes se confirmaron mediante PCR sobre ADN genómico, a través de dos reacciones en paralelo, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen de interés, así como la combinación de uno de éstos con un cebador específico para la inserción. Los niveles de expresión de cada uno de los genes se semicuantificaron por retrotranscripción seguida de PCR (RT-*sq*PCR). Las líneas mutantes estudiadas con inserciones de T-DNA en la región codificante de los genes *AtPUB16* y *GID1A* se detallan a continuación:

- SALK_091722: Inserción de T-DNA en la región codificante. La verificación fue realizada con cebadores LP_PUB16F – RP_PUB16R y LBa1PUB16 F (específico para la inserción) - RP_PUB16R
- SALK_044317: Inserción de T-DNA en la región codificante. La verificación fue realizada con cebadores LP_GID1AF – RP_GID1AR y LBa1 (específico para la inserción)- RP_GID1AR

En el ANEXO I se proporciona una tabla con las secuencias de los oligonucleótidos utilizados a lo largo de todo el trabajo y los esquemas indicando la posición de los utilizados para la caracterización de sendas mutantes (*pub16* y *gid1a*).

Con el objetivo específico de testear la expresión de genes que participan en mecanismos de PSC (Liu y col., 2007), se utilizó un genotipo de *Arabidopsis* SI: *Arabidopsis lyrata*. Las semillas de *A. lyrata* AL8 (Origen: Sp21–05, Noruega) fueron

donadas por el Dr. Sang-Tae Kim (*Max Planck Institute for Developmental Biology, Department of Molecular Biology, Tübingen, Germany*).

CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Cultivo de plantas en sustrato

Las semillas de *A. thaliana* fueron sembradas en una mezcla de tierra estéril, vermiculita y humus en una proporción 3:1:1. Este sustrato se colocó en cada una de las macetas y una vez depositadas las semillas sobre el sustrato, fueron subirrigadas con solución Hoagland modificada (ANEXO I), cubiertas con papel film con pequeños orificios, e incubadas a 4 °C en oscuridad por 48 h para estratificación e interrupción de la dormancia. Posteriormente fueron llevadas a la cámara de crecimiento la cual se ajustó a 23 °C y 70% de humedad generando fotoperiodos de día largo 16/8 h de luz/oscuridad, con luz fluorescente blanca fría e iluminación complementada con GRO-LUX® (Sylvania, Vinhedo, SP, Brasil) produciendo una intensidad total de flujo (fotones fotosintéticos) de 100 a 150 mE/m²s. La frecuencia de subirrigación fue de dos veces por semana con 200 ml de solución Hoagland modificada por placa (15 cm x 55 cm) conteniendo 64 macetas (una planta/maceta).

Para evitar infecciones fúngicas, las plantas fueron rociadas por aspersion dos veces por semana con Carbendazim (2-metoxicarbamoil-bencimidazol) – Thiram (bisulfuro de tetrametil carbamilo) 0,035g/l. Esta combinación de fungicidas de acción complementaria (thiram-contacto y carbendazim-sistémico) y de amplio espectro, aseguran un adecuado control de los complejos de hongos. Como insecticida se utilizó deltametrina (K-Othrina® de Bayer: (S)- alfa-ciano-m-fenoxibenzil 81R, 3R)-3- (2,2 dibromovinil) dimetil ciclopropano carboxilato) en una dilución 1/10, aplicado por aspersion dos veces por semana.

Cultivo de plantas *in vitro*

Para los estudios radiculares de las mutantes *pub16*, fueron utilizados cultivos *in vitro* en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962). Las semillas fueron esterilizadas previamente durante 10 min en una solución con lejía 50% y lavadas (hasta tres veces) con agua estéril. A continuación, las semillas fueron sembradas en una mezcla de tierra estéril, vermiculita y humus como se describió previamente. Para los estudios

radiculares las semillas fueron crecidas verticalmente en placas cuadradas con Plant-agar 1%. Las mismas fueron recubiertas con polietileno negro con el fin de que la luz evitara la inhibición del desarrollo radicular. Las mediciones de la longitud de las raíces fueron realizadas a los 2 y 5 días luego de la germinación.

Las semillas de *A. lyrata* luego de estratificación en agarosa 0,1% a 4 °C por una semana, fueron sembradas en el suelo. Luego de 4 semanas se observaron las rosetas listas para proceder a su vernalización (6 semanas) para lograr la adecuada floración.

TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Microscopía óptica directa de luz transmitida (MO)

Ensayo de adhesión

Para monitorear la adhesión de poblaciones de granos de polen adheridos a estigmas de ensayos en medios líquidos, se utilizó MO de luz transmitida. Los estigmas en estadio 13 (Smyth y col., 1990) fueron colectados a las 0-8 h después de la floración, lavados con 500 µl de solución tampón fosfato de potasio 50 mM, pH=7,4 y conservados en dicha solución a 4 °C. Luego de mezclar por 5 s, fueron centrifugados 1 min a 7200 g para su posterior incubación en cada una de las soluciones a ensayar. Las soluciones utilizadas fueron preparadas en diferentes concentraciones, barriendo un amplio rango (Zinkl y col., 1999): NaCl 4 M-0,01 M, etanol 100%-10%, SDS 2%-0,01%, ácido acético 2 M-0,25 M, ácido clorhídrico 2 N-0,125 N, cloruro de litio 8 M-0,01 M, hidróxido de sodio 4 M-0,125 M, Tritón-X100 1%-0,05%, EDTA 1 M-0,01 M y urea 8 M-0,01 M. Para proceder a la cuantificación fueron seleccionados al azar 5 estigmas para cada tratamiento y luego de la incubación en las diferentes concentraciones de cada solvente por 1 h, fueron teñidos durante 5 min con azul de anilina 1% (Sigma®, CAS Number: 415049) preparado en etanol 90% (p/v). Luego, se realizó la cuantificación de los granos de polen adheridos a cada estigma mediante MO.

Caracterización morfológica e histológica

Para la caracterización morfológica e histológica del tejido reproductivo de *A. thaliana* se utilizaron dos resinas epoxi: Araldita 6005 (Ladd Research Industries®) y Epon 812 (Ladd Research Industries®) de uso de rutina en el LAMAE. Para la inclusión las

estructuras florales fueron colectadas en el estadio 13 (Smyth, y col., 1990). Utilizando pinzas de acero, se disecaron las estructuras florales bajo lupa binocular, separando sépalos, pétalos, estambres y carpelo. A partir de estas últimas estructuras se obtuvieron los pistilos, los cuales fueron fijados en paraformaldehído 4% (v/v) y glutaraldehído 2,5% (v/v) preparado en solución amortiguadora fosfato salina (PBS) 0,1 M pH=7,4. Los pistilos fueron fijados a 4 °C durante 24 h y posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS a 4 °C de 10 min c/u. A continuación fueron posfijados con tetróxido de osmio (OsO_4) 1% y ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 0,8% en PBS, a 4 °C durante 24 h. Luego de realizar dos lavados con PBS, los pistilos fueron deshidratados en series acetónicas de concentraciones crecientes (50% (v/v) y 75% (v/v) durante 5 min c/u, 90% (v/v) por 10 min y 3 veces con 100% (v/v) por 15 min c/u) preincludidos en acetona – resina (1:3, 1:1 y 3:1) durante 2 h cada vez, a T_{amb} y en Araldita pura durante toda la noche a 4 °C. Los tejidos fueron posteriormente embebidos en Araldita y polimerizados durante 48 h a 60 °C. Para la inclusión en Epon 812, los tejidos florales en estadio 13 fueron fijados y posfijados de acuerdo a los procedimientos descritos para Araldita. La deshidratación fue realizada en la siguiente serie etanólica: 70% por 10 min, 100% por 10 min, 100% por 15 min, 100%, seguida de dos cambios en óxido de propileno por 15 min cada uno. El óxido de propileno fue eliminado impidiendo que los tejidos se sequen totalmente y el solvente fue reemplazado con una solución 1:1 de óxido de propileno: Epon 812 por al menos 1 h a T_{amb} . Finalmente, fue realizado un segundo cambio de 2:1 Epon 812: óxido de propileno a T_{amb} durante toda la noche y posterior eliminación de la mezcla, reemplazándola por Epon 812 100% durante 30 min-2 h a T_{amb} . La polimerización fue realizada en dos etapas: 24 h a 45 °C y 24 h a 60 °C. Los bloques obtenidos con ambas resinas epoxi fueron conservados a T_{amb} hasta su seccionamiento. Los materiales incluidos en ambas resinas fueron seccionados tanto transversal-, como longitudinalmente mediante un ultramicrotomo Reichert Ultracut-S Leica. Las secciones semifinas fueron depositadas sobre portaobjetos limpios, teñidas con azul de toluidina 0,5% (p/v) durante 1 min en platina caliente. La observación y caracterización del tejido se llevó a cabo a partir de imágenes obtenidas utilizando microscopio óptico (Olympus BX-50) equipado con cámara CCD acoplada al microscopio (*Apogee Instruments Inc.*).

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para el análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión (MET), los estigmas en el estadio 13 fueron fijados, deshidratados e incluidos en resina Epoxi de baja viscosidad (Spurr®). Los estigmas fueron fijados inmediatamente en frío con glutaraldehído 2,5% (v/v) y paraformaldehído 4% (p/v) en 0,1 M de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH=7,4, durante 2 días a 4 °C, con un cambio de solución de fijación. Los tejidos fueron posteriormente posfijados con OsO₄ 2% (p/v) durante 1½ h e incubados en acetato de uranilo 5% (p/v) durante 3 h. Los tejidos fueron deshidratados en una serie etanólica de concentraciones crecientes, preincluidas en Spurr: etanol (1:3, 1:1 y 3:1) e infiltradas con resina Spurr. Posteriormente fueron polimerizados a 60 °C durante 2 días. Las secciones ultrafinas de 60-90 nm de espesor obtenidas en ultramicrotomo, fueron montadas en grillas de malla 200 y posteriormente doblemente teñidas con acetato de uranilo al 2% (v/v) (ANEXO II) y citrato de plomo (ANEXO II) durante 30 s en una atmósfera pobre en CO₂. Las grillas fueron cubiertas inmediatamente y se llevaron a 4 °C hasta su observación en el TEM.

Las secciones ultrafinas fueron obtenidas usando un ultramicrotomo Reichert Ultracut –S, Leica. Las áreas de interés de cada muestra fueron observadas sobre secciones completas en el microscopio óptico directo, seleccionando la región de interés y posteriormente fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200 EX II.

Ensayo de Polinización por Microscopía de Epifluorescencia

Para llevar a cabo el ensayo de polinización en los genotipos de *A. thaliana* evaluados en la presente tesis, las flores de estadio 13, tanto en condiciones normales de crecimiento como bajo tratamiento hormonal y salino, fueron disecadas extrayendo los sépalos, pétalos y estambres utilizando agujas de acero inoxidable bajo lupa estereoscópica. Los ensayos de polinización fueron realizados por quintuplicado (Eschrich y col., 1964). Brevemente, los pistilos fueron fijados durante 1 h en etanol/ácido acético 3:1 (v/v), y luego de tres lavados con agua destilada, fueron ablandados en NaOH 1N durante 10 min a 65 °C (para permitir el posterior prensado). Los pistilos fueron posteriormente neutralizados en solución amortiguadora fosfato

salina 50 mM (PBS) pH=7,5, teñidos durante 2 h con azul de anilina 0,1% en PBS 50 mM pH=7,5 y finalmente montados en portaobjetos (Dumas y Knox, 1983). Luego de colocar el cubreobjetos, los pistilos fueron sometidos a aplastamiento (*squash*) entre el cubreobjetos y el portaobjetos. Como control específico de tinción se utilizaron estigmas no polinizados. La examinación y posterior cuantificación por microscopía de epifluorescencia (Olympus BX50) de granos de polen adheridos y penetrantes fue realizada bajo luz UV (excitación 395 nm - emisión 420 nm).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para la obtención de imágenes de microscopía electrónica de barrido, se trabajó según Weigel y Gazebrook (2002). Brevemente, las inflorescencias fueron fijadas toda la noche en FAA y deshidratadas una serie etanólica (2×50%, 60%, 70%, 85%, 95% y 3×100%). Posteriormente fueron congeladas en N₂ líquido, transferidas al portamuestras de congelación y recubiertas con oro mediante pulverización catódica (*sputtering*) mediante un *Sputter Coater Edwards, S150B*. Finalmente, las muestras fueron colocadas en el portamuestras del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410 y visualizadas con un voltaje de aceleración de 20 keV (magnificación 1030 X).

ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS

Para la identificación de la súperfamilia de proteínas con repeticiones ARM en el genoma de *Arabidopsis* fueron realizados los siguientes estudios bioinformáticos:

Análisis de Secuencia

Todas las secuencias nucleotídicas analizadas en este trabajo fueron obtenidas de la base de datos proporcionada por el *Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University)*. Las búsquedas fueron realizadas en NCBI (*National Center for Biotechnology Investigation*). Los estudios de alineamientos de secuencias nucleotídicas y de residuos de aminoácidos se realizaron utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blastn o Blastp, respectivamente, Altschul y col., 1990, así como el programa ClustaW y ClustalX 2.0 (Larkin y col., 2007).

Predicción de Estructuras Secundarias y 3D

Las estructuras secundarias fueron predichas usando programas y base de datos disponible en sitios *web*. Los dominios presentes en cada secuencia fueron definidos las bases de datos SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*: <http://smart.embl-heidelberg.de/>) y Pfam (base de datos de dominios y familias de proteínas: <http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/pfam.html>) a través de UniProt (*Universal Resource Protein*: <http://www.uniprot.org/>). Los archivos en formato .pdb para el modelado 3D fueron obtenidos de las bases de datos *Protein Model Portal* y *Swiss Model*. Asimismo se utilizó programa de anotación estructural y funcional de proteínas SUPERFAMILY que proporciona asignaciones estructurales (y por tanto funcional implícitas) a secuencias de proteínas, donde se considera que una súperfamilia contiene todas las proteínas para las cuales existe evidencia estructural de un antepasado evolutivo común.

Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos fueron construidos utilizando los alineamientos múltiples con tres algoritmos diferentes: algoritmo correspondiente a matrices de distancia *Neighbor Joining* (NJ) (utilizando el *software* disponible en línea iTol ([<http://itol.embl.de/upload.cgi>]) (Letunic y col., 2007); el Método de Máxima Parsimonia (MP) y el Método de Estimación Filogenética por Máxima Verosimilitud (ML), ambos a través del *software* disponible en línea en el sitio *web*: www.mobyle.pasteur.fr/.

ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Extracción de ADN genómico (ADNg)

La extracción de los ADNs genómicos fue realizada con el equipo *Nucleo Spin Plant II protocols* (Macherey-Nagel®). En cada caso fueron utilizados 100 mg de tejido, los que previa congelación en N₂ líquido, fueron finamente pulverizados usando un micropilón. Los extractos fueron transferidos a tubos limpios y se les añadieron 400 µl de la solución amortiguadora PL1 (Anexo II) y luego tratadas con 10 µl de *RNase A Solution* (0,01mg/µl). Las suspensiones fueron incubadas durante 10 min a 65 °C. Los lisados crudos fueron filtrados y clarificados mediante columnas filtradoras NucleoSpin®

colocadas en tubos Eppendorf colectores (2 ml). Los tubos fueron posteriormente centrifugados durante 2 min a 11000 g, colectándose el flujo clarificado y descartándose las columnas. Para ajustar las condiciones de unión del ADN fueron añadidos 450 µl de la solución amortiguadora PC (Anexo II), seguido de mezclado por pipeteo o mediante agitación con vórtex. La unión de los ADNs a la membrana de sílice fue llevada a cabo colocando columnas NucleoSpin® en nuevos tubos Eppendorf colectores (2 ml) cargando un máximo de 700 µl de la muestra. Luego fueron centrifugadas durante 1 min a 11000 g, descartándose el eluato. El lavado y secado de las membranas de sílice fue desarrollado en tres pasos: 1^{ro} fueron añadidos 400 µl de solución amortiguadora PW1 (Anexo II) a las columnas NucleoSpin® seguidas de centrifugación durante 1 min a 11000 g, descartándose la fase líquida. 2^{do} fueron añadidos 700 µl de solución amortiguadora PW2 (Anexo II) a las columnas, seguidas de centrifugación durante 1 min a 11000 g, descartándose el remanente de los tubos. 3^{ro} fueron agregados 200 µl de la solución amortiguadora PW2 (Anexo II) a las columnas, seguidas de centrifugación durante 2 min a 11000 g hasta eliminar el tampón de lavado y permitir el secado completo de las membranas de sílice. Para la elución de ADN las columnas fueron colocadas en nuevos tubos Eppendorf, a los que se agregaron 50 µl de la solución amortiguadora PE (65 °C) (Anexo II) sobre las membranas, las columnas fueron incubadas por 5 min a 65 °C y centrifugadas durante 1 min a 11000 g para la elución de los ADNs. Este paso fue repetido con otros 50 µl de la solución amortiguadora PE (65 °C) y posterior elución en los mismos tubos. El protocolo estándar recomendado por el fabricante para la extracción del ADN genómico de la planta, permite obtener una concentración de ADN dentro del rango 0,30 – 0,35 µg/µl. Para comprobar la integridad de los ADNg se corrieron en geles de agarosa 0,8% (p/v), 3 µl de ADNg con 10 µl de la solución de siembra (Anexo II) (Sambrook y Russell, 2001).

Extracción de ARNs totales

Los ARNs totales fueron aislados utilizando Trizol®, Invitrogen: 38% (p/v) fenol; tiocianato de guanidina 0,8 M; tiocianato de amonio 0,4 M; acetato de sodio 0,1 M pH=5,0 y glicerol 5% (v/v). En cada caso fueron procesados 50 mg de muestra en tubos Eppendorf con un pilón y N₂ líquido hasta la obtención de un polvo fino.

Posteriormente fueron agregados 0,5 ml de Trizol, mezclados vigorosamente para resuspender el tejido y seguidamente se repitió el agregado 0,2 ml de Trizol a 4 °C, dejándose reposar por 5 min a T_{amb} . Las muestras fueron centrifugadas a 12000 g a 4 °C por 10 min y los sobrenadantes transferidos a nuevos tubos Eppendorf en hielo. Estos tubos fueron tratados con 0,14 ml de cloroformo (1/5 del volumen respecto del Trizol), mezclándose vigorosamente durante 15 s, e incubándose 3 min a T_{amb} . Los tubos fueron posteriormente centrifugados a 12000 g durante 10 min a 4 °C. Las fases acuosas superiores conteniendo el ARN, fueron transferidas a nuevos tubos Eppendorf. Los ARNs fueron precipitados con 0,175 ml de isopropanol y 0,175 ml de solución salina (Anexo II) y centrifugados a 12000 g a 4 °C por 10 min, descartándose los sobrenadantes. Los pellets de ARNs precipitados, fueron lavados con 1 ml de etanol 70% (v/v) frío y luego desprendidos del tubo mediante el uso del vórtex. Estos fueron centrifugados a 7500 g a 4 °C por 5 min, descartándose el sobrenadante, repitiéndose este último paso. Los pellets fueron secados a 37 °C por 10 min y resuspendidos en 30 μ l de agua estéril libre de ARNasas.

Cuantificación de Ácidos Nucleicos

La calidad y cantidad de los ADNgs purificados, fueron analizados por lectura espectrofotométrica a 260/280 nm, considerando que $DO_{260}=1$ equivale a 50 μ g/ml de ADN y por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en presencia de bromuro de etidio 0,3 μ g/ml. Para verificar la calidad y concentración de los ARNs, las muestras fueron medidas por espectrofotometría, utilizando radiación UV a 260 y 280 nm. La concentración de los ARNs en solución fue estimada a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que $DO_{260}=1$ corresponde a 40 μ g/ml de ARN, evaluándose su calidad, mediante la corrida de las muestras sembradas en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes y tinción con bromuro de etidio 0,1 μ g/ μ l.

Tratamiento de los ARNs con ADNasa

Para cada una de las muestras a analizar, fue preparada la siguiente reacción (volumen final 10 μ l): 2 μ g ARN (previamente cuantificado por espectrofotometría), 2 μ l solución amortiguadora ADNasa I 10X, 1 μ l ADNasa RQ1 libre de ARNasa y c.s.p. 10 μ l de agua estéril, libre de ARNasa. Estas soluciones fueron incubadas por 30 min a 37 °C y

posteriormente con 1 μ l de solución de detención de la ADNasa durante 10 min a 65 °C para inactivar la enzima y permitir su decantación.

Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)

Los ADNcs fueron sintetizados a partir de los ARNs totales de *A. thaliana* (tratados con ADNasa) utilizando la transcriptasa reversa M - MuLV (*Thermo Scientific, Inc.*). En cada caso, fue agregado 1 μ l de oligonucleótido dT₁₈ 100 μ M y 2 μ g de ARN total tratado con ADNasa, estos fueron incubados a 65 °C durante 5 min para romper las estructuras secundarias del ARN. Transcurridos 5 min, las mezclas fueron rápidamente colocadas en hielo. A continuación fueron agregados secuencialmente, según instrucciones del fabricante (*First Strand Synthesis* de ADNc, *Thermo Scientific, Inc.*) los siguientes componentes: 4 μ l de la solución amortiguadora de la enzima 5X, 1 μ l de *RiboLock RNasa Inhibitor* (20U/ μ l), 2 μ l de dNTPs 10 mM y 200 U de Transcriptasa Reversa M-MuLV RT *Revertaid*, hasta un volumen final de 20 μ l. La reacción fue desarrollada durante 60 min a 42 °C y luego la enzima fue inactivada durante 5 min a 70 °C. Una décima parte del ADNc obtenido fue utilizado como molde en las reacciones de PCR. Finalmente, cada uno de los genes estudiados fue cuantificado tanto por RT-*sq*PCR como por RT-*q*PCR.

Amplificación de fragmentos de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores fue realizado con el programa *Primer-BLAST* (Ye y col., 2012). En el ANEXO I se detallan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

PCR de punto final

En las reacciones de amplificación por PCR fueron desarrolladas con volúmenes finales de reacción de 25 μ l, empleándose por cada reacción 0,25 μ l de la enzima Taq ADN polimerasa (5U/ μ l) (*Thermo Scientific, Inc.*). Como solución amortiguadora de la reacción fue utilizada la provista por el fabricante de la enzima, a la cual se agregaron: 2 μ l MgCl₂ 50 mM; 2,5 μ l dNTP 2,5 mM c/u y 2,5 μ l de la *primer mix* 10X (ANEXO II) alcanzando una concentración final de 0,2 μ M de cada cebador. En esta mezcla de

reacción fueron incorporados el ADN molde y la enzima *Taq* Polimerasa. Las reacciones fueron desarrolladas en el termociclador PTC -100 TM (*MJ Research, Inc.*) utilizando los programas apropiados para cada caso (96 °C durante 2 min; 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, T_m durante 1 min y 72 °C durante 1 min; extensión de 5 min a 72 °C). La temperatura de hibridación fue establecida de acuerdo a cada una de las secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$]. Para los distintos genes estudiados fueron utilizados oligonucleótidos específicos, diseñados usando el programa Primer-BLAST (Ye y col., 2012). (ANEXO I) y para el control interno de expresión (β -tubulina At5g62700, ANEXO I). Las condiciones de amplificación (número de ciclos) fueron seleccionadas de tal manera que ninguna de las muestras analizadas alcance la fase de meseta al finalizar el programa de PCR. Los productos de amplificación obtenidos para cada uno de los pares de oligonucleótidos (incluyendo β -tubulina como gen constitutivo) fueron recogidos cada tres ciclos, a partir del ciclo 25 y hasta el ciclo 34. Para el análisis de cada reacción fueron utilizadas las señales de amplificación obtenidas a partir de la fase exponencial. Asimismo, la inexistencia de competencia entre los cebadores fue corroborada tanto por la amplificación independiente de cada uno de los ADNc problema como coamplificando éstos, con el gen constitutivo. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

A fin de obtener una medida cuantitativa de los niveles de los ARN de interés, se utilizó la técnica de RT-*qPCR*. La misma fue llevada a cabo en un termociclador *iCycler* iQ3 (Bio-Rad®). Una alícuota de 0,2 μ l del producto de la transcripción reversa previamente descrito se utilizó como molde en la amplificación mediada por PCR en tiempo real. La amplificación por PCR se realizó con los cebadores específicos de genes que figuran en ANEXO I. La eficiencia de la PCR varió de 95% a 105%. Todas las muestras se ensayaron en pocillos por triplicado. Las muestras se amplificaron en una reacción de 25 μ l conteniendo 1 \times *SYBR Green Master Mix* (Bio-Rad®) y 300 nM de cada cebador. El perfil térmico consistió en un ciclo por 1 min a 95 °C y 45 ciclos de 20 s a 95 °C, 45 s a 62 °C y 72 °C por 1 min. La eficiencia de unión del oligonucleótido (*primer binding*) fue determinada por regresión lineal y se graficó el valor C_t (*cycle threshold*) versus el

logaritmo de la dilución del ADNc (Soto y col., 2011). Las RT-*q*PCR fueron realizadas por triplicado obteniéndose una alta reproductibilidad de los resultados. Los niveles de expresión alcanzados por los genes en estudio fueron normalizados respecto de la expresión del gen β -tubulina. Cada ejecución, adquisición y análisis de datos fue realizada utilizando el *software* de *iQ iCycler* (versión 3.0a; Bio-Rad®). La abundancia de transcripción en las muestras fue determinada usando el método de Ct comparativo (Livak y Schmittgen, 2001). Brevemente, las cantidades de ADNc de los genes específicos fueron calculadas a partir de valores del ciclo umbral (Ct), expresadas en relación a los controles y normalizadas con respecto al ADNc de la β -tubulina, utilizada como referencia interna. Los valores fueron normalizados por una referencia interna (Ctr) de acuerdo con la ecuación $Ct = Ct - Ctr$. Una segunda normalización por un control (Ctc) $\Delta\Delta Ct = Ct - Ctc$ produce una cuantificación relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Extracción de proteínas totales de *A. thaliana*

En cada caso fueron colocados 50 mg de tejido floral (estadio 13) en un tubo Eppendorf de microcentrífuga. Los tejidos fueron tratados con N_2 líquido y pulverizados utilizándose un micropilón hasta la obtención de un fino polvo. Posteriormente fue adicionado un volumen de la solución amortiguadora de homogeneización para proteínas (ANEXO II) y 33 μ l de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma®, P9599) por gramo de tejido. Luego de la homogeneización, las muestras fueron clarificadas por centrifugación a 10000 g durante 10 min.

Cuantificación de proteínas totales

En cada caso, la cuantificación de las proteínas obtenidas fue realizada utilizando el reactivo de Bradford (Bradford, 1976) (ANEXO II) que permite determinar la concentración de proteínas en solución. El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre la unión del *Brilliant Blue* G-250 y las proteínas en solución, lo que genera un cambio en la absorbancia dentro de un rango de 465 a 595 nm. Esta unión es independiente de la composición de aminoácidos de las proteínas. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de proteínas presentes. El rango de

concentración lineal de la curva estándar de proteínas fue de 0,1-1,4 mg/ml, usando como estándar, albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*). Para la elaboración de la curva estándar fueron preparados una serie de tubos conteniendo 1 ml de una solución de BSA de concentraciones conocidas de 10 a 100 µg a los que fueron adicionados 3 ml de reactivo de Bradford previamente preparado. Los tubos fueron agitados y su absorbancia fue medida a 595 nm después de 2 min y antes de 1 h, usándose un blanco de reactivos preparado en las mismas condiciones, pero omitiendo la proteína. La absorbancia versus la concentración de cada estándar fue graficada y la concentración de proteína de cada muestra fue determinada por comparación con el valor de la absorbancia en dicha curva.

TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la separación de los fragmentos ADNs obtenidos por PCR, fue utilizada la técnica de electroforesis en geles de agarosa de tipo submarino, de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,8 y 1,5% (p/v) de acuerdo con el tamaño de los fragmentos a analizar. Los geles fueron preparados en solución TAE 1X (ANEXO II). En cada caso fueron sembrados 3 µl de ADNg en 1/10 vol de solución de siembra (ANEXO II) y visualizados por tinción con bromuro de etidio 0,3 µg/ml. Las corridas electroforéticas fueron realizadas con solución TAE 0,5X con una intensidad de corriente constante de 80 V. Como patrón de peso molecular fue utilizado el marcador *Ladder* de 100pb (Promega®). Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador UV ($\lambda=310$ nm).

Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes

Para realizar la corrida electroforética de ARNs en condiciones desnaturalizantes se sembraron 20 µg de ARN por calle (previamente cuantificados por lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm). Previo al sembrado, las muestras fueron desnaturalizadas mezclando 1 volumen de ARN en solución acuosa y 3 volúmenes de solución de desnaturalización [formamida 66% (v/v); HEPES 1,3X y formaldehído 8% (p/v)]. Estas mezclas fueron incubadas a 65 °C durante 5 min. Los geles en condiciones desnaturalizantes fueron preparados con agarosa 1,5 % (p/v) en solución

amortiguadora HEPES 1X (pH=7,8) y formaldehído 6% (p/v) según Ausubel y col., 1987. Las muestras a sembrar fueron diluidas con 1/10 volúmenes de solución de siembra (ANEXO II) y teñidas con 1/20 volúmenes de solución de bromuro de etidio 0,3 mg/ml. La electroforesis fue desarrollada en solución de HEPES 1X, a 80 V. Los geles fueron visualizados mediante un transiluminador UV ($\lambda=310$ nm).

Electroforesis y cuantificación de proteínas ARMs en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica fue desarrollada utilizando geles verticales de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico, dodecil-sulfato sódico (SDS), según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las electroforesis fueron desarrolladas en un sistema Mini-PROTEAN® (Bio-Rad®). Los geles de concentración fueron preparados al 5% en solución tampón Tris-HCl 1M pH=6,8 y SDS al 0,4%. Los geles de separación fueron preparados al 7,5% en solución tampón Tris-HCl 1,5M pH=8,8, conteniendo SDS 0,4% (p/v), persulfato de amonio 0,05% (p/v) y TEMED 0,5% (p/v). 20 μ l de cada muestra de proteína previamente cuantificada por Bradford (concentración no superior a los 10 μ g de proteína por pocillo) en presencia de 5 μ l de la solución amortiguadora de siembra 5X de proteínas (ANEXO II). Las muestras fueron calentadas a 100 °C durante 3 min, centrifugadas y sembradas en cada uno de los pocillos. Como marcador de peso molecular se utilizó el *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (Bio-Rad®, 161-0373). Las electroforesis fueron desarrolladas a voltaje constante (200 V durante 1 h), tras la cual los geles fueron teñidos con *Coomassie® Brilliant Blue G- 250* o fueron utilizados para la transferencia a membranas de PVDF.

Para la evaluación de posibles cambios en la síntesis de proteínas ARMs, se realizó la cuantificación de las intensidades de las bandas presentes en los geles, en relación a la intensidad de las bandas correspondientes a la subunidad mayor de RubisCO, utilizando el programa *ImageJ*, tanto para las plantas control, como para las sometidas a los distintos tratamientos. Dicha cuantificación fue realizada promediando los valores de intensidad de bandas correspondientes a cada uno de los tres grupos identificados por *western blotting*.

ELECTROTRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF

Las proteínas previamente sometidas a SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) *Immobilion™* (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) con tamaño de poro de 0,45 μm , mediante el sistema *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad® laboratories, Richmond, CA, USA) según las especificaciones del fabricante: brevemente, de acuerdo al tamaño del gel a transferir, fueron seccionadas dos piezas de papel *Whatman* y una membrana de PVDF del mismo tamaño que el gel a transferir (7 cm x 8 cm). El papel *Whatman* y las almohadillas de fibra fueron equilibrados en solución amortiguadora de transferencia (ANEXO II) durante al menos 15 min. La membrana de PVDF fue activada prehumedeciéndola con metano metanol 100% durante 2 min, sumergida en agua bidestilada durante 5 min para eluir el metanol y equilibrada con solución amortiguadora de transferencia (BT) durante 5 min, para desplazar el agua. Los diferentes componentes fueron colocados en “sándwich” en el siguiente orden: almohadilla de fibra, lámina de papel *Whatman*, el gel de poliacrilamida y almohadilla de fibra. La transferencia de las proteínas a la membrana fue desarrollada aplicando una corriente constante de 30 mA – 9V durante toda la noche. El proceso fue desarrollado utilizando la tinción reversible con rojo *Ponceau* para verificar la transferencia de proteínas desde el gel hacia la membrana. Las membranas fueron teñidas con una solución de 0,5% (p/v) de rojo *Ponceau* en 1% (v/v) de ácido acético durante 1 min, seguida de descoloración en agua hasta la obtención del contraste deseado y de un lavado con NaOH 0,1 N para remover completamente la tinción.

Inmunodetección

La detección de proteínas específicas transferidas desde el gel de poliacrilamida a la membrana, fue realizada utilizando anticuerpos primarios anti-ARM. El anticuerpo primario fue seleccionado evaluando el grado de conservación de residuos de aminoácidos en cada posición (WebLogo 3.0: [http://weblogo.threeplusone.com /](http://weblogo.threeplusone.com/)) en cada repetición ARM de *A. thaliana*. Puesto que presenta un bajo nivel de conservación residuos de aminoácidos, se utilizó un anticuerpo cuyo epítipo reconoce diferentes regiones de las repeticiones ARM. De dicho análisis surgió que el anticuerpo más adecuado es el anticuerpo policlonal anti-ARMC8 (H- 300: sc- 98534, Santa Cruz

Biotechnology, Inc.) que reconoce 7 repeticiones ARM (de las 14 presentes en la proteína). El ARMC8 es un anticuerpo dirigido contra los residuos de aminoácidos 311-610 dentro de una región interna de ARMC8 de origen humano.

Para el bloqueo de reacciones inespecíficas las membranas fueron tratadas con BSA 3% (p/v) en TBS. El proceso fue realizado con agitación continua durante 2 h a T_{amb} , seguido de tres lavados. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el AC primario anti-ARMC8 [dilución 1/200 en 10 ml de SB2] (0,5% BSA en TBS) durante toda la noche a 4 °C con agitación.

El anticuerpo primario fue removido por lavado con TBS (2 veces por 10 min cada una). Posteriormente las membranas fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario *Anti-Mouse, Rabbit and Rat IgG Biotin Conjugates* (Sigma®, B1404) [dilución 1/500 en 10 ml de SB2] con agitación constante. Posteriormente el AC 2^{rio} fue descartado y las membranas fueron lavadas con TBS 3 cambios durante 30 min y posteriormente con al menos 3 cambios de SB2, 15 durante min con agitación constante. El revelado fue desarrollado; incubando las membranas con el reactivo *Vectastain ABC*® (Anexo II) al menos 30 min con agitación constante. Posteriormente fueron transferidas a la solución del sustrato DAB (Sigma®, D4418), variando el tiempo de incubación para cada sustrato (máximo 3 min a T_{amb}). Finalmente, las membranas fueron lavadas con agua destilada (2 cambios de 5 min cada una) y dejaron secar al aire. Las mismas se conservaron en la oscuridad y a 4 °C hasta su registro fotográfico.

TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Giberelinas (GA)

El tratamiento con GA fue realizado tanto en plantas salvajes de *A. thaliana* (Col 0) como en plantas mutantes *pub16* y *gid1a* de estadio 13 por triple aspersion cada 2 días con 100 μ M y 1000 μ M de GA₃ (Sigma®, G7645) bajo condiciones de crecimiento controladas. Para cada tratamiento fueron registrados dos parámetros: los valores de altura de plantas hasta floración y días a floración. El experimento fue repetido dos veces. De cada replica, fueron recolectadas al azar 50 flores tratadas, estas fueron congeladas y almacenadas en N₂ líquido para su posterior extracción de ARN y

proteínas. Como control negativo del experimento, el GA fue reemplazado por el vehículo (agua bidestilada, bdH₂O).

Ácido Abscísico (ABA)

Para los tratamientos con ABA (Sigma®, A1049) 50 flores de *A. thaliana* (Col 0) en estadio 13 fueron seleccionados al azar de diferentes plantas. Las concentraciones y los tiempos seleccionados fueron: 100 µM y 200 µM durante 2, 4, 8, 11 o 24 h. Estas fueron colocadas en un disco de poliestireno con pequeños agujeros que contienen las soluciones de ABA. Todo el arreglo fue dispuesto en cajas de Petri. Para ambas concentraciones de ABA y los cinco tiempos ensayados, los experimentos se repitieron dos veces. Las flores tratadas fueron congeladas y almacenadas en N₂ líquido para su posterior extracción de ARN y proteínas. Como controles experimentales, el ABA fue reemplazado por el vehículo (bdH₂O). La medición de la longitud de los pistilos fue realizada registrando imágenes de flores mediante una lupa binocular (Modelos TL3, Olympus) equipada con una cámara digital (Nikon). La longitud del pistilo fue establecida como la distancia desde la base del pistilo a la base de las papilas estigma y las mediciones fueron realizadas sobre los registros, utilizando el programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, EE.UU.).

Estrés salino

El estrés salino fue desarrollado de acuerdo al procedimiento de Shavrukov, 2012 con 50 mM y 100 mM de NaCl (Sigma®, S5886) durante 10 días a partir del estadio de roseta de 8 hojas en plantas de *A. thaliana* (Col 0). El riego con solución Hoagland modificada, fue retomado una vez transcurrido el período de tratamiento. Para cada tratamiento fueron registrados dos parámetros: altura de plantas hasta final de floración y días a floración. El experimento se repitió dos veces. De cada réplica, fueron colectadas al azar 50 flores, las que fueron congeladas y almacenadas en N₂ líquido hasta su utilización para la extracción de ARN y proteínas. Como control experimental, el NaCl fue reemplazado por solución Hoagland.

INMUNOFLORESCENCIA DE PROTEÍNAS ARM

Para la localización de proteínas *in situ* en montaje completo fue utilizada la técnica de Sauer y col., 2006 con leves modificaciones.

Las flores de plantas de *A. thaliana* salvaje y las mutantes *pub16* y *gid1a* tanto crecidas bajo condiciones normales, como tratadas con GA fueron colocadas en tubos de microcentrífuga en la solución fijadora por 5 h a T_{amb} (ANEXO II). Posteriormente fueron lavadas con 1X PBS a T_{amb} , (dos veces durante 5-10 min c/u), seguida de dos lavados con agua destilada (5 min c/u) y depositadas sobre un portaobjetos con una gota de agua hasta su completo secado (~ 1 h a T_{amb}). Las muestras fueron rehidratadas con PBS 1X a T_{amb} , y luego de descartar el excedente, los portaobjetos fueron transferidos a cámara húmeda e incubados en PBS-celulosa 0,5% y macerozima 0,15% 15 min a 37 °C. Después de dos lavados con PBS 1X las muestras fueron tratadas con Tritón X-100 durante 1 h a T_{amb} . Transcurrido dicho período, el Tritón X-100 fue eliminado, el material lavado con PBS 1X e incubando durante 5-10 min a T_{amb} repitiendo esta etapa de lavado entre 5 y 10 veces adicionales.

Los estigmas fueron incubados con BSA al 3% durante 60 min a T_{amb} . Luego de eliminar el BSA los estigmas fueron incubados con 150 μ l del anticuerpo primario: *Rabbit Polyclonal anti-ARMC8 (armadillo repeat containing 8)* (sc-98534, Santa Cruz Biotechnology Inc®.) dilución 1/50. Los tejidos fueron cubiertos con tiras de *Parafilm* y los portaobjetos transferidos a cámara húmeda e incubados durante toda la noche a 4 °C.

El anticuerpo primario fue eliminado utilizando PBS 1X de los portaobjetos e incubado 10 min a T_{amb} , este paso fue repetido cinco veces. Posteriormente fue agregado el anticuerpo secundario: *Goat anti-rabbit IgG-Cy3 conjugated antibody*, dilución 1/500 (Chemicon-Millipore®, AP108C) sobre los portaobjetos, durante 3 h a 37 °C. Transcurrido dicho período el anticuerpo secundario fue eliminado de los portaobjetos y los tejidos fueron lavados con PBS 1X e incubados durante 10 min a T_{amb} . Este paso fue repetido cinco veces. A continuación fue eliminado el PBS 1X, seguido de la adición de medio antidecayente (VECTASHIELD®, Vector #H1400) a los portaobjetos. Finalmente, los tejidos fueron cubiertos con cubreobjetos y mantenidos en la oscuridad hasta su observación. Las observaciones y registros fueron realizados bajo el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX50) y mediante una cámara de CCD refrigerada Apogee.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA MUTANTE *PUB16*

Dicho procedimiento debió realizarse antes de acometer los estudios experimentales, ya que al presente no se hallaron registros de la caracterización fenotípica de las plantas mutantes *Atpub16*. Para la selección de los parámetros se siguieron los criterios establecidos por Griffiths y col., (2006) y se éstos fueron comparados con obtenidos en plantas salvajes, tanto las crecidas en condiciones de sustrato estéril, como *in vitro*. Cada condición fue realizada por octuplicado. En los tratamientos con GA se seleccionó la concentración de 1000 μM , 3 veces por semana, tanto en el periodo vegetativo, como en el reproductivo; siguiendo los procedimientos detallados previamente. Se evaluó el período que abarca el fin estadio de plántula hasta el fin de la floración (aparición de silicuas).

Las variables relevadas fueron:

- ✦ **Período de germinación:** para la determinación de dicho valor fueron contados los días desde la siembra, hasta la aparición de las 2 primeras hojas cotiledonares. Esta determinación fue realizada a ojo desnudo.
- ✦ **Medición de la longitud de la rama principal:** para la evaluación de la altura de la rama principal las plantas fueron tutoradas mediante precintos fijados a una columna por cada maceta generando una serie de anillos. La medición fue realizada cada 48 h.
- ✦ **Medición del diámetro de la roseta:** esta fue realizada sobre las 2 hojas en estado vegetativo de mayor tamaño, una vez que la medida fue constante durante 3 mediciones sucesivas, luego de la elongación de la vara floral.
- ✦ **Elongación foliar:** los valores de longitud foliar fueron relevados desde el momento de la aparición de la primera hoja verdadera, hasta valores constantes de la misma. Dicha operación fue llevada a cabo cada 48 h.
- ✦ **Medición de longitud radicular:** la siembra fue realizada según el apartado “condiciones de crecimiento” y las mediciones fueron tomadas por un calibre.
- ✦ **Recuento de silicuas, características y número de granos:** el recuento fue realizado sobre la rama principal de cada planta para cada tratamiento experimental y los valores obtenidos fueron promediados. Para la determinación de las características morfológicas de las silicuas fueron

utilizadas las silicuas que se encontraban aproximadamente en la mitad de la rama principal, el criterio fijado consistió en tomar las medidas promediando los valores obtenidos mediante el relevamiento de las silicuas 16^{ta} a la 20^{ma}. Fueron medidos tanto el largo como el ancho de las mismas. Dicha medición fue realizada una vez que la planta dejó de emitir flores sobre la rama principal. Para el diámetro, longitud y número de granos en las silicuas se aguardó que éstas evidenciaran cierto grado de senescencia, indicio fehaciente de cese de actividad fisiológica de crecimiento. Para el recuento de granos se tomó una silicua de la posición 18^{va} o la más cercana en el caso de que ésta fuese infértil.

- ✦ **Días a floración:** dicho parámetro fue determinado contando los días transcurridos desde la emergencia de la plántula hasta la aparición de la primera flor.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos los estudios se realizaron por triplicado o quintuplicado (dependiendo de cada ensayo). Los datos adquiridos fueron promediados y en cada caso se calculó el desvío estándar (SD). Los datos fueron analizados por análisis unidireccional de varianza, utilizando el programa SAS (*Statistical Analysis Systems*, SAS. Institute, Inc., 1999). Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias de medias fueron obtenidas por el *test* de Tukey ($\alpha = 0,05$) para cada uno de los ensayos de cuantificación tanto de expresión génica como los de síntesis de proteínas. Las columnas con diferentes letras corresponden a las diferencias estadísticas detectadas. Para el ensayo de polinización y la selección de tratamientos se utilizó el *test* de *Student*. Los asteriscos indican el grado de significatividad estadística de las diferencias encontradas entre las plantas tratadas y las plantas control (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LA NATURALEZA QUÍMICA DE LA ADHESIÓN POLEN-ESTIGMA EN *A. THALIANA*

Para estudiar la naturaleza química de la adhesión polen-estigma en *A. thaliana*, se examinaron compuestos que interfieren con las interacciones electrostáticas o hidrofóbicas y que se postula que podrían estar involucrados en la perturbación de los contactos adhesivos. Se realizaron incubaciones de 5 estigmas por 1½ h, con diferentes compuestos químicos preparados en distintas concentraciones según se especificó en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. Para la cuantificación de granos de polen adheridos a los estigmas se utilizó azul de anilina como colorante específico para calosa, un polisacárido presente en las paredes celulares y los tapones de los tubos polínicos de la mayoría de las angiospermas (O'Brien y McCully, 1981).

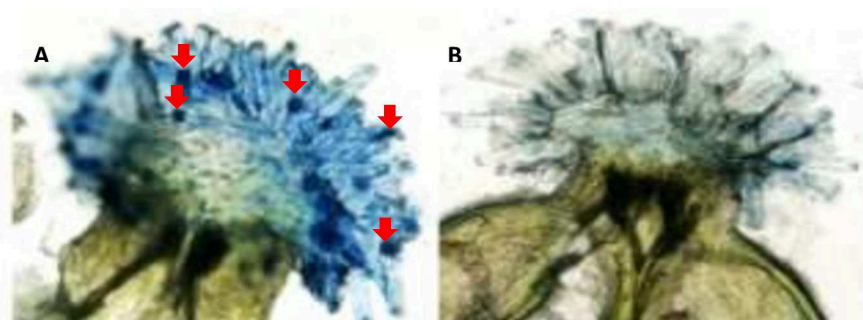


Figura 24: Tinción con azul de anilina de granos de polen adheridos al estigma de *A. thaliana* salvaje. A la izquierda se muestra estigma polinizado (A) y a la derecha uno sin polinizar (B). Las flechas señalan algunos de los granos de polen (azul oscuro) adheridos.

En la figura 24 se muestran ejemplos de estigmas de *A. thaliana*, teñidos con azul de anilina observados por microscopía de luz transmitida. Dado que este colorante se une al polisacárido calosa impregnando algunas membranas y obturando los orificios de las paredes celulares transversales de los tubos cribosos, permite la visualización de cada uno de los granos de polen y su correspondiente cuantificación. Dicho procedimiento se repitió para cada uno de los cinco estigmas incubados en cada una de las

concentraciones evaluadas para cada compuesto químico usado en el estudio (Tabla 1).

Compuesto químico	Rango de concentraciones
Etanol	10% - 100%
NaCl	0,01 M - 4 M
LiCl	0,01 M - 8 M
EDTA	0,01 M - 1 M
Urea	0,01 M - 8 M
DTT	0,5 mM - 250 mM
Tripsina	0,05 mg/ml - 3,5 mg/ml
Ácido acético	0,25 M - 2 M
Ácido clorhídrico	0,125 N - 2 N
Hidróxido de sodio	0,125M - 4M
Tritón X-100	0,05% - 1%
SDS	0,01% - 2 %

Tabla 1: Compuestos químicos con sus respectivos rangos de concentraciones utilizados para evaluar la naturaleza química de la interacción polen-estigma.

En la tabla 1 se muestran los rangos de concentraciones de los compuestos químicos ensayados: cloruro de sodio (NaCl), EDTA, urea, ditiotreitól (DTT), tripsina, cloruro de litio, etanol, SDS, ácido acético, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y Tritón X-100. En las figuras 25 y 26 se resumen los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos (diferentes compuestos químicos en distintas concentraciones).

En estos ensayos se corrobora que algunos tratamientos permiten la remoción de los granos de polen del estigma y con otros no se observa este efecto. Algunas sales, incluyendo el NaCl hasta 1M y altas concentraciones de LiCl, o caótopos como urea 6M, resultan completamente ineficaces en la remoción de los granos de polen unidos al estigma. Esto puede observarse dado que el número de granos de polen que permanecen unidos, es similar al control negativo del experimento. De la misma manera, se pudo observar que el etanol, tampoco logra el desprendimiento del grano de polen, aun en altas concentraciones. Lo propio ocurrió en los tratamientos enzimáticos con proteasas, como la tripsina, que no fueron efectivos en remover los granos de polen adheridos, aunque estas enzimas por el método empleado, podrían haber tenido un acceso limitado a las moléculas de adhesión bajo estudio (Figura 25).

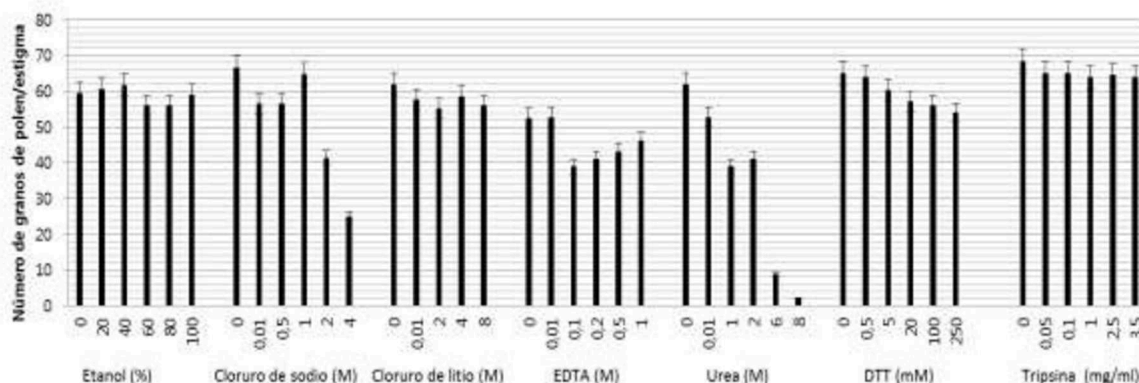


Figura 25: Diferentes concentraciones de agentes químicos que resultan incapaces de remover granos de polen adheridos a estigmas de *A. thaliana*.

Tanto los ácidos (clorhídrico y acético) como la base (hidróxido de sodio) sólo fueron efectivos en la remoción del grano de polen a concentraciones en las cuales la integridad del tejido se vio comprometida. Sin embargo, algunos agentes químicos fueron efectivos en bajas concentraciones, como el detergente desnaturalizante aniónicos (SDS) y el no desnaturalizantes no iónicos (Tritón X-100). La adhesión polen-estigma fue también resistente a agentes reductores fuertes como el DTT.

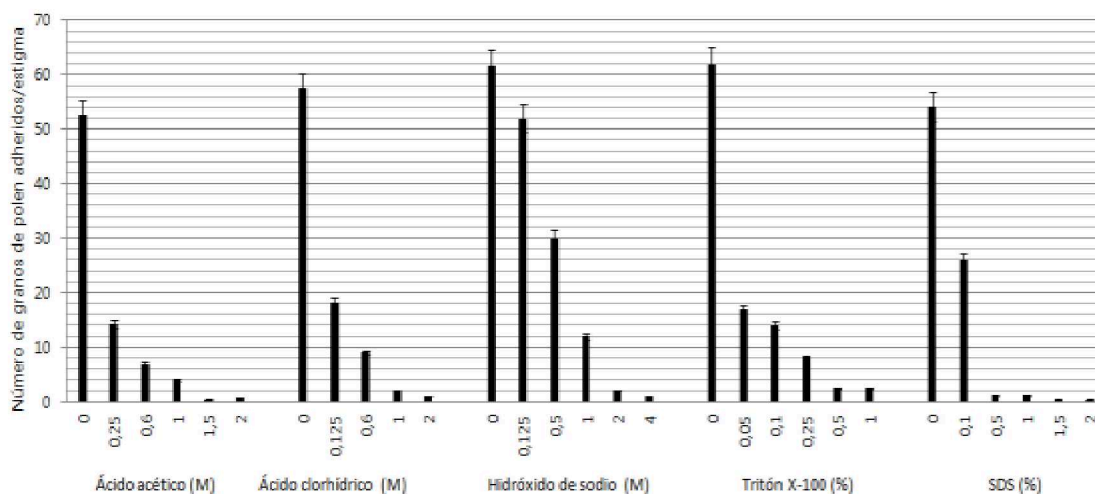


Figura 26: Diferentes concentraciones de los agentes químicos con capacidad de remover los granos de polen adheridos a estigmas de *A. thaliana*.

En la tabla 2 se resumen las concentraciones mínimas necesarias para reducir la adhesión del polen al estigma y las concentraciones mínimas para la remoción completa de los granos de polen para aquellos compuestos químicos que resultaron capaces de afectar la interacción polen-estigma.

Compuesto químico	Concentración mínima para reducir la adhesión*	Concentración mínima para la remoción completa de granos de polen
Ácido acético	0,25 M	1,5 M
Ácido clorhídrico	0,125 N	1 N
Hidróxido de sodio	0,5 N	2 N
Tritón X-100	0,05%	0,5%
SDS	0,1%	1,5%

Tabla 2: Agentes químicos capaces de remover granos de polen: concentración mínima para reducir la adhesión y concentración mínima de los mismos para la remoción completa de los granos de polen adheridos a los estigmas. *Concentración a la cual el 50% de los granos de polen son removidos

MORFOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE LAS ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS INVOLUCRADAS EN EL CONTACTO POLEN-ESTIGMA EN *A. THALIANA*

Para la caracterización morfológica e histológica de las estructuras reproductivas (polen y estigma), se utilizaron técnicas de microscopía óptica de luz transmitida directa (MO), electrónica de transmisión (MET), electrónica de barrido (MEB) y de epifluorescencia (MEF). Estas técnicas se llevaron a cabo según los protocolos de fijación, deshidratación, inclusión en resinas y seccionamiento previamente reportados (Kandasamy y col., 1994, Ruzin, 1999, Sorensen y col., 2002), descritos en la sección Materiales y Métodos.

Morfología del polen y estigma utilizando MO y MET

La morfología de las estructuras reproductivas involucradas en el contacto inicial, es decir, entre la cubierta del polen y el estigma, se llevó a cabo utilizando MO mientras que la interacción polen-estigma a nivel ultraestructural se realizó por MET. Para ello se realizaron las inclusiones en los medios correspondientes según el tipo de técnica de microscopía a utilizar: parafina o Histoplast® para MO y resinas tipo epoxi para MET (Acosta y col., 2008).

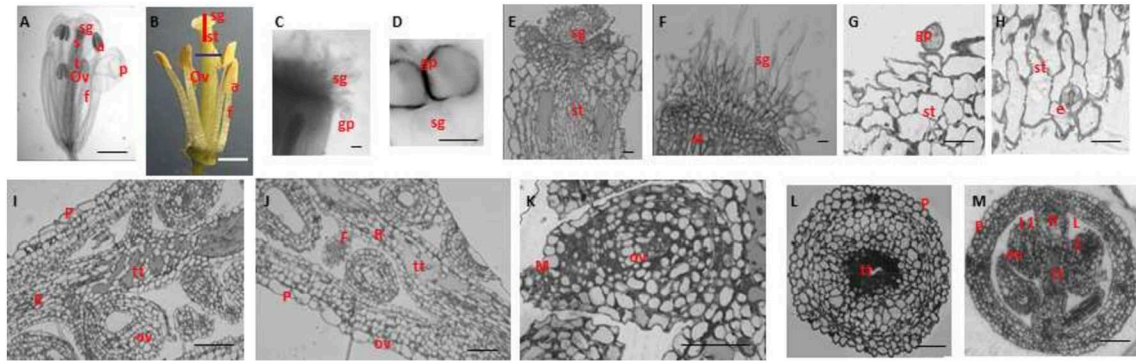


Figura 27: Caracterización morfológica de las estructuras reproductivas de *A. thaliana* utilizando MO. (A) Diafanizado y tinción con safranina de la flor completa. (B) Orientación del corte de la estructura a estudiar (cortes transversales: barra azul y longitudinales: barra roja. (C) y (D) interacción polen-estigma. (E) Corte semifino con ultramicrotomo del estigma y estilo utilizando el protocolo de inclusión en Araldita. (F) Corte con microtomo tipo Minot correspondiente al estigma y estilo utilizando protocolo de inclusión en parafina o Histoplast®. (G) Interacción polen-estigma. (H) Estomas en el estilo. (I), (J) y (K): Cortes longitudinales del ovario. (L) y (M): cortes transversales del ovario. En ambos sentidos de corte puede observarse la disposición característica de las estructuras reproductivas del género *Arabidopsis*. Barra: 1 mm (a-b); 10 µm (c-h) y 20 µm (i-n). a: antera; c: citosol; ct: cutícula; dc: depósitos de calosa, dl: depósito lipídico, e: estoma; f: filamento; F: funículo; gp: grano de polen; L1: lóculo 1; L2: lóculo 2; M: micrópilo; Ov: ovario; ov: óvulo; P: pared del ovario; p: pétalo; pp: papila estigmática; R: *replum*; sg: estigma; st: estilo; Tp: tubo polínico; tt: tejido de transmisión.

Para los estudios ultraestructurales, se ensayaron inicialmente inclusiones utilizando dos resinas tipo epoxi: Araldita 502 y Epon 812. Los cortes semifinos de 0,5 µm obtenidos por ultramicrotomía fueron registrados con la cámara CCD acoplada al microscopio óptico. En la figura 27 se observan los resultados obtenidos para la caracterización por MO. El seccionamiento se llevó a cabo en flores en estadio 13, en el que los pétalos se hacen visibles entre los sépalos y continúan alargándose rápidamente. El estigma es receptivo en esta etapa (Figura 27 (A)). Los filamentos de los estambres se extienden aún más rápido por lo que éstos superan la longitud del gineceo, habilitando así el proceso de autopolinización. En el gineceo maduro se pueden distinguir sus tres regiones: un estigma apical, un estilo, (Figura 27 (E)) y un ovario basal (Figura 27 (I–M)). En los cortes longitudinales pueden observarse los óvulos de orientación parietal y sus respectivos rudimentos seminales de tipo anátropo, esto es, con la curvatura localizada a nivel del funículo. En la extremidad libre del rudimento se observa una pequeña abertura en los tegumentos llamado micrópilo (Figura 27 (K)). En los cortes transversales del ovario pueden distinguirse claramente dos lóculos, en los que se encuentran alojados de 15 a 20 óvulos parietales separados por el tejido de transmisión y el correspondiente *replum* (Figuras 27 (L) y (M)). Una vez que se produce la polinización, los tubos polínicos crecen alcanzando los

óvulos para fecundar, los estambres se extienden por encima del estigma y se define la delimitación entre el *replum* y las valvas.

Además, se observa la presencia de granos de polen tricolpados y trinucleados, típicas estructuras adaptadas a la germinación sobre estigmas secos donde la hidratación es lenta y regulada. Cuando las flores fueron incluidas en la resina Epon 812, dada su baja viscosidad exhibió mejor capacidad de infiltración y su seccionamiento resultó más adecuado y sencillo comparado a la infiltración con Araldita.

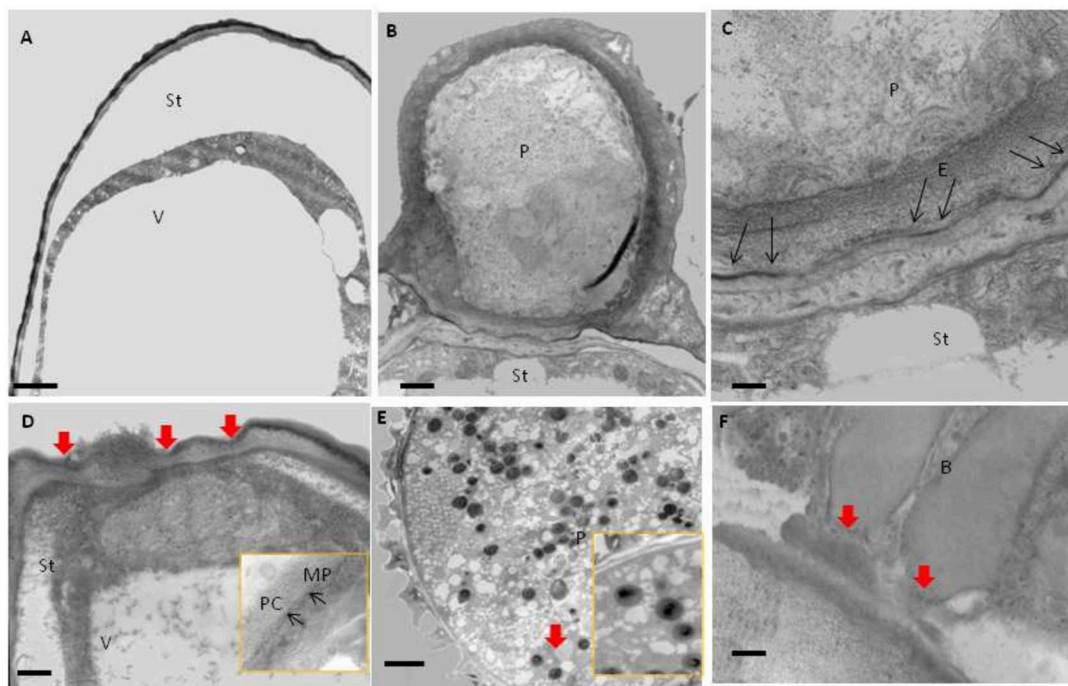


Figura 28: Ultraestructura del estigma y del grano de polen de *A. thaliana*. (A) Morfología característica de una papila estigmática previa al contacto con el grano de polen, (B) Imagen de un grano de polen en contacto con la papila, (C) Detalle de la interacción polen-estigma, nótese que los precipitados osmiofílicos (flechas) característicos de depósitos lipídicos se disponen de modo discontinuo indicando que la interacción puede no ser exclusivamente lipídica. (D) Detalle ultraestructural de una papila de la cuál ha sido removido el grano de polen. Las flechas indican la huella del grano de polen. Se indica en el extremo inferior derecho la pared celular y membrana plasmática del estigma, (E) Ultraestructura de un grano de polen hidratado mostrando los depósitos lipídicos osmiofílicos en su interior (flecha), (F) Imagen representativa del detalle de las báculas del grano de polen en el contacto inicial con el estigma, se indica con la flecha el depósito lipídico característico del contanto, B: báculas; E: exina; P: grano de polen; PC: pared celular; MP: membrana plasmática; St: estigma; V: gran vacuola central. Barras en: (A), (B) y (D) 0,5 μm ; (C) 1 μm ; (F) 0,2 μm ; (E) 2 μm .

Utilizando MET y como un primer paso para el posterior análisis del sistema molecular que se intentaba estudiar, se caracterizó la compleja estructura subcelular de la interacción polen-estigma. En la figura 28 se observan los detalles ultraestructurales de los componentes involucrados en dicho proceso. La figura 28 (A) es una imagen

panorámica, de baja magnificación, representativa de una papila estigmática en los momentos que preceden al contacto con el grano de polen. En la imagen puede visualizarse claramente la separación del complejo formado por la cutícula, la pared celular, la membrana plasmática de la papila, respecto de la membrana que limita a la vacuola. También se destaca el escaso a nulo contenido particulado en el interior de vacuola, reflejando una exigua actividad metabólica. Dicha situación es característica de esta estructura en los períodos que preceden el establecimiento del contacto polen-estigma. Las figuras 28(B) (panorámica) y 28(C) (con mayor magnificación), ejemplifican momentos iniciales de la interacción del complejo polen-estigma. En esta fase se destaca la presencia de un precipitado osmiofílico discontinuo entre ambas estructuras reproductivas. Dicho depósito corrobora el carácter lipídico de la interacción, constituyendo una característica típica de la interacción de los estigmas secos con los granos de polen. Sin embargo, el examen más cuidadoso del fenómeno revela que la interacción no es uniforme, representando un hallazgo original que impide caracterizar esta interacción como exclusivamente lipídica. Asimismo, en esta imagen se observa claramente la reorientación de la red vacuolar hacia el sitio de contacto (Figura 28(C)).

La figura 28(D) constituye un ejemplo de la generación de una huella o *footprint* en la superficie de la papila a *posteriori* de la remoción del grano de polen como consecuencia de la acción de agentes físicos, químicos (o una combinación de ambos) como los descritos en el apartado precedente. Adicionalmente, en esta imagen se observan claramente los cambios acaecidos en la vacuola, la que luego del contacto con el polen, adquiere abundante material particulado en su interior y se orienta hacia el punto de contacto, reflejando una intensa actividad metabólica (flechas rojas) en respuesta al contacto previo con el grano de polen.

Las figuras 28(E) y 28(F) muestran la ultraestructura del grano de polen, con los característicos depósitos lipídicos, las báculas electrodensas y el *tectum*. Se destacan las vacuolas dilatadas que se crean por la fusión de pequeñas vacuolas preexistentes (Owen y Makaroff, 1995) posteriormente sufren escisiones por la invaginación del tonoplasto y algunas vacuolas son excitadas (Yamamoto y col., 2003). El análisis ultraestructural del sistema en estudio permitió corroborar características descriptas

en la bibliografía, pero también sembró nuevos interrogantes a develar en el presente trabajo de tesis.

Caracterización del Polen y el Tubo Polínico por MEF y MEB

Ensayo de polinización utilizando MEF

Como se indicó previamente, el procedimiento estandarizado para el estudio de los estigmas y estilos polinizados, es mediante la tinción con el colorante azul de anilina, específico para calosa y su observación por microscopia de fluorescencia (O'Brien y McCully, 1981). Las paredes de los tubos polínicos y los tapones de calosa producidos en el interior de los mismos, muestran una señal de fluorescencia característica (Kearns e Inouye, 1993). Esta prueba también es útil para determinar la presencia de autoincompatibilidad gametofítica en la que los tubos polínicos incompatibles son arrestados durante el crecimiento del tubo polínico en el estilo.

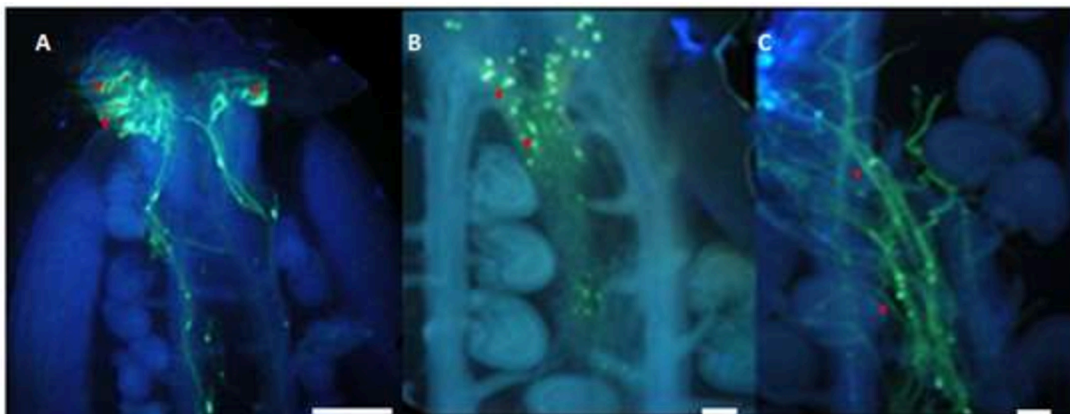


Figura 29: Ensayo de polinización de *A. thaliana*. Luego de la interacción polen-estigma, el grano de polen se hidrata y germina (A). El tubo polínico emerge luego de esto y avanza por el estilo y tracto de transmisión (B) hasta alcanzar los óvulos donde ingresa a través del micrópilo (C). Se indican los depósitos de calosa con flechas rojas. Barra en (A): 50 μm , barras en (B) y (C): 100 μm .

El ensayo de polinización utilizando MEF (Figura 29) permitió llevar adelante todos los experimentos funcionales que permitieron la detección y cuantificación específica de los contactos polen-estigma. Este bioensayo permite diferenciar los sistemas SI de los SC y detectar los granos de polen germinados y los depósitos de calosa sintetizados a lo largo del tubo polínico (Kerhoas y col., 1983), característicos de una especie SC como *A. thaliana*.

Morfología del polen utilizando MEF y MEB

Utilizando MEF combinada con MEB se llevó a cabo la caracterización de los granos de polen. En la figura 30A se observan granos de polen teñidos con azul de anilina, donde se destacan los colpos o aperturas de la exina. A través de estas estructuras ocurre su germinación, con la posterior emergencia del tubo polínico. En las micrografías correspondientes a MEB (Figuras 30B y C) se observan los granos de polen característicos, con el reticulado propio de las especies del género *Brassica*.

Como para la mayoría de las angiospermas, el grano de polen posee una pared de doble capa (endexina debajo de la ectexina) separados por báculos o columelas (Saenz Laín, 2004). Las báculos se encuentran formando un patrón regular. Estas especies de columnas poseen generalmente un agrandamiento apical, que permite que establezcan contactos entre sí, dando lugar al *tectum* con un típico patrón reticulado, como es el caso de *A. thaliana*. Dentro de los parámetros morfológicos más importantes para los granos de polen, se midieron la longitud o eje polar: $P=28\ \mu\text{m}$, diámetro ecuatorial $E=21\ \mu\text{m}$ (relación $P/E= 1,33$). La morfología del grano de polen es del tipo subprolato (en los que la relación entre el eje polar y el diámetro ecuatorial debe encontrarse en el rango 1,14 a 1,33), con tres colpos. Estas aperturas alargadas se observan claramente dado que presentan una disminución en el grosor de la exina. Estas características pueden ser identificadas utilizando ambos tipos de microscopía MEF y MEB.

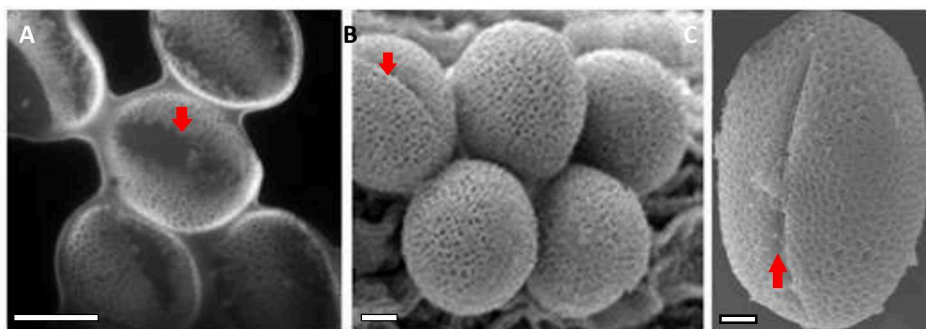


Figura 30: MEF y MEB para caracterizar los granos de polen de *A. thaliana*. (A) MEF de los granos de polen donde se observan los colpos y la estructura reticulada de la exina. (B) y (C) MEB de los granos de polen. Las micrografías electrónicas fueron utilizadas para la caracterización morfológica del mismo, como se describe en el texto.

ESTUDIO DE PROTEÍNAS CON REPETICIONES ARMADILLO EN *A. THALIANA*: ATARMS

Caracterización funcional de la familia de proteínas AtARMS, utilizando herramientas bioinformáticas

Análisis filogenético de proteínas AtARMS

Luego de la caracterización morfológica de la interacción polen-estigma, y en función de los hallazgos que permitían relativizar que en dicho proceso la interacción fuese exclusivamente de índole lipídica, se realizaron estudios bioinformáticos con el objetivo de encontrar probables proteínas del estigma que pudiesen estar involucradas en la vía de señalización que se dispara como consecuencia de dicho contacto. Como se demostró previamente, esta interacción es de naturaleza lipofílica como evento inicial, que se complejiza a continuación por la activación de una cascada de señalización que permite la aceptación o rechazo del polen propio mediado por interacciones de naturaleza proteica. En *B. napus*, se ha postulado que en esta vía participan proteínas claves, como BnARC1, pertenecientes a la súperfamilia de proteínas con ARM. En la presente tesis se realizó la búsqueda de proteínas con un alto grado de homología a BnARC1 en *A. thaliana*. Para realizar un rastreo (*screening*) de los genes de las proteínas ARM presentes en el genoma de *Arabidopsis* se utilizó la base de datos TAIR. Mediante dicho procedimiento, se encontraron 113 posibles polipéptidos pertenecientes a la súperfamilia de proteínas AtARM, codificados en 113 *loci*. Con el objetivo de comparar las secuencias de residuos de aminoácidos de estos posibles polipéptidos se alinearon las secuencias de aminoácidos de esta súperfamilia de proteínas AtARM, con la secuencia de aminoácidos correspondiente a ARC1. Como fue indicado en la introducción, BnARC1 es un polipéptido ARM involucrado en la aceptación o rechazo del polen propio en especies de *Brassica* (Stone y col., 2003). Para incrementar la consistencia de los resultados bioinformáticos, algunos autores sugieren utilizar procedimientos conciliatorios empleando diferentes métodos filogenéticos (Peña, 2011). En la presente tesis, se adoptó este último criterio para conferir un mayor grado de confiabilidad a los estudios. Para ello se utilizaron tres algoritmos de reconstrucción diferentes, basados en distintos principios de ponderación, para la construcción de árboles filogenéticos: un algoritmo basado en una matriz de distancias *Neighbor Joining* (NJ) (Letunic y Bork, 2007), un algoritmo

para la construcción del árbol filogenético basado en el método de máxima parsimonia (MP) (Felsenstein, 1993) y un algoritmo para estimaciones de la relación de parentesco entre moléculas a través de máxima verosimilitud (ML) (Strimmer y col., 1996). Se asume que si las topologías de los árboles obtenidos usando los diferentes métodos son concordantes, la hipótesis filogenética resultante es considerada robusta (Peña, 2011). En las figuras 31A, B y C se presentan respectivamente los resultados obtenidos. En dichas reconstrucciones se observó que el *locus* más cercano a BnARC1 es At1g29340 (AtPUB17, PM: 79,834 kDa) cuya expresión y función han sido completamente caracterizadas (Yang y col., 2006). Siguiendo el dendrograma basado en ancestros comunes, en segundo lugar de proximidad se encontró, utilizando tanto el análisis filogenético mediante matriz de distancias NJ como los algoritmos de reconstrucción MP y ML, At5g01830 (AtPUB16, PM: 73,600 kDa). Analizando los árboles filogenéticos, además de AtPUB17 y AtPUB16, los polipéptidos putativos ubicados en tercer lugar en cuanto a su proximidad a BnARC1 (At1g08315 y At5g15680), codificarían ambos para proteínas ARM no PUB dado que en su estructura secundaria no se predicen regiones U-box. Continuando el análisis, el siguiente candidato en los tres árboles corresponde a At1g60190 (AtPUB19, PM: 76,014 kDa) el cual codificaría para otra proteína AtPUB-ARM.

Finalmente, siguiendo el análisis filogenético, las otras proteínas putativas próximas a BnARC1 son: At1g71020 (AtPUB10) y At1g23030 (AtPUB11). Dichos polipéptidos también resultaron coincidentes en cuanto a su posición filogenética, en las tres reconstrucciones realizadas. Hasta aquí, todas las secuencias analizadas poseen un porcentaje de identidad superior al 30%, el cual es el umbral mínimo requerido para realizar los posteriores estudios de homología funcional (Pearson, 2013).

A continuación se describen las figuras correspondientes a los árboles filogenéticos con sus respectivos algoritmos de reconstrucción (Páginas 93-95):

Figura 31: Árboles filogenéticos obtenidos luego del alineamiento de los 113 *loci* correspondientes a la súper familia de proteínas AtARMs con BnARC1. (A) Se utilizó el algoritmo de matriz de distancias *Neighbor joining* (NJ) y para la reconstrucción del árbol, el programa disponible en línea iTol ([<http://itol.embl.de/upload.cgi>]) (Letunic y Bork, 2007). En cada nodo se indican los valores de *bootstrap* (en rojo). La distancia evolutiva se muestra en la parte superior izquierda. (B) Árbol filogenético obtenido por el método de máxima parsimonia (MP). (C) Árbol filogenético utilizando el método de estimación de filogenia a través de máxima verosimilitud (ML). Para (B) y (C) se utilizó el programa disponible en línea, en el sitio web www.mobyle.pasteur.fr/

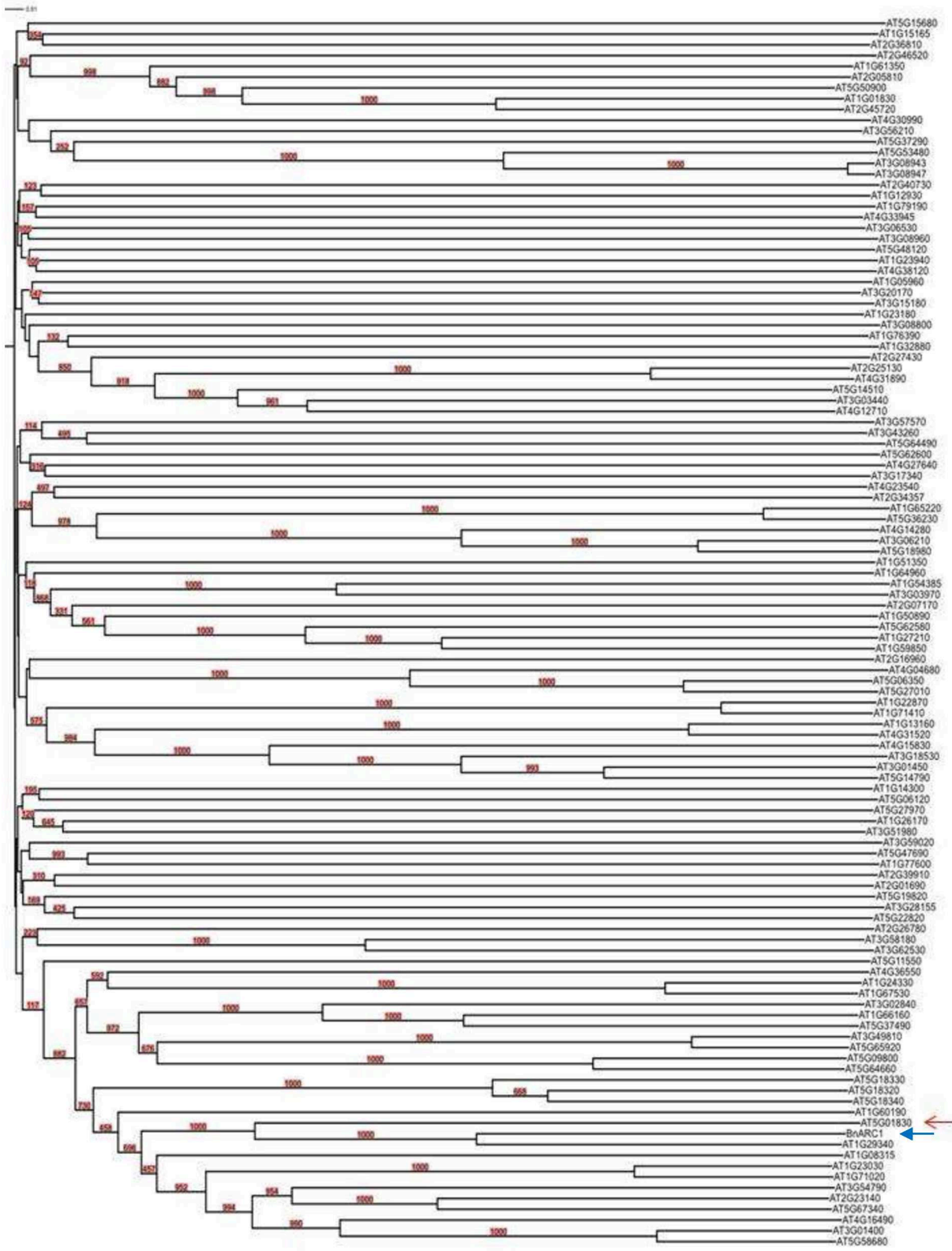


Figura 31 (A)

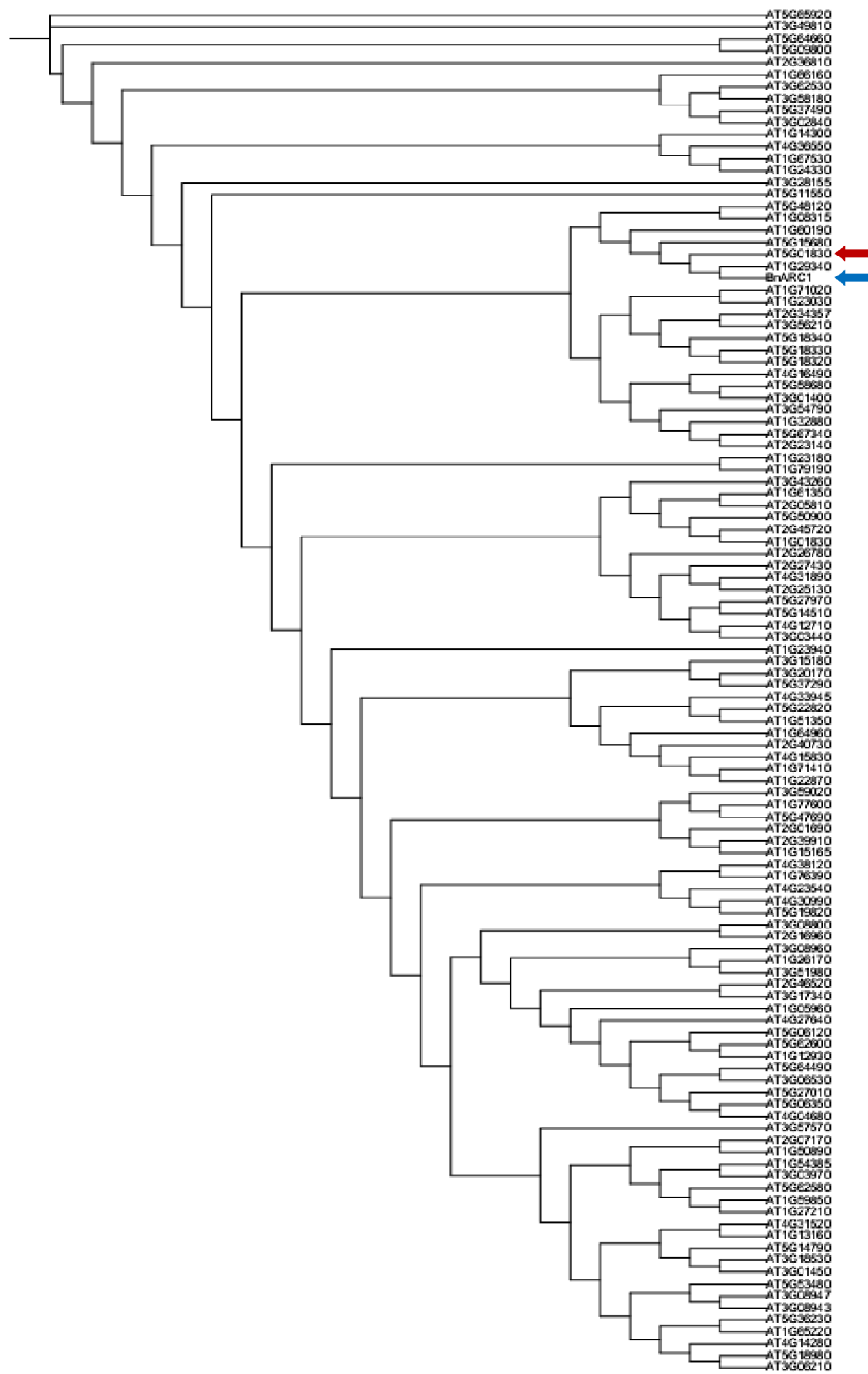


Figura 31 (B)

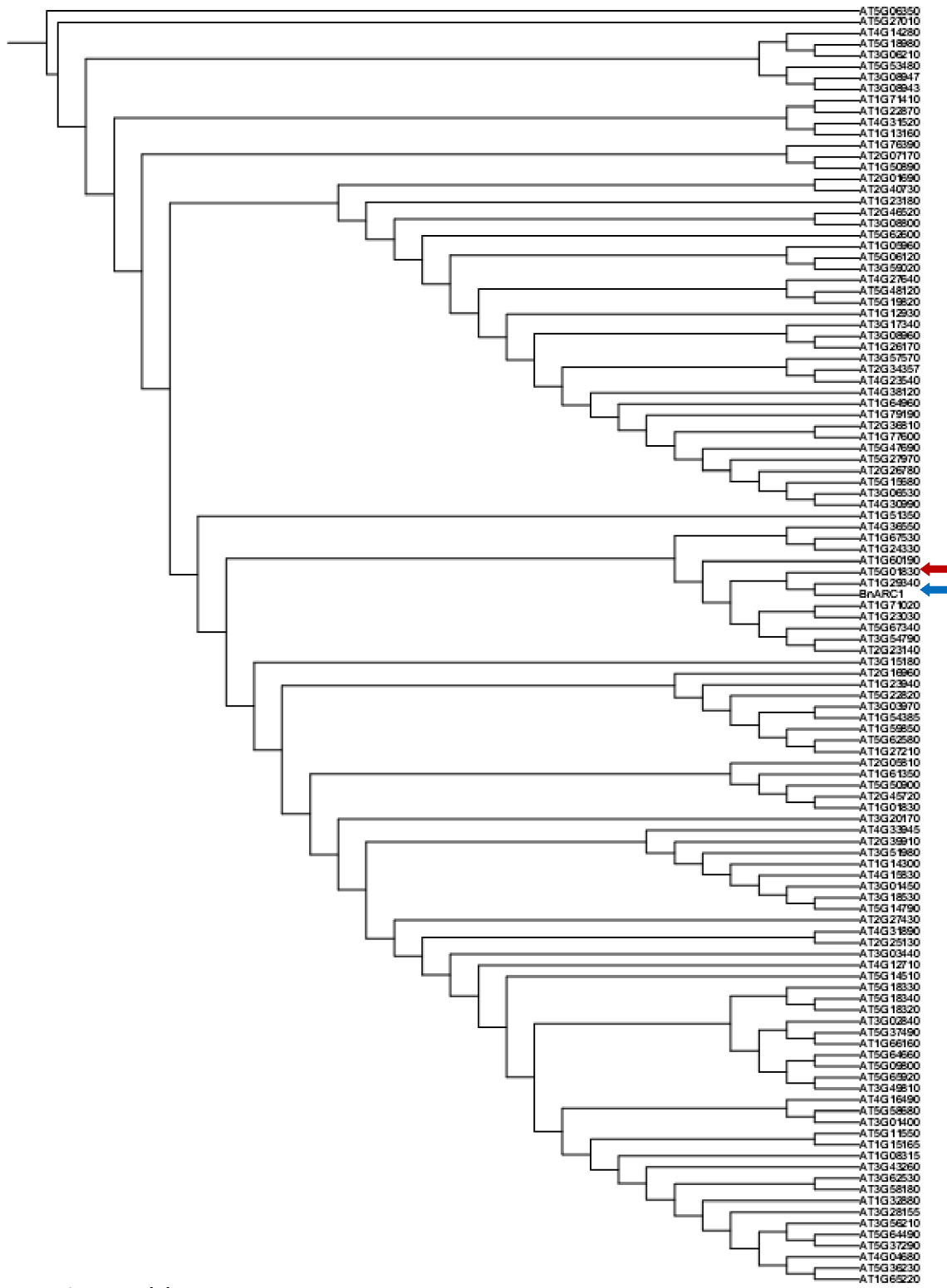


Figura 31 (C)

En resumen, de los estudios bioinformáticos surgió que los genes candidatos para ser estudiados serían, en orden de proximidad filogenética a BnARC1, aquellos que codifican para las proteínas: AtPUB17; AtPUB16; AtPUB19; AtPUB11 y AtPUB10.

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS Y TERCIARIAS DE PROTEÍNAS ATARMS

Teniendo en cuenta los resultados observados en los árboles filogenéticos en los que las secuencias de aminoácidos de las mencionadas moléculas se encuentran próximas a BnARC1, se realizó el análisis bioinformático comparativo de las estructuras secundarias y terciarias de las mismas. En la figura 32 se presenta un cuadro comparativo de las estructuras secundarias para proteínas ARM de algunos eucariotas. Se destacan en el recuadro verde los polipéptidos recientemente caracterizados en plantas.

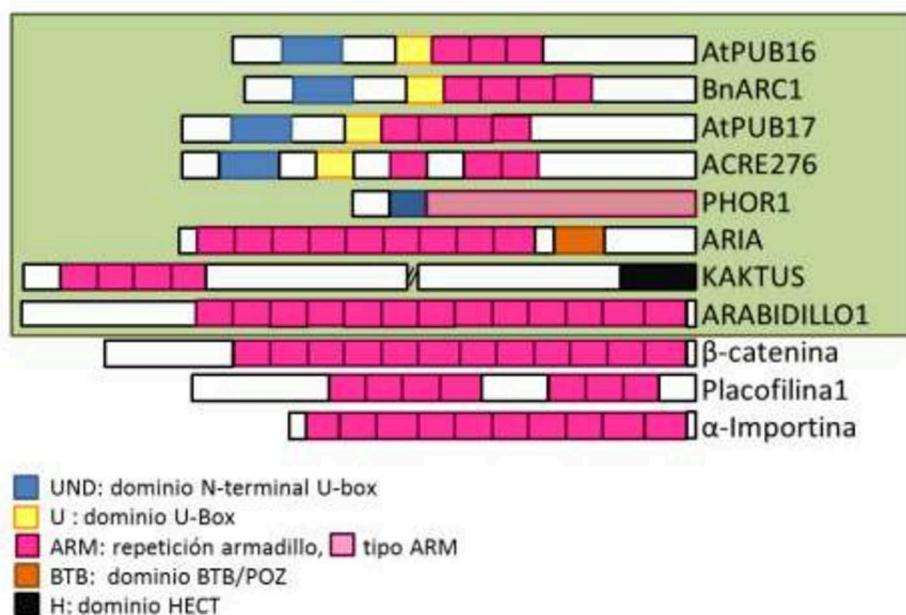


Figura 32: Comparación de estructuras secundarias presentes en familias de proteínas ARM de plantas (recuadro verde) y animales. Debajo de la figura, se indican con cajas de color los dominios de estructura secundaria presente en cada secuencia. Ver descripción en el texto. apartado Discusión.

El alineamiento múltiple entre BnARC1, AtPUB17, AtPUB16, AtPUB19, AtPUB10 y AtPUB11 arroja como resultado un árbol filogenético que relaciona estrechamente a AtPUB16 con el nodo que conecta a BnARC1 con AtPUB17 (Figura 33A), en concordancia con lo observado en los árboles filogenéticos mostrados previamente en la figura 31. En esta figura se muestran además las estructuras 3D en las que se

pueden observar que los plegamientos espaciales de los extremos C-terminales de las ARM resultan similares en todos los casos (Figura 33B).

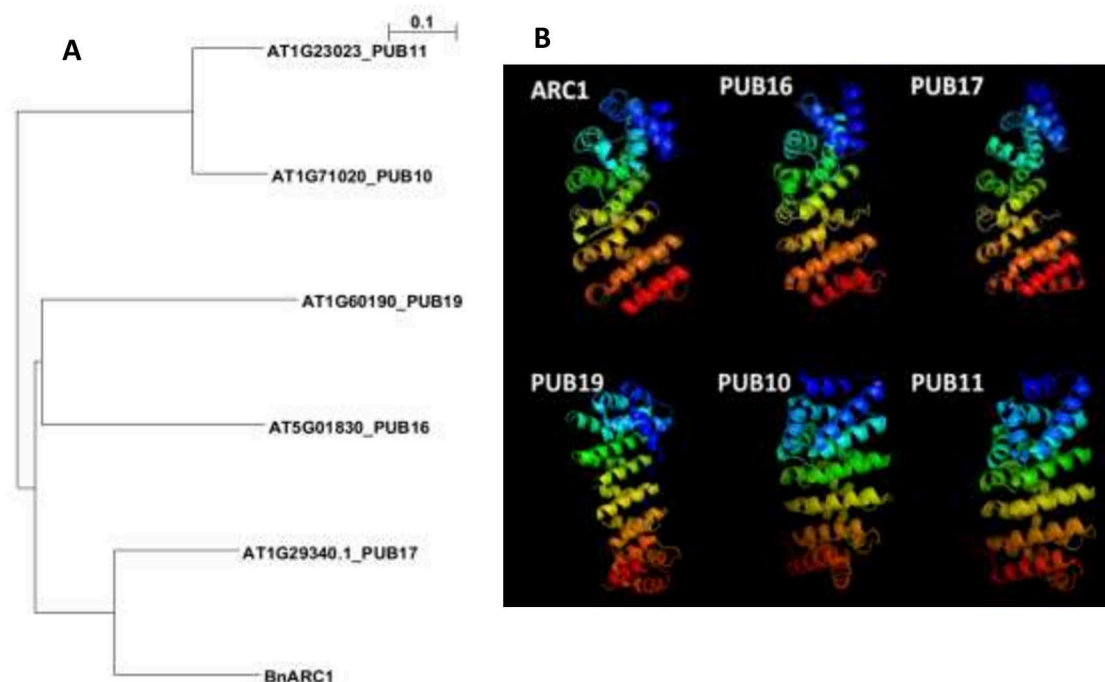


Figura 33: Predicciones de relaciones evolutivas y estructura espacial 3D de BnARC1, AtPUB17, AtPUB16, AtPUB19, AtPUB10 y AtPUB11. (A): se muestra el árbol filogenético resultante de la relación evolutiva entre ellos obtenido utilizando el algoritmo NJ y se indica la distancia evolutiva en la parte superior derecha. (B): utilizando la herramienta de visualización molecular PyMOL se observan similitudes en el patrón de plegamiento de cada una de las proteínas ARM. A continuación se indican las posiciones de los aminoácidos presentes en el modelado 3D de las ARM en el extremo C-terminal mostrado: BnARC1: 379-648, AtPUB16: 371-645, AtPUB17: 392-684, AtPUB19: 411-595, AtPUB10: 340-568 y AtPUB11:329-508.

Utilizando la base de datos UniProt junto con el programa de visualización de estructuras 3D, PyMol, se predijeron los dominios ARM para cada una de las secuencias estudiadas según la tabla 3.

De acuerdo a los análisis filogenéticos realizados, la secuencia AtARM más cercana a BnARC1 es AtPUB17 y tal como fue descrito en el apartado introductorio, esta molécula ha sido caracterizada funcionalmente como una ligasa de ubiquitina E3 (Yang y col., 2006). A continuación, la molécula cuya secuencia está filogenéticamente relacionada es AtPUB16, la cual hasta el presente trabajo de tesis, no había sido descrita en la literatura (Acosta y col., 2012). Como puede observarse en la figura 32, AtPUB16 posee tres secuencias ARMs, mientras que BnARC1 exhibe cuatro y en ambos casos, un dominio U-box y uno N-terminal según los predictores de dominios de las bases de datos utilizadas (ver apartado Materiales y Métodos). Del alineamiento

múltiple que compara las secuencias de aminoácidos correspondientes a BnARC1 y AtPUB16 resulta que ambas moléculas poseen una similitud del 51% y una identidad del 34% (Figura 34). Esto corrobora la similitud observada a nivel de estructuras secundarias presentando las ARMs en *tándem* y el dominio U-box, tal como se describió previamente.

Secuencia	Número de ARMs	Posición: rango de aminoácidos
BnARC1	4	ARM 1: 403 – 444 ARM 2: 445 – 487 ARM 3: 489 – 529 ARM 4: 530 – 568
AtPUB17	4	ARM 1: 438 – 477 ARM 2: 479 – 520 ARM 3: 523 – 562 ARM 4: 564 - 601
AtPUB16	3	ARM 1: 399 – 438 ARM 2: 441 – 481 ARM 3: 484 - 523
AtPUB19	5	ARM 1: 406 – 445 ARM 2: 448 – 489 ARM 3: 491 – 533 ARM 4: 536 - 577 ARM 5: 579 - 620
AtPUB10	5	ARM 1: 373 – 413 ARM 2: 415 – 454 ARM 3: 456 – 495 ARM 4: 497 - 537 ARM 5: 539 - 578
AtPUB11	5	ARM 1: 363 – 402 ARM 2: 404 – 443 ARM 3: 445 – 484 ARM 4: 486 - 526 ARM 5: 528 - 567

Tabla 3: Número y posición de ARM en la secuencia de residuos de aminoácidos de BnARC1, AtPUB17, AtPUB16, AtPUB19, AtPUB10 y AtPUB11.



Figura 34: Alineamiento de secuencias de proteínas de BnARC1 con AtPUB16. Se indican con "*" la identidad (34%) y con ":" y "." la similitud (51%). Los colores de cada residuo de aminoácido fueron asignados de acuerdo al algoritmo ClustalW según las propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido (aa): rojo: AVFPMILW (aa pequeños e hidrofóbicos, incluyendo aromático Y); azul: DE (aa ácidos); magenta: RK (aa básicos); verde: STYHCNGQ (aa con grupos hidroxilos, amina, sulfhidrilos, incluyendo G); gris: aa inusuales.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA Y GÉNICA DE ATARMS HOMÓLOGAS A BNARC1 PRESENTES DURANTE LA INTERACCIÓN POLEN-ESTIGMA

Una vez obtenidos los datos bioinformáticos, que permitieron acotar la búsqueda de posibles moléculas AtARMS implicadas en la interacción polen-estigma durante el proceso de fecundación en *A. thaliana*, y con el objetivo de intentar dilucidar lo/s posible/s rol/es de éstas en el mismo, se analizaron los perfiles de expresión proteica y

génica en condiciones normales de crecimiento y bajo diferentes condiciones de tratamiento hormonal y estrés salino, postulados como factores condicionantes de la expresión de las proteínas ARMs en diversos procesos de regulación celular.

Los extractos de proteínas totales a partir de los tejidos florales de *A. thaliana* (control y sometidos a tratamiento hormonal y estrés salino), fueron analizados a mediante la técnica de *western blotting* para intentar detectar y caracterizar a estas moléculas, en el sistema bajo estudio.

En dicha metodología se utilizó un anticuerpo dirigido contra las repeticiones armadillo de las proteínas postuladas como participantes en el mecanismo de polinización de *A. thaliana*.

Una vez logrado el reconocimiento por *immunoblot* del conjunto de proteínas AtARMs, se realizó un análisis de localización subcelular en estigmas polinizados de flores de plantas control y sometidas a tratamientos, mediante técnicas de inmunofluorescencia, usando el mismo anticuerpo.

Para correlacionar los datos obtenidos a nivel proteico, y dada la inexistencia de anticuerpos específicos dirigidos contra las distintas AtARMs postuladas, se estudiaron y cuantificaron los perfiles de expresión génica de las AtARMs objeto de estudio mediante retrotranscripción seguida de PCR (RT-*sq*PCR) semicuantitativa en cada una de las condiciones evaluadas previamente. También se evaluaron por esta técnica, los niveles de expresión del posible receptor (ARK3) y la molécula postulada como blanco de las AtARMs (EXO70A1), tanto en condiciones normales de crecimiento como bajo los diferentes tratamientos analizados.

En cada caso particular se correlacionó la expresión de proteínas y ARNm de las AtARMs, con bioensayos funcionales de polinización mediante técnicas de microscopia de epifluorescencia y RT*sq*-PCR para Cal5S.

Finalmente y de manera particular, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (RT-*q*PCR), ensayo de polinización e inmunofluorescencia, para caracterizar la expresión génica y proteica de la molécula que emergió como la principal candidata a jugar un rol clave en el proceso en esta especie (AtPUB16), tanto en genotipos salvajes como mutantes, sometidos al tratamiento con GA.

SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS DE TRATAMIENTO HORMONAL Y ESTRÉS SALINO

Varios estudios han postulado que las proteínas ARMs se expresan en respuesta a diferentes condiciones de estrés ambiental (abióticos, temperatura, sequía, salinidad, etc.) (Banzai y col., 2002; Yee y col., 2009). Por tal motivo y con el objetivo de intentar dilucidar el rol de este grupo de proteínas en el sistema bajo estudio, se diseñó un ensayo sobre plantas de *A. thaliana* en floración (estadio 13: antesis - autopolinización). En el mismo se evaluaron los efectos hormonales (GA y ABA) y salino (NaCl) sobre la expresión de genes para este conjunto de AtARMs.

En el tratamiento hormonal se analizaron los posibles efectos de dos fitohormonas antagonistas: ácido abscísico (ABA) el cual está involucrado en la dormancia de la semilla y la abscisión de las hojas y giberelina (GA) que estimula la floración promoviendo el desarrollo de los frutos. Ambas hormonas se evaluaron en dos concentraciones y los tratamientos se llevaron a cabo según el siguiente protocolo: tratamiento hormonal con ABA 100 y 200 μM (2, 4, 8, 11 y 24 h en contacto directo; Figura 35) y con GA 100 μM y 1000 μM (triple rociado de plantas en floración cada dos días; Figura 36). El estrés salino se indujo usando soluciones de riego NaCl 50 mM y 100 mM durante 10 días consecutivos, desde el estadio de roseta de 8 hojas (Figura 37) restaurando posteriormente el riego con solución Hoagland N° 1 (Figura 35) (Banzai y col., 2002; Sunkar y col., 2003; Yan y col., 2006; Shavrukov, 2013).

Los ensayos realizados sobre flores de *A. thaliana* con 100 μM de ABA, a partir del tratamiento de 8 h mostraron incrementos significativos de la longitud promedio de los pistilos, respecto de los controles no tratados. Se observa claramente una tendencia de aumento de la longitud estilar, de aproximadamente un 23% a partir de dicho tratamiento. Por otro lado, las flores tratadas con ABA 200 μM mostraron una elongación aún mayor del estilo (33%) con respecto a las plantas control. Adicionalmente, estas mayores diferencias significativas, fueron detectadas más tempranamente, a partir de las 4 h de tratamiento, manteniéndose en valores semejantes a las 8, 11 y 24 h (Figura 35).

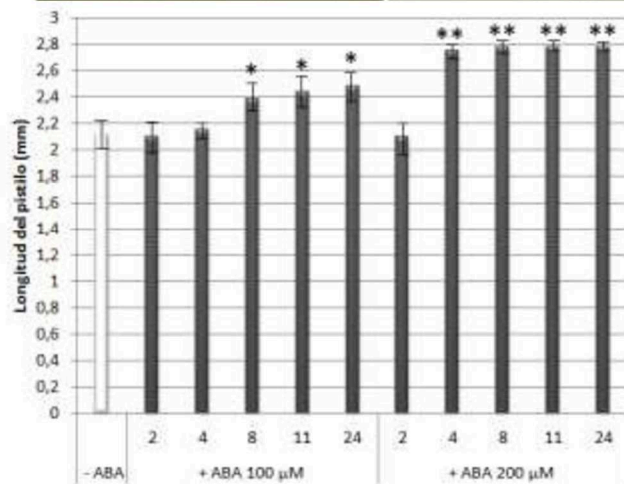
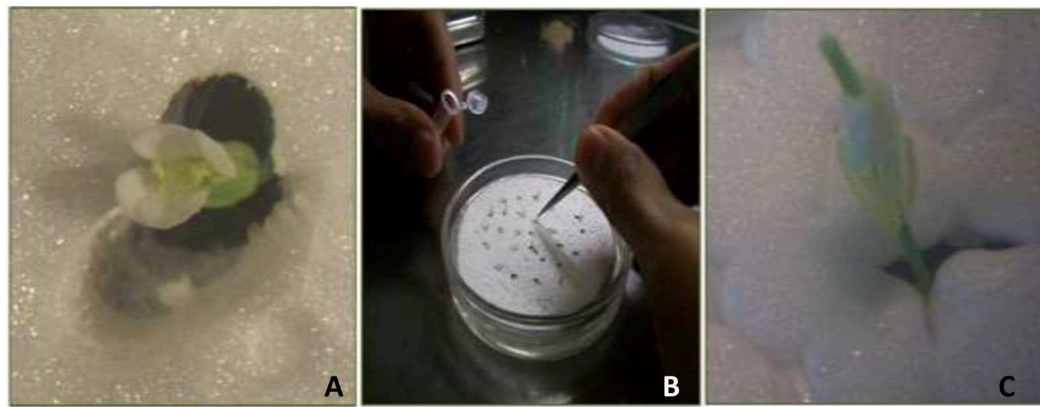


Figura 35. Ensayo con ABA: (A) Flor al comienzo del tratamiento (B) se colocaron 50 flores en contacto con las soluciones de ABA 100 y 200 μM . Las mediciones de la longitud del pistilo se realizaron luego de transcurridas 2, 4, 8, 11 y 24 h las flores fueron colectadas y se procedió como se indicó en Materiales y Métodos. En (C) se muestra una flor después de 4 h de tratamiento con ABA 200 μM . (D) Histogramas mostrando las longitudes promedio de los pistilos con ambas concentraciones y durante los distintos tiempos de muestreo de los tratamientos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas tratadas (*P < 0,05; **P < 0,01).

En las plantas tratadas con GA 100 μM , se observó un adelantamiento del inicio de floración de aproximadamente $6 \pm 1,5$ días y las plantas presentaron una talla de aproximadamente 11,4% menor que las control, sin tratar (Figura 36). Dicho efecto resulta aún más dramático, cuando se analizan las plantas sometidas a aspersion con solución de GA 1000 μM . En este caso, el adelantamiento de la floración alcanza valores promedio de $10 \pm 1,5$ días respecto de las plantas control; mientras que la merma en la altura promedio de las plantas alcanza valores del 29,5% respecto de las plantas control.

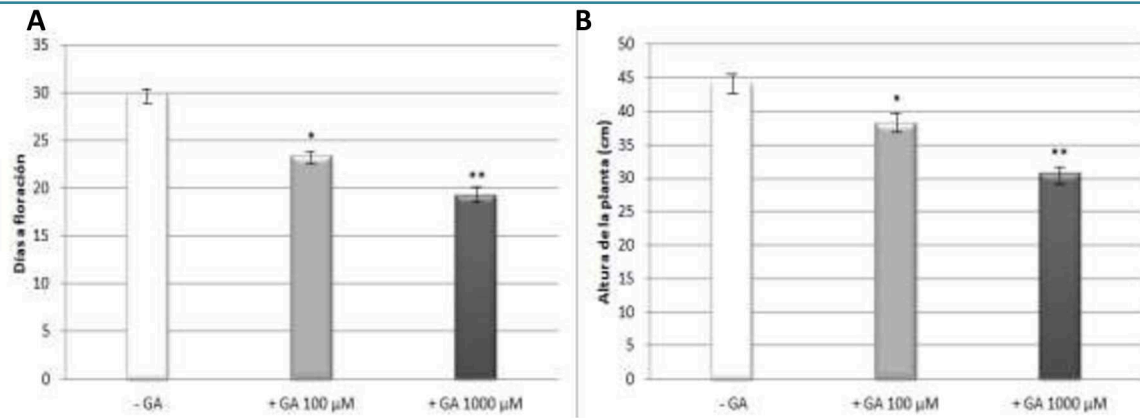
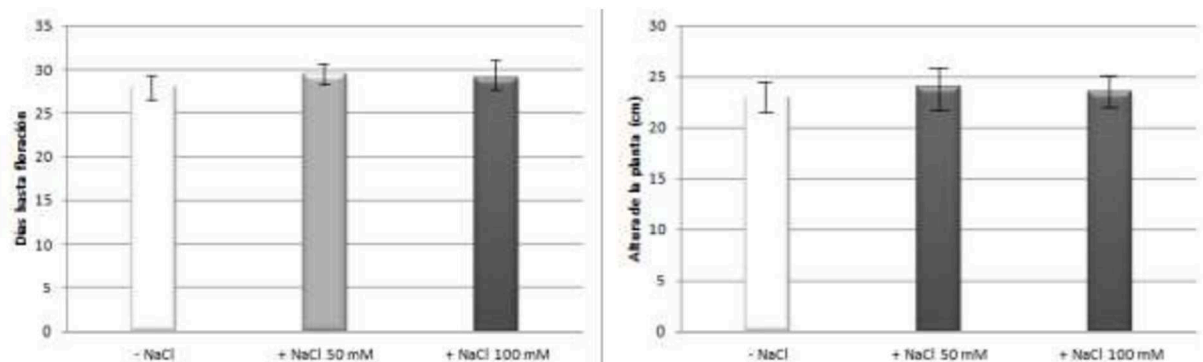


Figura 36: Ensayo con GA: En (A) y (B) se muestran los histogramas correspondientes a los días a floración y a las alturas finales alcanzadas por las plantas (78 días posgerminación) en función de las condiciones de tratamiento, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas tratadas y las plantas control *p <0,05, **P <0,01). (C) Fenotipos de plantas de *A. thaliana* (44 días posgerminación) en condiciones normales de crecimiento (-GA) (promedio de 24 cm ± 3 cm de alto) y (D) luego de la aspersión con GA con promedios de 12,5 cm ±3 cm de alto (1000µM).

Finalmente, en relación a las plantas sometidas a estrés salino con NaCl durante diez días consecutivos, éstas no exhibieron cambios fenotípicos significativos con respecto a las plantas control en cuanto a los días a floración y a la altura final alcanzada por las plantas para ambos tratamientos (50 y 100 mM de NaCl) (Figura 37).



Figura 37: Ensayo con NaCl: las plantas en estadio roseta de 8 hojas (extremo superior izquierdo) fueron regadas durante diez días consecutivos con NaCl 50 mM y 100 mM, retomando luego el riego con solución fertilizante de Hoagland hasta floración. No se registraron diferencias estadísticas comparadas con el control (-NaCl) para los parámetros cuantificados, bajo ambos tratamientos salinos.



SDS-PAGE E INMUNODETECCIÓN DE ATARMS

El *immunoblotting* (*western blotting*) es un ensayo rápido y sensible para la detección y caracterización de proteínas. Éste se basa en la especificidad inherente del reconocimiento de los antígenos por los anticuerpos. Esta técnica involucra la solubilización y separación electroforética de proteínas, glicoproteínas o lipopolisacáridos, seguida de la transferencia cuantitativa e irreversible ligada a nitrocelulosa, PVDF o *nylon*. La técnica de *immunoblotting* ha sido útil en la identificación de antígenos, tanto usando anticuerpos policlonales como monoclonales con alta sensibilidad (hasta 1 ng de antígeno).

En una primera aproximación, para la caracterización de las posibles proteínas AtARMS implicadas en el proceso de polinización, se llevaron a cabo extracciones de proteínas totales de flores de *A. thaliana* en estadio 13 (Smyth y col., 1990). Dicha extracción se realizó tanto en plantas control, como de cada una de las condiciones ensayadas: ABA 100 μM y 200 μM por 2, 4, 8, 11 y 24 h; GA 100 y 1000 μM y NaCl 50 y 100 mM. Para ello, se pusieron a punto las técnicas para el análisis molecular de proteínas (SDS-PAGE y *western blot*). Se realizaron SDS-PAGEs al 10% y se compararon los patrones de expresión de proteínas de diferentes concentraciones de extractos totales de tejido floral (10, 15 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Como resultado de estos ensayos preliminares, se detectaron clústeres de proteínas en el rango de 25-200 kDa en los extractos totales evaluados (Figura 38).

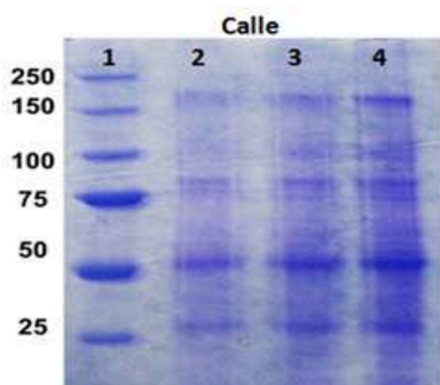


Figura 38: SDS-PAGE. Gel mostrando las diferentes concentraciones de extractos florales. Calle 1: patrón de peso molecular, calles 2, 3 y 4: concentraciones 10, 15 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas totales de *A. thaliana* de tipo salvaje respectivamente.

Para la realización de la inmunodetección con el anticuerpo de reconocimiento de las proteínas ARM, se seleccionó una concentración de proteínas totales de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para sembrar en cada calle del SDS-PAGE. El objetivo de estos experimentos consistió en

estudiar, cuáles son las proteínas AtARMs que se estarían expresando en dichas condiciones en el tejido floral para intentar determinar la existencia de alguna correlación con aquellas filogenéticamente relacionadas con BnARC1.

Luego de realizar los SDS-PAGE al 10%, se compararon los patrones de expresión de proteínas totales de flores provenientes de plantas control y bajo los diferentes tipos de tratamiento como se ejemplifica en las figuras 39A y 39B.

Para llevar a cabo la inmunodetección, fue necesario realizar una selección previa del anticuerpo primario a utilizar. Teniendo en cuenta los datos bioinformáticos sobre secuencias de proteínas ARM, se realizó una búsqueda entre los anticuerpos primarios comercialmente disponibles, el que exhibiese una mayor especificidad para los epítopos de las mencionadas proteínas putativas en dichas plantas (ver Figura 39 (C) y pie de figura, en la que se describe la metodología utilizada). El anticuerpo que cumplió más ajustadamente con estas condiciones fue el anticuerpo primario anti-ARMC8 (*Santa Cruz Biotechnology*). Utilizando este anticuerpo, se pudieron identificar intensidades de bandas diferentes para extractos totales de flores de plantas con y sin tratamiento. De acuerdo a los resultados obtenidos en las variables fenotípicas para cada tratamiento, se seleccionaron aquellos tratamientos que exhibieron las mayores diferencias respecto del control: para ABA los tratamientos de 8 y 4 h para 100 μM y 200 μM respectivamente; GA 100 μM y 1000 μM ; y dado que no se observaron diferencias fenotípicas para el estrés salino con NaCl (altura de plantas y días a floración sin diferencias significativas con el control) se eligió la mayor, de las dos concentraciones de NaCl utilizadas (100 mM).

Como puede observarse en la figura 39, el ensayo permitió la detección de un clúster de proteínas AtARM, en el rango de 34-80 kDa (Figura 39 (D)) en el cual se detectaron tres grupos de proteínas con posiciones de banda correspondientes a 73-80 kDa (grupo A), 58-66 kDa (grupo B) y 34-41 kDa (grupo C).

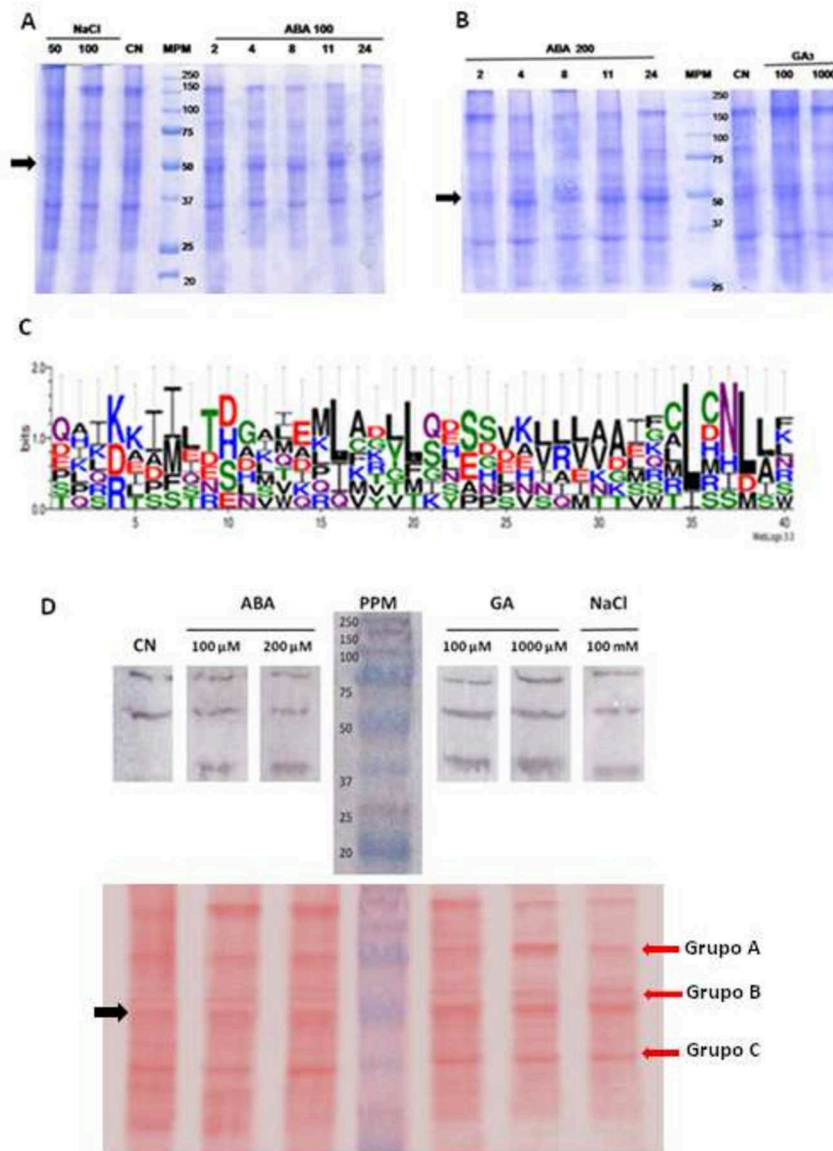


Figura 39: Caracterización de la expresión proteica de AtARMs. (A) y (B) SDS PAGE: Patrones de proteínas totales de tejido floral en condiciones normales (CN) y bajo estrés salino: NaCl 50 mM y 100 mM; ABA 100 μM y 200 μM por 2, 4, 8, 11 y 24 h; GA 100 μM y 1000 μM; MPM: marcador de peso molecular. Flecha negra: banda correspondiente a la subunidad mayor de la RubisCO. (C) Logo de secuencia obtenido con WebLogo 3.0 (Crooks y col., 2004) para repeticiones armadillo de ARM8: se realizó el correspondiente alineamiento múltiple para los residuos de aminoácidos correspondientes a las 7 repeticiones armadillo (311 al 610) que reconoce el anticuerpo anti-ARM8. Cada una de las repeticiones armadillo cuenta con 40 posibles posiciones para residuos de aminoácidos. Puede observarse una amplia variabilidad en cada posición, dado que se asigna más de un posible residuo por posición con frecuencias similares (eje x: posición del aminoácido en cada repetición armadillo, eje y: frecuencia de cada residuo de aminoácido en una determinada posición). (D) *Western blot* utilizando anti-ARM8, para la detección de proteínas ARM presentes en tejidos florales tratados con GA 100 μM y 1000 μM, ABA 100 mM y 200 mM por 8 h y 4 h respectivamente y NaCl 100 mM) y sin tratar (condiciones normales de crecimiento CN). En todos los casos tratados se presentan tres bandas correspondientes a tres clústeres de proteínas AtARM de pesos moleculares 73-80 kDa, 58-66 kDa y 34-41 kDa. En CN, se observan solo dos clústeres de proteínas inmunopositivas al anticuerpo, (E) Control de sembrado de proteínas: membrana teñida con Rojo Ponceau para cada una de las calles mostradas en el *western blot*. Flecha negra: banda correspondiente a la subunidad mayor de RubisCO.

Para evaluar los posibles incrementos de la síntesis de proteínas ARMs putativas, se realizó la cuantificación, utilizando el programa *ImageJ*, de las intensidades de las bandas presentes en los geles en relación con la intensidad de las bandas correspondientes a la subunidad mayor de la RubisCO tanto para las plantas control como para las sometidas a los distintos tratamientos. Se valoraron y promediaron cada una de las bandas correspondientes a los 3 grupos presentes en las membranas. En dichos estudios se verifica que todos los tratamientos realizados provocan aumentos en la expresión proteica, los que resultan particularmente remarcables con los agregados exógenos de ABA 200 μM y GA 1000 μM en los que se observan aumentos estadísticamente significativos de proteínas ARM cuando se las compara con las condiciones normales de crecimiento, particularmente en las bandas clasificadas en el grupo A (Figura 40 (A)).

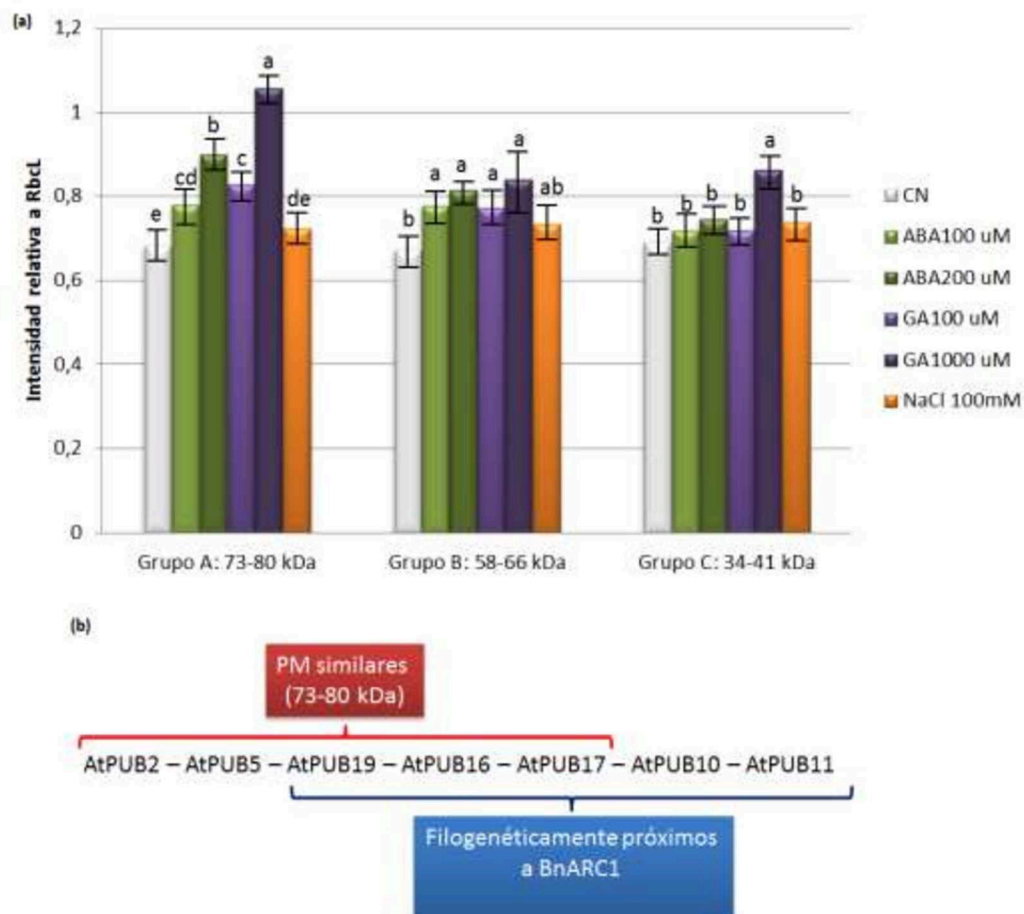


Figura 40: (A) Expresión de proteínas ARMs. Cuantificación de las intensidades de las bandas presentes en los geles en relación a la intensidad de las bandas correspondientes a la subunidad mayor de RubisCO utilizando el programa *ImageJ*. Las letras distintas indican diferencias significativas utilizando el test de Tukey ($p \leq 0,05$). **(B)** Relaciones de las AtPUB-ARMs tanto las basadas en los pesos moleculares como en las relaciones filogenéticas.

En base a los estudios bioinformáticos previamente realizados, se encontró que dentro de los rangos de PM determinados se hallaron varios polipéptidos AtARMs (ANEXO IV). El grupo A podría reunir a: AT1G29340 (AtPUB17), AT5G01830 (AtPUB16), AT1G60190 (AtPUB19), AT5G67340 (AtPUB2), AT4G31520 (FL17 no-PUB) y AT4G36550 (AtPUB5). El aumento en la expresión proteica se observa para todos los casos, particularmente para el agregado exógeno de ABA 200 μ M y GA 1000 μ M. Para este conjunto de proteínas con PM entre 73 kDa y 80 kDa se observa un aumento significativo de su expresión cuando se somete el tejido floral al tratamiento con GA (Figura 40 (B)).

ENSAYOS DE POLINIZACIÓN UTILIZANDO MEF BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE TRATAMIENTO HORMONAL Y ESTRÉS SALINO

Con el objetivo de correlacionar los resultados de expresión proteica con el mecanismo de polinización, se propuso evaluar cuantitativamente el número de granos de polen (adheridos y que exhiben tubos polínicos penetrantes) en cada estigma. En los resultados previos se observó que la expresión de algunas proteínas AtARMs se modifica como consecuencia de la aplicación de un tratamiento hormonal o de un estrés salino, por lo que se planteó estudiar si estos resultados están correlacionados con los mecanismos de adhesión polen-estigma. Para poder obtener evidencias cuantitativas sobre la alteración o no del número de granos de polen que germinan bajo las distintas condiciones experimentales, se llevó a cabo el ensayo de polinización utilizando MEF. Tomando como base los resultados obtenidos mediante la técnica de *western blot* para cada tratamiento, se seleccionaron las condiciones en las que se verificaron las mayores diferencias respecto del control: para ABA la concentración de 200 μ M por 8 h, para GA 1000 μ M y para NaCl 100 mM. El análisis cuantitativo se llevó a cabo utilizando flores autopolinizadas (estadio 13), las cuales fueron clasificadas en cuatro clases de acuerdo al número de granos de polen (adheridos y tubos polínicos penetrantes en el estigma): 0-20, 21-40, 41-60 y >60 granos de polen. El análisis de varianza se realizó utilizando test de diferencias de medias de Tukey. Como puede observarse en la figura 41(A), (D) y (E), este bioensayo permitió verificar un incremento extremadamente significativo ($p < 0,001$) del número de granos de polen germinados sobre los estigmas de las flores de plantas tratadas con GA, comparadas con las plantas control. Por el contrario, el tratamiento con ABA, mostró un efecto opuesto, es decir

las plantas sometidas a este estímulo hormonal exhibieron una disminución extremadamente significativa del número de granos de polen germinados sobre las papilas estigmáticas respecto a las plantas control (Figura 41D).

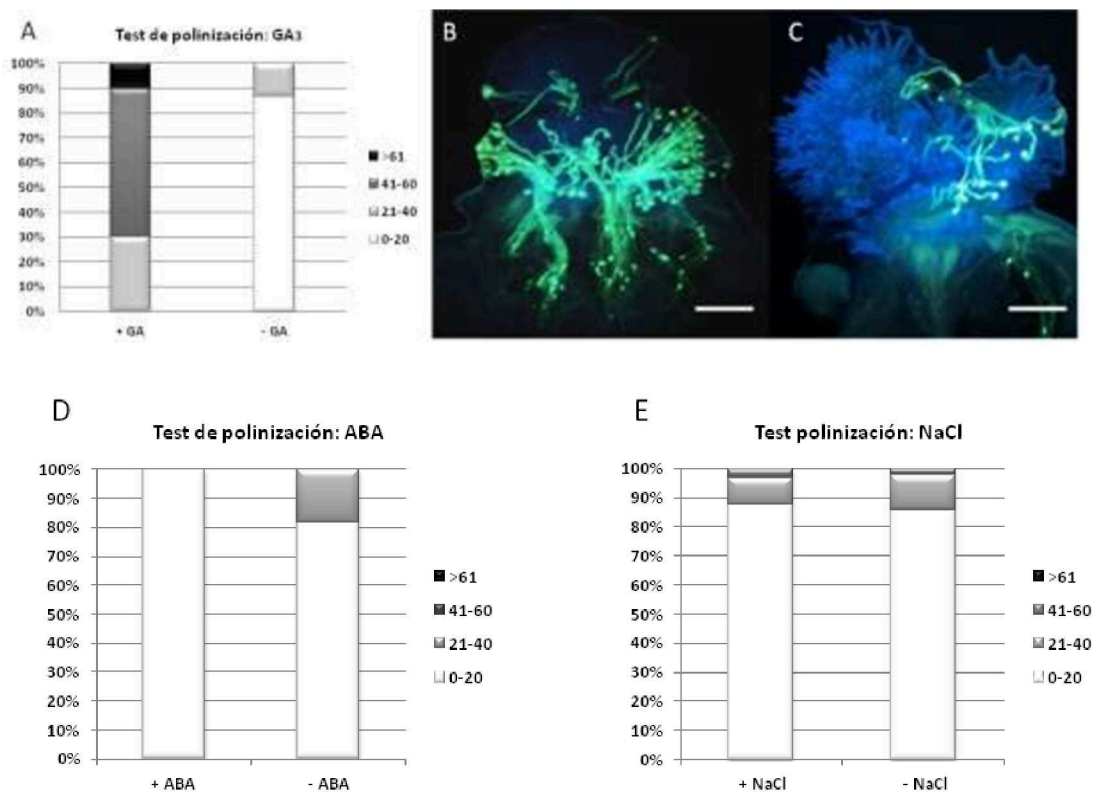


Figura 41: Ensayo de polinización. (A) La aplicación de giberelinas (+GA) en las plantas incrementa de modo extremadamente significativo ($p < 0.001$) el número de granos de polen sobre los pistilos comparadas con las plantas rociadas sin la hormona (-GA). Un notable incremento en el número de granos de polen germinados sobre el estigma bajo condiciones de estrés hormonal puede verse claramente en las imágenes que corresponden a la tinción con azul de anilina de los granos de polen sobre el estigma +GA (B) y -GA (C). Barra = 50 μm . (D) La aplicación de ABA (+ABA) en las plantas disminuye extremadamente significativo ($p < 0,001$) el número de granos de polen sobre los pistilos comparadas con las plantas sin la hormona (-ABA). (E) El tratamiento con NaCl (+NaCl) de las plantas no modifica significativamente ($p < 0,05$) el número de granos de polen sobre los pistilos comparadas con las plantas sin estrés salino (-NaCl). En todos los gráficos el eje de las “y” corresponde al porcentaje (%) de estigmas que se encuentran en alguno de los cuatro rangos evaluados.

Finalmente, el estrés salino no produjo modificaciones significativas del número de granos de polen sobre las papilas del estigma dado que el número de granos de polen adheridos y tubos polínicos penetrantes fue similar en CN y posteriormente al estrés salino con NaCl. A modo de ejemplo, en las figuras 41(B) y (C), se pueden observar las micrografías de MEF mostrando un estigma tratado con GA y un estigma sin tratar, correspondientes al ensayo de polinización.

EXPRESIÓN GÉNICA DE LA CALOSA SINTASA *CAL5S* RESPONSABLE DE LA SÍNTESIS DE CALOSA EN LOS TEJIDOS FLORALES DE *A. THALIANA*

Los bioensayos de polinización presentados previamente (Figuras 41A, 41B y 41C), permitieron determinar que el tratamiento con GA provoca un incremento extremadamente significativo ($p < 0,001$) en el número de granos de polen adheridos a la superficie del estigma; mientras que el tratamiento con ABA produce el efecto inverso, detectándose depósitos de calosa en el interior de las papilas, lo que constituye una respuesta típica que asemeja los de activación de los mecanismos SI (Figura 42).

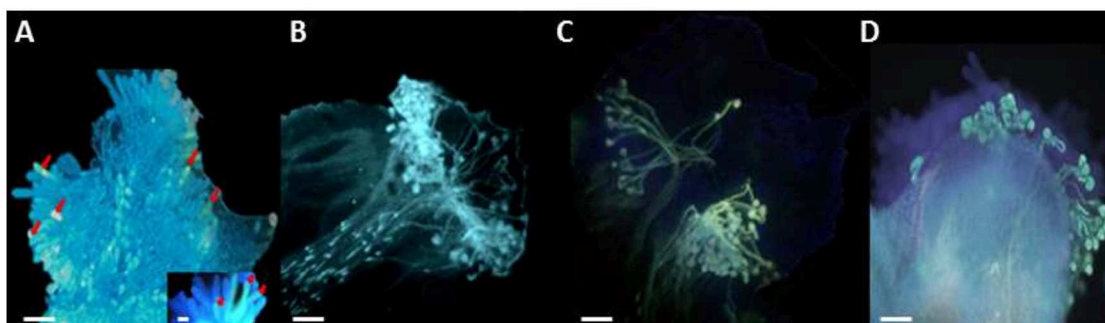


Figura 42: Ensayo de polinización en estigmas bajo estrés hormonal y salino en *A. thaliana*. Estigma en presencia de (A) ABA, (B) GA, (C) NaCl y (D) CN. Las flechas rojas en (A) indican los depósitos de calosa (β -1,3 glucano) en el interior de las papilas estigmáticas, característica típica de los mecanismos SI. Barra = 20 μ m.

Para corroborar los estudios morfológicos, se realizó el estudio de la expresión del gen que codifica para la calosa sintasa *Cal5S* en todas las condiciones experimentales objeto de estudio: tratamiento hormonal con giberelinas 1000 μ M (GA) y ácido abscísico 200 μ M (ABA) por 4 h; estrés salino con cloruro de sodio 100 mM (NaCl).

Para ello, se llevó a cabo la extracción, cuantificación y chequeo de integridad del ARN. Se realizó la retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR), para la obtención de ADNc y posterior amplificación por PCR (Sambrook y col., 2001; Weigel, 2002) utilizando el protocolo provisto por el proveedor. Para la amplificación, se diseñaron oligonucleótidos específicos (ver sección Materiales y Métodos) y se realizaron los controles pertinentes para la RT-PCR, según indicaciones del fabricante.

En concordancia con los estudios morfológicos, los resultados de la cuantificación muestran que los niveles de expresión del gen *Cal5S* se incrementan significativamente en presencia de ABA ($p \leq 0,05$), mientras que no se obtuvieron diferencias significativas

en condiciones normales de crecimiento ni en las plantas tratadas con GA o NaCl (Figura 43).

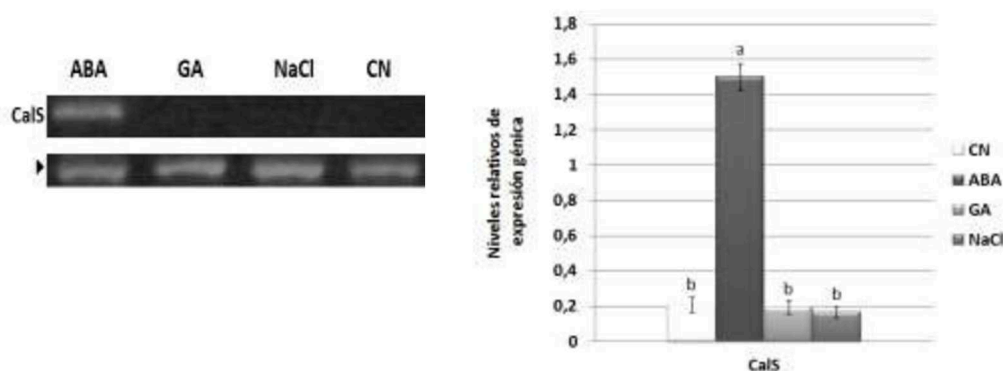


Figura 43: (A) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio mostrando la expresión del gen *Cal5S* (At4g03550) de 355 pb frente a: ABA, GA, NaCl y CN (condiciones normales de crecimiento). Cabeza de flecha: control de expresión interna (β -tubulina: At5g62700 de 151pb). (B) Niveles de expresión génica de *Cal5S* bajo las diferentes condiciones de estrés ensayadas. Letras distintas indican diferencias significativas utilizando el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ATPUB-ARMS BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES Y ESTRÉS SALINO

Los resultados obtenidos a nivel bioinformático y de *immunoblot* permitieron concluir que:

- ⊕ luego de la proteína AtPUB17, AtPUB16 es la que se encuentra filogenéticamente más próxima a BnARC1, seguida de AtPUB19; AtPUB10 y AtPUB11;
- ⊕ AtPUB16 posee similitud a nivel de estructura secundaria y terciaria con otras proteínas PUB-ARMS;
- ⊕ AtPUB17, AtPUB19, AtPUB2 y AtPUB5 se encuentran en el rango de pesos moleculares al que pertenece AtPUB16.

En función de estos resultados, se llevaron adelante los estudios de la expresión génica por RT-*sq*PCR para dichas proteínas AtPUB-ARMS bajo los diferentes tratamientos hormonales y de estrés salino previamente ensayados. Para ello, se llevó a cabo la extracción, la cuantificación y chequeo de integridad del ARN. Para la amplificación, se diseñaron oligonucleótidos específicos teniendo en cuenta que, en aquellos casos en los que los genes poseen intrones, estos fueron diseñados comprendiendo segmentos exón-exón (ver Materiales y Métodos). Cada par de cebadores fue utilizado para la

amplificación del ADNc obtenido de los diferentes tratamientos seleccionados previamente: hormonales con GA (1000 μ M) y ABA 200 μ M por 4 h; estrés salino con NaCl 100 mM. En los casos de genes carentes de intrones, los ARNs fueron tratados con ADNasa previo a la RT-PCR, para evitar la amplificación a partir de ADN genómico (ADNg) contaminante. Asimismo, se realizaron los controles pertinentes para la RT-PCR, según indicaciones del fabricante.

EXPRESIÓN GÉNICA DE ATPUB-ARMS (RT-sqPCR)

Para discriminar el posible efecto diferencial de los tratamientos sobre la expresión de los genes bajo estudio, se cuantificaron tanto los niveles de expresión génica de las proteínas AtARMS evolutivamente relacionadas con BnARC1 (AtPUB17, AtPUB16, AtPUB19, AtPUB10 y AtPUB11) como las de peso molecular semejante (AtPUB2, AtPUB5 y FL17).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios de *western blot*, las moléculas más relacionadas filogenéticamente con BnARC1, son las que encuentran en el rango de pesos moleculares correspondientes al grupo A (73-80 kDa): AtPUB17: 79,8 kDa, AtPUB16: 73,6 kDa, AtPUB19: 76,0 kDa).

Adicionalmente, se verifica que a este último grupo también pertenecen AtPUB5 (79,9 kDa), AtPUB2 (78,1 kDa) y FL17 (79,1 kDa), las cuales pese a no exhibir cercanía filogenética, también fueron incluidas en los análisis de RT-sqPCR.

En figura 44 se resumen los resultados obtenidos. En los estudios cualitativos puede observarse que la expresión de *AtPUB17*, en comparación con la de las plantas control, no exhibe diferencias bajo ninguna de las tres condiciones ensayadas. La expresión de *AtPUB16*, es inducida fuertemente, en las flores de las plantas tratadas con GA; exhibe un débil incremento en los niveles de expresión en plantas tratadas con NaCl, pero resulta insensible al tratamiento con ABA respecto de los controles no tratados, en los que no se verifica señal. En cuanto al gen para *AtPUB19*, los ensayos permitieron determinar que ésta se expresa sin variaciones aparentes, en todas las condiciones ensayadas, aunque más levemente en las condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, se observa un aumento de la expresión génica de *AtPUB11* con GA y una leve disminución de *AtPUB10* frente al tratamiento hormonal provocado tanto por GA.

La expresión génica de *AtPUB5* se mostró inhibida en presencia de los tres tratamientos. En relación con la expresión génica de *AtPUB2*, las tres condiciones ensayadas (GA, ABA y NaCl) indujeron su expresión respecto del control en condiciones normales de crecimiento. Finalmente, para *FL17* se observó una leve inhibición por GA y niveles comparables al control normal en los tratados con ABA y los sometidos a estrés salino.

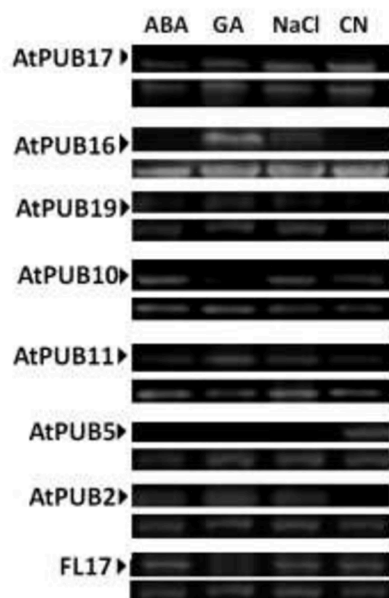


Figura 44: Expresión génica de AtPUB-ARMS. Expresión génica de *AtPUB17* (364 pb), *AtPUB16* (245pb), *AtPUB19* (202 pb), *AtPUB10* (261 pb) *AtPUB11* (460 pb), *AtPUB5* (429 pb), *AtPUB2* (287 pb) y *FL17* (209pb) se indica con una cabeza de flecha negra. Debajo de cada gen se indica el producto del gen control de expresión interna (β -tubulina).

A continuación, se realizó el estudio cuantitativo de los niveles de expresión génica (RT-*sq*PCR), tomando como referencia el gen de β -tubulina. Dicha cuantificación se realizó utilizando el programa *ImageJ* siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos (Di Stilio y col., 2010; Lee y col., 2011).

En la Figura 45, se presentan los histogramas correspondientes a las RT-*sq*PCR para todos los genes estudiados. En todos los casos se comparan la expresión génica en condiciones normales de crecimiento con los distintos tratamientos estudiados.

Los niveles de expresión para *AtPUB17* resultan semejantes en todas las condiciones analizadas. De su análisis resulta evidente que dicho gen es insensible a la aplicación de los tres tipos de tratamientos analizados en la presente tesis.

En relación con *AtPUB16*, el resultado más destacado se verifica en las plantas sometidas a la adición exógena de GA. Estas exhiben un dramático incremento de la expresión del ARNm, ostentando niveles incrementales de prácticamente 1,44 veces

respecto del CN; mientras que la respuesta es de sólo 0,23 veces respecto del mismo control en las plantas sometidas a estrés salino con NaCl. Este leve aumento en los niveles de expresión génica detectado con NaCl 100 mM, coincide con el efecto que este estrés causa sobre otros genes AtARMs que se expresan en condiciones de estrés salino (Bazai y col., 2002) y cuyo significado se discutirá más adelante. Resulta particularmente remarcable que la adición de ABA no modifica significativamente los niveles de expresión de este gen.

En relación a la expresión de *AtPUB19*, se observaron incrementos significativos por la adición de GA (0,72 veces respecto del control sin tratamiento). Este gen también es regulado positiva- y significativamente en las flores sometidas al tratamiento con ABA (0,95 veces respecto del control sin tratamiento). Los niveles de expresión de este gen fueron también significativamente inducidos por el estrés generado por el tratamiento con NaCl (0,2 veces respecto del control).

En el caso de *AtPUB10*, se verifica que GA parece ejercer un efecto de regulación negativa con valores de inhibición del orden de 0,4 veces menos que los registrados en el control normal, mientras que ABA y NaCl no presentan variaciones significativas respecto del control en condiciones normales de crecimiento.

En cuanto a la expresión génica de *AtPUB11* se verifica que la acción de GA exhibe una muy débil regulación positiva de este gen (0,4 veces respecto del control normal) mientras que ABA y el estrés salino parecerían no tener efecto sobre su expresión génica respecto de los valores control.

La expresión para el gen *AtPUB5*, en los tres tratamientos a los que se sometieron las plantas, cayó a niveles prácticamente indetectables. Dicha disminución resultó significativamente diferente en relación al registrado en las flores de plantas crecidas en condiciones normales.

En el otro gen analizado, *AtPUB2*, los transcritos se incrementan significativamente (1,1 veces) en las plantas tratadas con GA. Esta molécula también es positivamente regulada por ABA y por NaCl 150 mM (0,59 y 0,81 veces respectivamente).

Finalmente, la expresión del gen para FL17 es positivamente regulada en presencia de ABA (0,7 veces respecto del control) e inhibida por GA y NaCl.

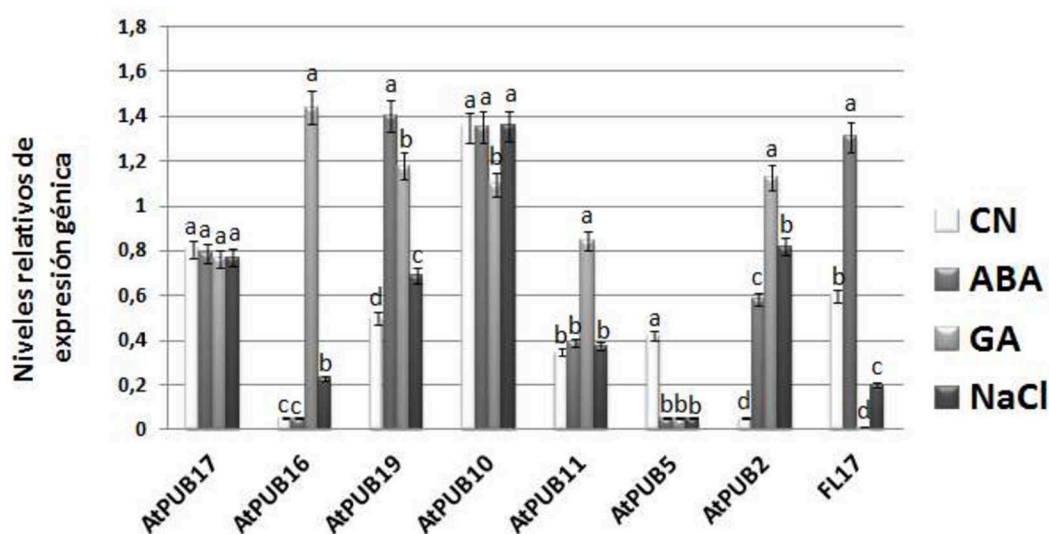


Figura 45: Niveles relativos de expresión génica de *AtPUB17*, *AtPUB16*, *AtPUB19*, *AtPUB10*, *AtPUB11*, *AtPUB5*, *AtPUB2* y *FL17* en plantas sometidas a distintos tratamientos (CN, ABA, GA, NaCl). Letras distintas indican diferencias significativas utilizando el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA INTERACTUAR CON ATARMS

A continuación y con el objetivo de intentar determinar potenciales activadores y moléculas blanco de las AtARMS en el sistema bajo estudio, se realizó, utilizando herramientas bioinformáticas similares a las descritas previamente, una búsqueda entre aquellos genes que exhibiesen similitud con el receptor SRK y con el *target* de BnARC1, EXO70 de *B. napus*.

Como se indicó en la introducción, SRK (*S*-*locus* *R*eceptor *K*inase) se encuentra anclado a membrana plasmática del estigma e interactúa con el ligando SCR (*S*-*locus* *C*ys-*R*ich), presente en el grano de polen (Nasrallah, 2000), mientras que la proteína EXO70A1 presente en las papilas estigmáticas, es clave para la aceptación del polen compatible, ya que la inhibición de su actividad a través de la ubiquitinación por BnARC1, provoca el bloqueo de la secreción en la papila, necesaria para la aceptación del grano de polen (Samuel y col., 2009).

En el primer caso se encontró que el receptor tirosina quinasa ARK3 de *A. thaliana* exhibe un 67% de identidad con SRK. Utilizando herramientas similares, se encontró que EXO70A1 de *A. thaliana*, posee un 95% de identidad con EXO70 (Figuras 46A y 46B).

Teniendo en cuenta los resultados de este análisis, fueron diseñados los oligonucleótidos específicos y establecidas las condiciones de trabajo, para llevar a cabo las RT-PCR y evaluar por RT-*sq*PCR las expresiones génicas de ambos genes en *A. thaliana*. En la figura 47A puede observarse que en relación con el gen de ARK3, aun cuando se expresa en todas las condiciones ensayadas (CN, ABA, GA y NaCl), no se verifican cambios, en relación con las plantas control (Figuras 47 y 48).

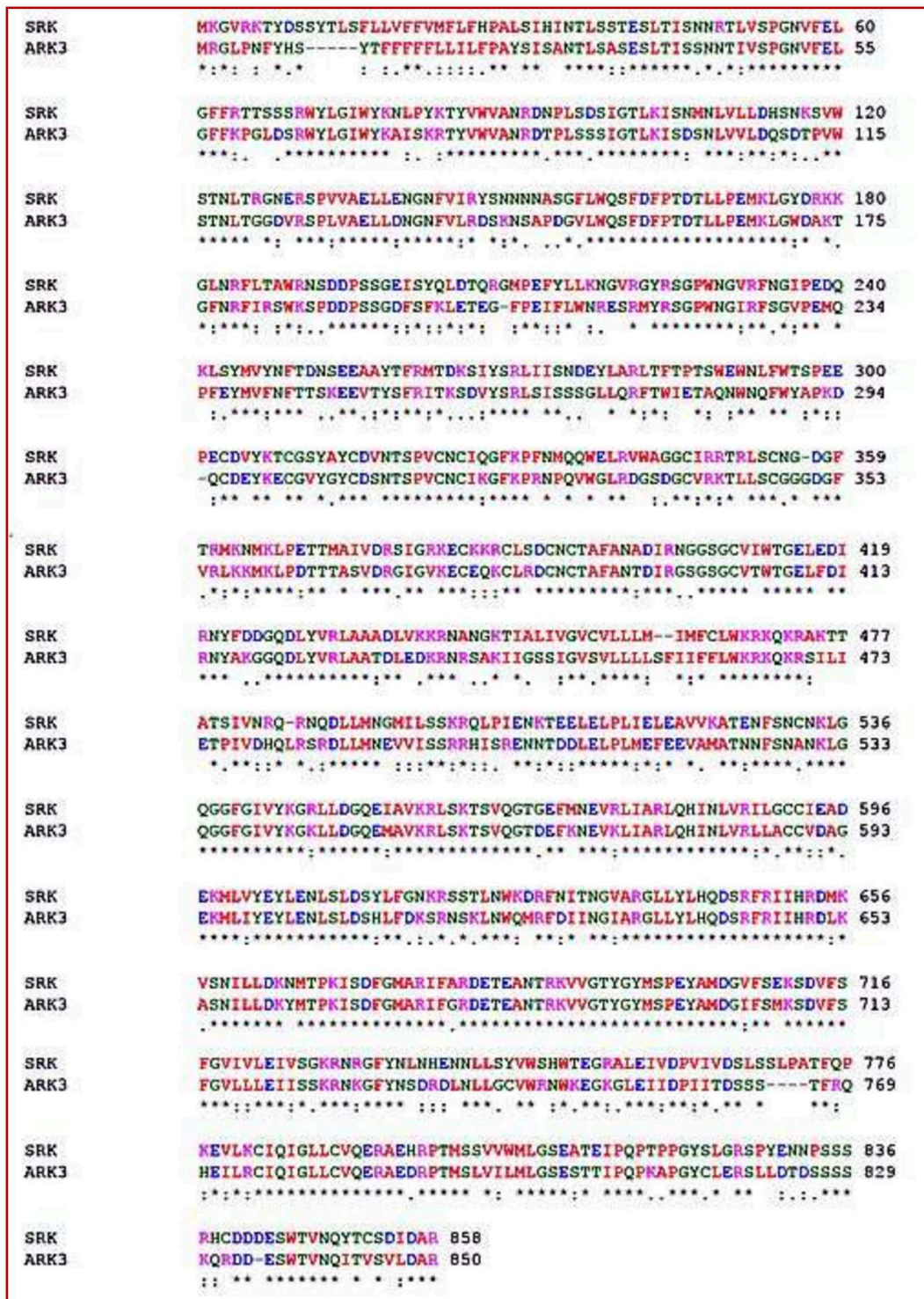


Figura 46A: Alineamiento de secuencias de proteínas entre SRK y AtARK3. Se indican con "*" la identidad (67%) y con ":" y "." la similitud (79%). Los colores de cada residuo de aminoácido fueron asignados de acuerdo al algoritmo ClustalW según las propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido (aa): rojo: AVFPMILW (aa pequeños e hidrofóbico, incluyendo aromático Y); azul: DE (aa ácidos); magenta: RK (aa básicos); verde: STYHCNGQ (aa con grupos hidroxilos, amina, sulfhidrilos, incluyendo G); gris: aa inusuales.

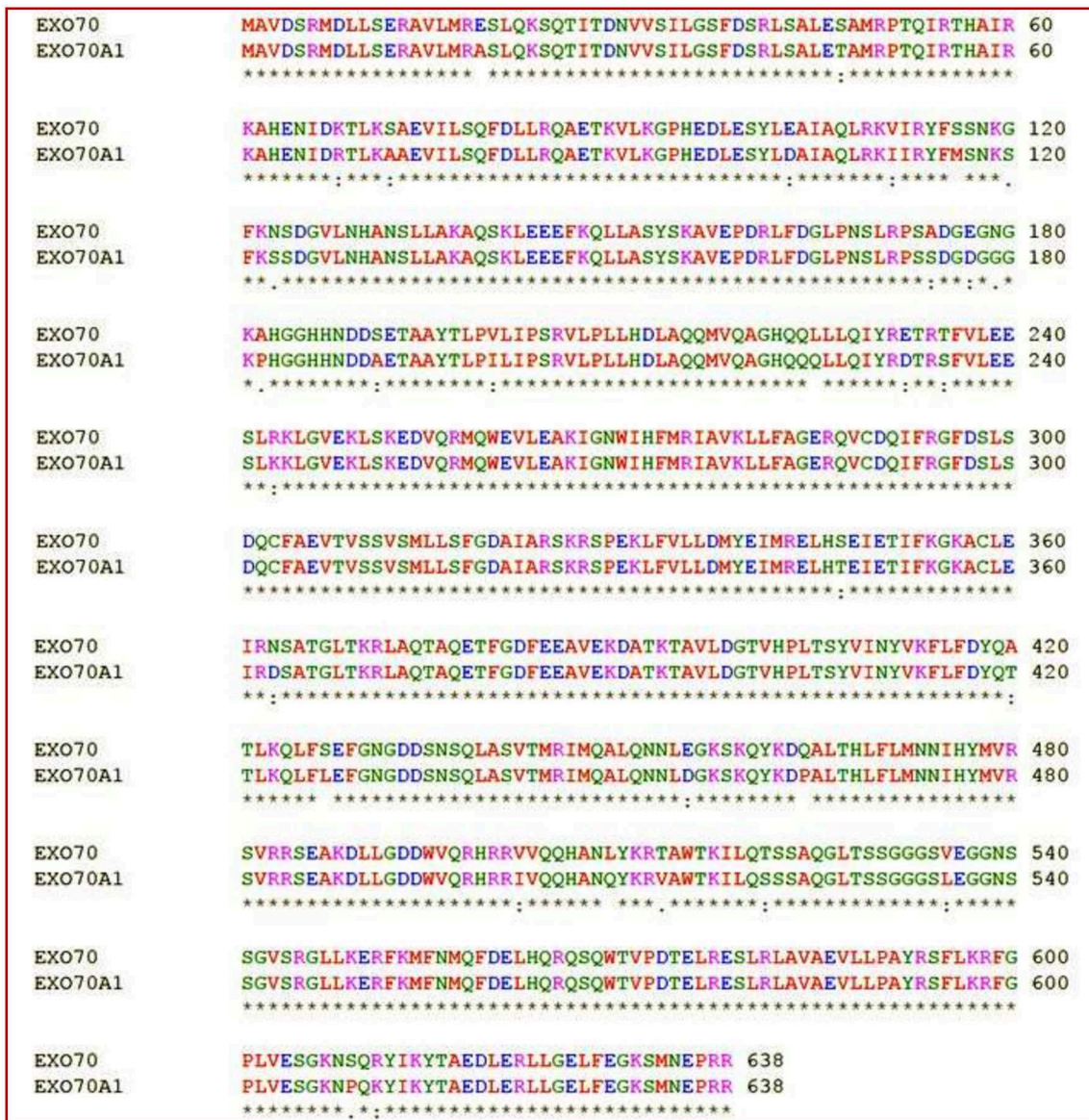


Figura 46B: Alineamiento de secuencias de proteínas entre EXO70 y EXO70A1. Se indican con "*" la identidad (95%) y con ":" y "." la similitud (98%). Los colores de cada residuo de aminoácido fueron asignados de acuerdo al algoritmo ClustalW según las propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido (aa): rojo: AVFPMILW (aa pequeños e hidrofóbicos, incluyendo aromático Y); azul: DE (aa ácidos); magenta: RK (aa básicos); verde: STYHCNGQ (aa con grupos hidroxilos, amina, sulfhidrilos, incluyendo G); gris: aa inusuales.

En relación con la expresión del gen EXO70A1 se pudo determinar que exhibe un dramático incremento en su expresión tanto en el tratamiento con GA (1,7 veces respecto del control normal) como al estrés salino (1,2 veces respecto del control normal). En las flores sometidas a ABA, también se verifica un incremento en la expresión respecto de las condiciones control (Figura 47B y 48).



Figura 47: Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio: (A) Expresión del gen correspondiente a *ARK3* de 204pb. (B) Expresión del gen correspondiente a *EXO70A1* de 334pb. Flecha negra: control de expresión interna (β -tubulina: At5g62700 de 151pb).

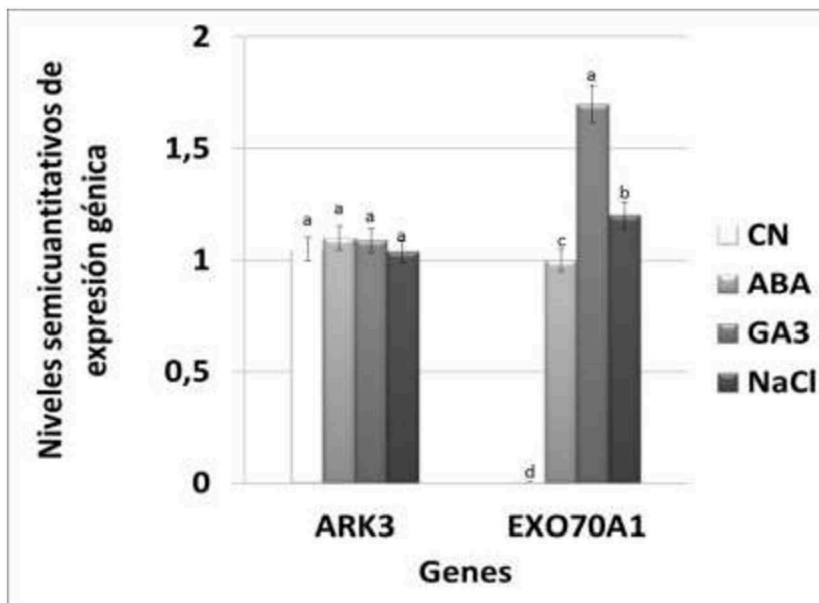


Figura 48: Niveles de expresión génica de *ARK3* y *EXO70A1* en flores sometidas a distintos tratamientos (CN, ABA, GA, NaCl). Letras distintas indican diferencias significativas utilizando el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

ESTUDIOS DE LAS ATARMS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Las técnicas de inmunofluorescencia han tenido un gran impacto en la biología celular de las plantas desde mediados del siglo XX hasta la actualidad. Esta técnica ha sido aplicada en numerosas investigaciones de células vegetales, particularmente las relacionadas con el citoesqueleto y las organelas asociadas (Lloyd, 1987). La MEF permite el rápido examen de la organización tridimensional subcelular en órganos y tejidos completos (Baskin y col., 1992), vía la detección *in situ* de macromoléculas marcadas con distintos fluoróforos.

Para la detección de proteínas ARMs en estigmas sin polinizar y en los estadios de interacción polen-estigma, se utilizó la técnica de IF de acuerdo a la técnica reportada por Sauer y col., (2006). La puesta a punto de la técnica, inicialmente se llevó a cabo utilizando estigmas de flores de *A. thaliana* de plantas salvajes tratadas con GA. Las reacciones permitieron demostrar que la detección de proteínas con repeticiones armadillo se localizan en la vacuola central de las células estigmáticas de flores de *A.*

thaliana tratadas con GA. Dicha localización sólo se evidencia una vez que se ha establecido el contacto polen-estigma (Figura 49). Estos hallazgos resultan concordantes con el modelo teórico postulado por Iwano y col., (2007) basado en estudios ultraestructurales en *B. napus*.

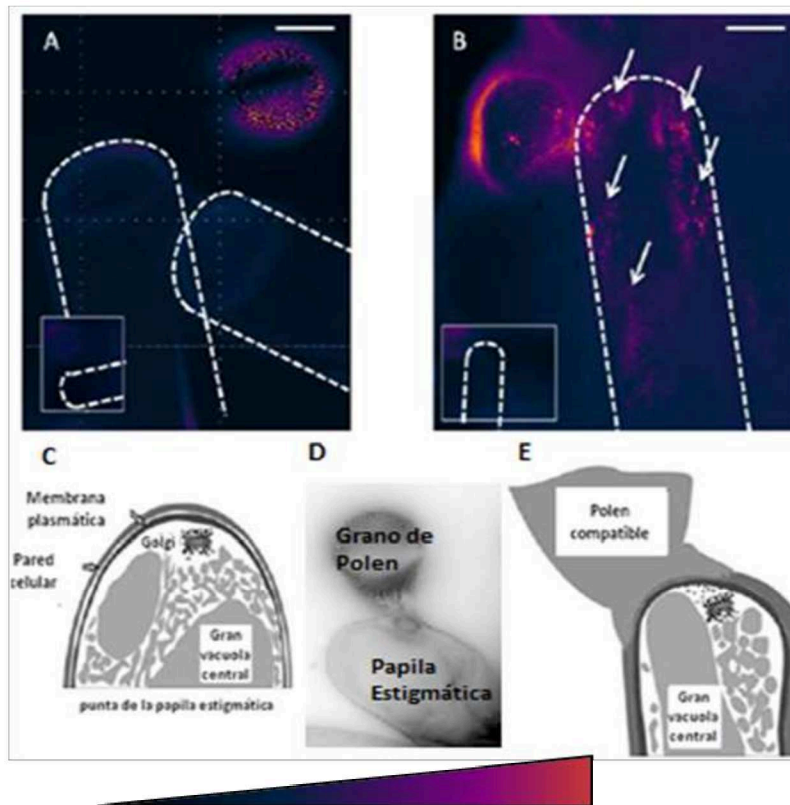


Figura 49: Las imágenes de IF corresponden a estigmas de flores de plantas de *A. thaliana* tratadas con GA: (A) estigmas en la etapa previa al contacto con el grano de polen y (B) contacto polen-estigma. Se observa que luego del contacto polen-estigma se detectan proteínas con repeticiones armadillo en el interior de la papila del mismo (flechas). La detección se llevó a cabo con utilizando el anticuerpo primario: *Rabbit Polyclonal anti-ARMC8 (armadillo repeat containing 8)* y como anticuerpo secundario: *Goat anti-rabbit IgG-Cy3 conjugated antibody*. Los controles omitiendo el anticuerpo primario se encuentran colocados como insertos en cada imagen (recuadro a la izquierda). Barra = 5µm. (C) y (E) Esquemas adaptados de Samuel y col. (2008) donde puede visualizarse la red vacuolar en un estigma no polinizado (C) y en un estigma polinizado (E) con polen compatible. Aquí la red vacuolar en la papila estigmática sugiere un direccionamiento hacia el punto de contacto polen-estigma, posiblemente para la posterior transferencia de agua. (D) Se muestra una micrografía en campo claro indicando la interacción polen-estigma. Se indica en la parte inferior de la figura una escala color esquematizando el rango de la señal fluorescente. La señal detectada en la cubierta del polen corresponde a señal autofluorescente.

CUANTIFICACIONES POR RT-QPCR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *AtPUB16* EN GENOTIPOS SALVAJES Y MUTANTES DE *A. THALIANA*

Con el objetivo de corroborar los resultados basados en RT-*sq*PCR y particularmente en los ensayos de las plantas tratadas con GA se realizaron estudios cuantitativos complementarios de la expresión génica utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

Estos experimentos permitieron verificar que en los tratamientos con GA, *AtPUB16* implicó incrementos de prácticamente 2,8 veces respecto del control no tratado (Figura 50). Dicha técnica exhibe una mayor sensibilidad respecto de la RT-*sq*PCR, previamente descrita. Asimismo, se realizó la cuantificación de la expresión génica por RT-*q*PCR de los genes postulados como integrantes de la cascada de eventos involucrados en los mecanismos de autopolinización en *A. thaliana*. En el primer genotipo mutante analizado, el gen *pub16* se logró por la inserción T-DNA en el gen que codifica para la proteína correspondiente. El segundo mutante consistió en mutantes de *A. thaliana* para el receptor para GA, *gid1a*, el cual se expresa a lo largo de todo el pistilo (Griffiths y col., 2006; Nakajima y col., 2006; Iuchi y col., 2007). La elección del receptor GID1A se basó en los hallazgos reportados por Hauvermale y col., 2014 en los que los efectos fenotípicos de mutantes *loss of function* individuales, de los tres receptores que existen en *Arabidopsis* (GID1A, GID1B y GID1C), GID1A es el que manifiesta mayores alteraciones fenotípicas durante los procesos de polinización-fecundación.

En las plantas con genotipos salvajes de *A. thaliana* sometidas a tratamiento hormonal con GA, los niveles de expresión génica para *AtPUB16* resultan superiores a los verificados en las plantas sin tratamiento hormonal con un nivel relativo de expresión igual a 1. Cuando se analizó el genotipo mutante *pub16*, los niveles de expresión génica de *AtPUB16* son inexistentes. Mientras que para las plantas mutantes *gid1a*, la expresión de *AtPUB16*, en relación con los genotipos salvajes, disminuye 0,5 veces en el genotipo mutante respecto del salvaje (Figura 50). Dicha disminución, constituye una sólida prueba sugiriendo que la activación la expresión de *AtPUB16* promovida por GA, se realiza principalmente vía el receptor GID1A.

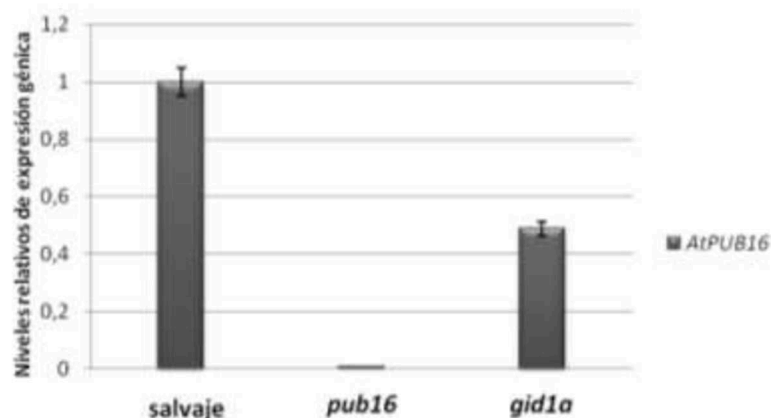


Figura 50: Niveles relativos de expresión génica de *AtPUB16* por RTqPCR para *A. thaliana* salvaje y las mutantes: *pub16* y *gid1a* bajo estrés hormonal con GA. Se muestran los niveles relativos de expresión génica utilizando el método del $\Delta\Delta Ct$, donde el gen calibrador es aquel sin tratamiento.

ENSAYO DE POLINIZACIÓN PARA DIFERENTES GENOTIPOS DE *A. THALIANA*

Con el objetivo de realizar un análisis funcional de los genotipos mutantes, se llevó a cabo la cuantificación del número de granos de polen por estigma, a través del test de polinización tanto en plantas sometidas a tratamiento hormonal como a plantas no tratadas con GAs. En la figura 51 se presentan los resultados de este ensayo en donde se pudo corroborar que en genotipos salvajes aumenta significativamente el número de granos de polen adheridos por estigma cuando se aplica GA, mientras que disminuye a un 25% en estigmas control (-GA). En los genotipos mutantes no se observaron diferencias significativas con y sin tratamiento con GA. Para la mutante *pub16* el número de granos de polen se reduce al 10% y para la mutante *gid1a* al 20%, dichos porcentajes no se modifican con el agregado exógeno de GA.

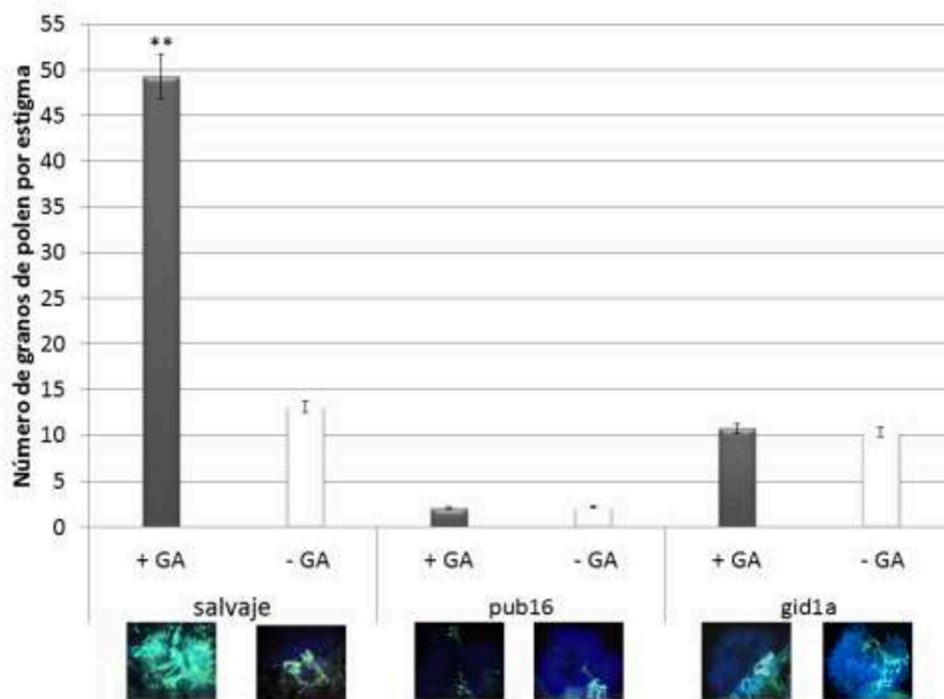


Figura 51: Ensayo de polinización para distintos genotipos de *A. thaliana*. Para el genotipo salvaje se observan diferencias significativas entre tratamientos, mientras que para los genotipos mutantes *pub16* y *gid1a* no se observan diferencias significativas entre tratamientos. Se observa asimismo en el genotipo mutante *pub16* una disminución importante en el número de granos de polen adheridos por estigma y en *gid1a* un número que significativamente no difiere del genotipo salvaje sin estrés hormonal. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las plantas tratadas (+GA) y las plantas control (-GA) **p <0,01 para cada genotipo

INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS AT-ARMS EN GENOTIPOS MUTANTES DE *A. THALIANA*

Teniendo en cuenta el conjunto de resultados obtenidos, la proteína AtPUB16 parece constituir un jugador clave del proceso inicial de polinización bajo la acción de GA en esta especie, se realizaron los experimentos con genotipos mutantes de *A. thaliana* tanto para la propia AtPUB16 (*pub16*), como para el receptor de GID1A (*gid1a*), conducentes a corroborar su rol en el proceso bajo análisis.

Para el cumplimiento de este objetivo, se estudió la expresión de proteínas ARM en ambos mutantes. Las mutantes *pub16* se caracterizan por poseer una inserción en el gen At5g01830 que reprime la transcripción. El segundo mutante utilizado fue *gid1a* que tiene reprimida la transcripción en el receptor GID1A. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 52.

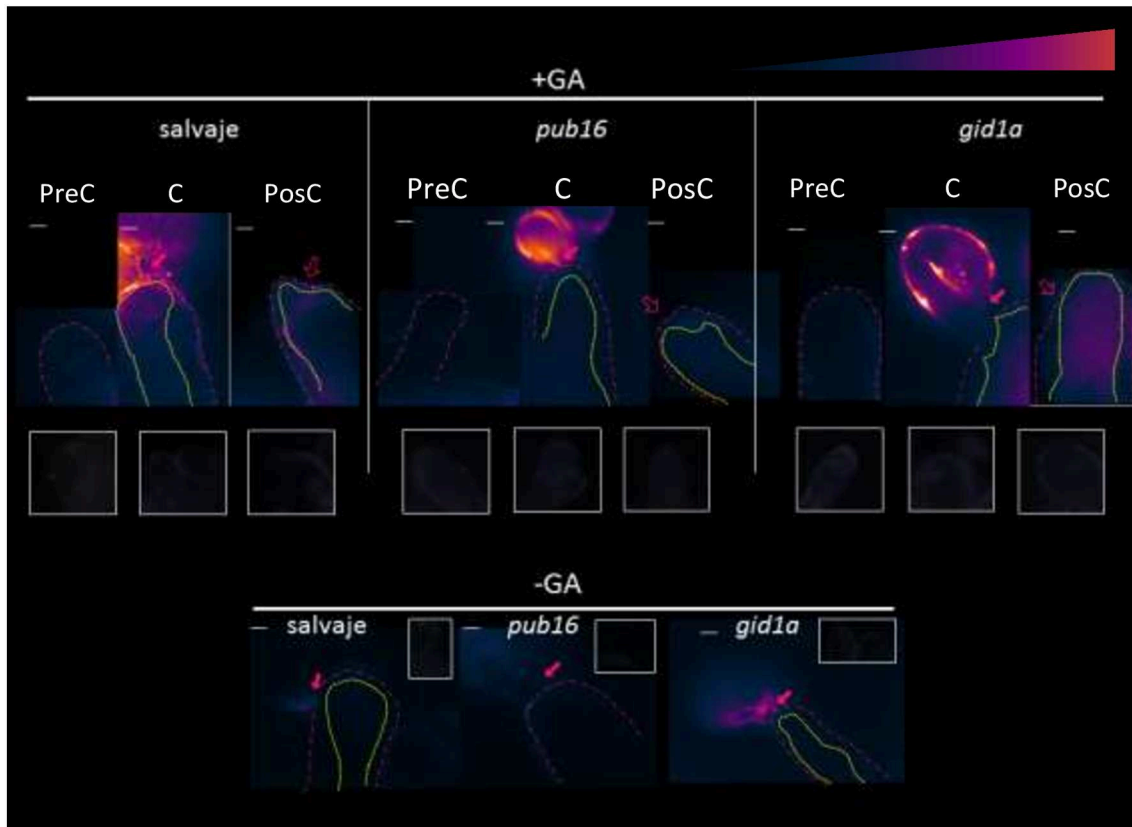


Figura 52: Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de AtARMs en estigmas. En el panel superior, se muestran, para los tres genotipos evaluados (*salvaje*, *pub16* y *gid1a*) los resultados obtenidos en plantas tratadas con giberelinas (+GA) previo al contacto polen-estigma (PreC), durante (C) y posterior al mismo (PosC). En los insertos ubicados debajo de cada imagen, se presentan los controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario. Las flechas en las imágenes PosC indican la huella que se distingue sobre la papila luego del contacto con el grano de polen. En el panel inferior de la figura se muestran los resultados de la IF en las regiones de contacto polen-estigma en plantas que no han sido sometidas a estrés hormonal (-GA) para cada uno de los tres genotipos evaluados. Las flechas indican el punto de contacto polen-estigma. Todas las imágenes fueron sometidas a pseudocolor para mejorar contraste. Se indica en el extremo superior derecho de la figura una escala color esquematizando el rango de la señal fluorescente. La señal detectada en la cubierta del polen corresponde a autofluorescencia.

En dicha imagen pueden visualizarse ejemplos de las reacciones de inmunofluorescencia realizadas para cada genotipo analizado (*salvajes*, *pub16* y *gid1a*), en tres momentos diferentes: previo al contacto polen-estigma (PreC), durante el contacto (C) y posterior al mismo (PosC). Tal como se informó previamente, los resultados mostraron su reproducibilidad para el genotipo salvajes, esto es, las plantas tratadas con GA, exhiben una inmunomarcación correspondiente a proteínas AtARMs en el interior del estigma. Por el contrario, para ambos mutantes, puede verificarse una disminución notable de la expresión de las proteínas AtARMs en la vacuola central del estigma durante el contacto.

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada ensayo fue realizada mediante la utilización del programa *ImageJ*. De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 53, el genotipo salvaje responde significativamente al agregado exógeno de GA, dado que se observa marca fluorescente correspondiente a proteínas ARM en el interior de las papilas estigmáticas durante el contacto polen-estigma. Los genotipos mutantes no presentan diferencias significativas con y sin tratamiento, detectándose marca fluorescente muy débil en ambos casos. Para *pub16* la IFR cae al 10% de la IFR observada para la misma condición en el genotipo salvaje, mientras que para *gid1a* la IFR es del orden del 30% comparado con el mismo genotipo.

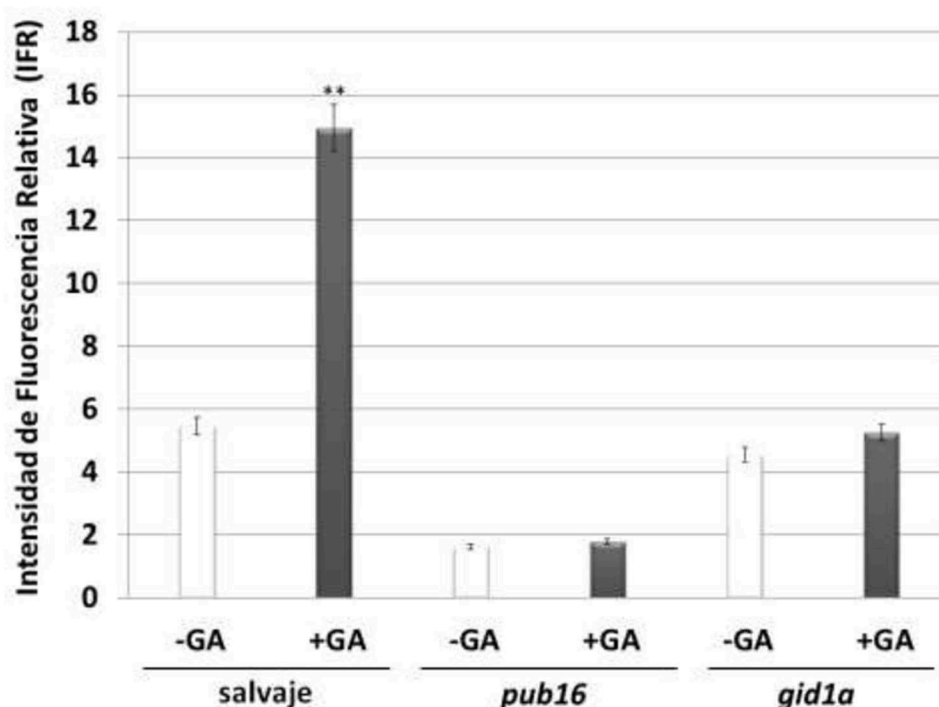


Figura 53: Cuantificación utilizando ImageJ de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) en función de los genotipos de *A. thaliana* evaluados. Las mediciones fueron realizadas durante el contacto polen-estigma (C). Puede observarse que para genotipos salvajes existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (+GA y -GA), mientras que para las dos mutantes estudiadas *pub16* y *gid1a* no existen diferencias significativas entre los tratamientos dentro del mismo genotipo.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA MUTANTE *PUB16*

La línea mutante *pub16* de *A. thaliana* posee una secuencia de inserción T-DNA generada por infiltración al vacío de plantas Columbia (Col) con *Agrobacterium tumefaciens* con el vector pROK2 (Alonso y col., 2003), tal como se describió en Materiales y Métodos. Dado que la información suministrada por el sitio *web* TAIR no

proporciona descripción fenotípica de esta mutante se propuso como parte de este trabajo de tesis caracterizar el genotipo mutante *pub16*, abordando diversas variables fenotípicas. Entre ellas se encuentran los siguientes parámetros: fenológicos (días a emergencia y días a floración), vegetativos (número de hojas finales, radio de rosetas, longitud de rama principal, longitud de radícula) y reproductivos (longitud de silicuas, número de silicuas, número de semillas por silicua) en el genotipo mutante *pub16* y en el genotipo salvaje Col-0; bajo dos tratamientos hormonales: con y sin giberelinas (+GA y -GA). Como se describe en el apartado introductorio, las GAs son reguladores de crecimiento endógeno en las plantas superiores, participando en una gran cantidad de procesos relacionados con el desarrollo, incluyendo la germinación de semillas, el crecimiento de las plántulas, la determinación del tamaño y la forma de las hojas, el tallo y la extensión de la raíz, la inducción de la floración y el desarrollo, polinización, desarrollo de semillas y la expansión del fruto. Los mecanismos moleculares por los cuales las GA bioactivas regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas son escasamente conocidos, aunque los estudios genéticos y bioquímicos recientes han identificado varios elementos clave en la señalización por GA (Gomi y Matsuoka, 2003; Sun y Gubler, 2004). El estudio de la respuesta a GA en *A. thaliana*, se ha complejizado por el alto nivel de redundancia funcional dentro de los componentes de señalización por GA (Dill y col., 2004; Strader y col., 2004; Nakajima y col., 2006). La utilización de mutantes ha sido en gran parte una herramienta muy útil para la identificación funcional de genes involucrados en esta vía de señalización.

Dado que se conoce que GA promueve el desarrollo vegetativo en *Arabidopsis* (Koornneef y van der Veen, 1980; Fu y Harberd, 2003), en primer lugar, se evaluaron parámetros que afectan a dicho desarrollo. Los resultados mostraron que entre las plantas salvajes y las mutantes no hubo diferencias significativas respecto al número de hojas finales, al radio de roseta y a la longitud del tallo alcanzado para ambos tratamientos (-GA: tabla 4 y +GA: tabla 5). Analizando cada genotipo -GA y +GA, pudo detectarse que +GA, las plantas salvajes alcanzaron alturas menores (50%) comparadas con las plantas -GA, hecho que también fue observado para plantas mutantes. Asimismo, se detectó un adelantamiento de la floración para ambos genotipos en presencia de GA

La única variable vegetativa que se mostró afectada fue la longitud radicular detectándose diferencias significativas entre Col-0 y *pub16*, observándose raíces primarias 92% más cortas para el genotipo mutante. Asimismo, estos valores se incrementaron para las plantas +GA, tanto salvajes (43%) como mutantes (21%), mostrando diferencias significativas entre los genotipos.

Las GAs están involucrados en muchos aspectos de la fisiología reproductiva. En *Arabidopsis*, promueven la iniciación floral y el desarrollo de órganos florales, semillas, y silicuas (Singh y col., 2002; Cheng y col., 2004). Bajo fotoperíodo de día largo, la mutante *pub16* florece 23 días (en promedio) posteriores a Col-0. La formación de flores se ve retardada en las mutantes, pero se observa respuesta a GA adelantado la floración. Asimismo para *pub16* se observó una reducción en el número de silicuas (20%), en la longitud de silicua (36%) y en el número de semillas (60%) por silicua.

Genotipo	Días a emergencia (d)	Días a floración (d)	N° de hojas finales	Radio de roseta (mm)	Longitud del tallo (cm)	Longitud de silicua (mm)	N° de semillas por silicua	Longitud de raíz (mm)	N° de silicuas
Col-0	2 ± 0,1	29,625±2,56	10,5±0,93	52,2±2,18	41,5±1,6	13,8±1,6	53,1 ±4,2	18,7±1,3	102,5±0,9
<i>pub16</i>	3.9 ± 1,45 *	52,2±2,25 *	14,4 ±3,85	47,6±1,26	37,2±3,2	9±1,8 *	22,6±3,5 *	1,4±0,8 *	71,3±0,8 *

Tabla 4: Caracterización fenotípica de genotipos Col-0 y *pub16* de *A. thaliana* en condiciones normales de crecimiento (-GA). Las mediciones corresponden a las medias ± DE de 8 plantas por línea (a excepción de la longitud de la raíz). Para las mediciones de la longitud de la raíz primaria, las semillas fueron disecados para eliminar la testa y se sembraron en placas de agar MS verticales. Las mediciones fueron tomadas después de 5 d y son la media ± DE (n = 10 a 15). *: Valores significativamente diferentes de Col-0 (P < 0,01). Ver Materiales y Métodos para más detalles del diseño experimental.

Genotipo	Días a emergencia (d)	Días a floración (d)	N° de hojas finales	Radio de roseta (mm)	Longitud del tallo (cm)	Longitud de silicua (mm)	N° de semillas por silicua	Longitud de raíz (mm)	N° de silicuas
Col-0	2 ± 0,1	19,25±1,39	8,3±1,28	42,3±1,52	22,8±1,6	14,5±0,3	59,3±5,4	42,2±2,5	107,5±1,2
<i>pub16</i>	3.9 ± 1,45 *	45,2±2,58 *	13,6±2,61	42,7±1,87	19,5±1,8	8,5±1,5 *	25,3±3,2 *	6,8±1,2 *	96±0,5 *

Tabla 5: Caracterización fenotípica de genotipos Col-0 y *pub16* de *A. thaliana* crecidas bajo tratamiento hormonal con GA (+GA). Las mediciones corresponden a las medias ± DE de 8 plantas por línea (a excepción de la longitud de la raíz). Para las mediciones de la longitud de la raíz primaria, las semillas fueron disecados para eliminar la testa y se sembraron en placas de agar MS verticales. Las mediciones fueron tomadas después de 5 d y son la media ± DE (n = 10 a 15). *: Valores significativamente diferentes de Col-0 (P < 0,01). Ver Materiales y Métodos para más detalles del diseño experimental.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ATPUB8

Otro aspecto que resultó de interés estudiar en la presente tesis, fue el rol de las moléculas AtPUBs postuladas como participantes en la ruptura de la barrera de polinización en sistemas SI en estadios de floración avanzados, fenómeno conocido

como pseudo-autocompatibilidad (PSC) o SI transitoria. En este proceso, la molécula candidata más estudiada es AtPUB8.

En este sentido se ha reportado que At4g21350 (*AtPUB8*) es un gen clave en la PSC, expresándose en estadios florales avanzados (Nasrallah, 2005; Liu y col., 2007). Utilizando modelos transgénicos de *A. thaliana* (en el genoma de *A. thaliana*, SRK existe como pseudogen, no funcional), estos autores han demostrado que PUB8 regula los niveles de transcritos de SRK. Sin embargo, y aún como se indicó en la sección anterior en relación con el receptor ARK3, en la presente tesis, se pudo demostrar que en *A. thaliana*, *AtPUB8* se expresa en todas las condiciones ensayadas, observándose un aumento significativo en el tratamiento mediado por ABA (1,0 veces respecto del control normal) y en el promovido por GA (0,8 veces respecto del control normal). En cuanto al estrés salino, el mismo parece provocar un aumento algo más moderado, aunque estadísticamente significativo (0,4 veces), respecto de las plantas control (Figura 54).

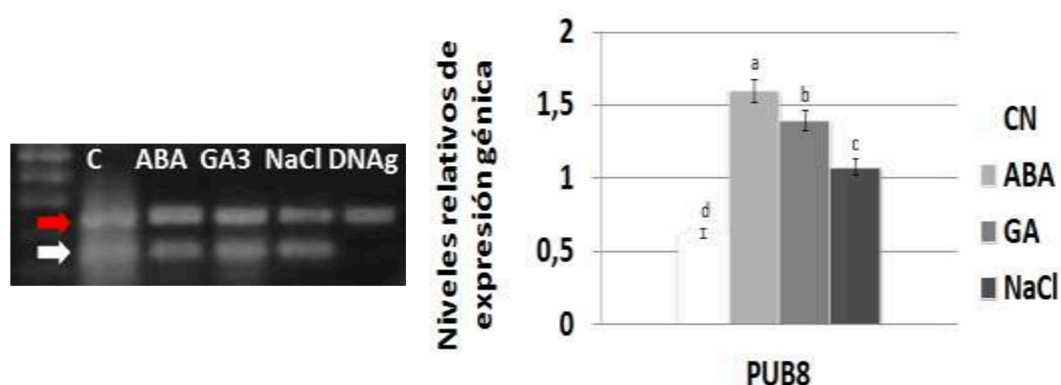


Figura 54: Cuantificación de la expresión génica para *PUB8* en *A. thaliana* bajo estrés. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Expresión del gen correspondiente a *PUB8* de 257pb (flecha roja). Se expresa en todas las condiciones ensayadas. La banda de mayor intensidad del marcador de peso molecular (MPM) corresponde a 500 pb. Flecha blanca: control de expresión interna (β -tubulina).

Adicionalmente a los estudios en *A. thaliana*, se utilizó otra especie del género *Arabidopsis*, *A. lyrata*, dado que ésta presenta un sistema de polinización autoincompatible. Adicionalmente en este caso se analizó la expresión génica en hoja. En esta última especie, la expresión génica de *AtPUB8*, es crítica para garantizar la polinización en condiciones extremas. La expresión génica se evaluó tanto en tejidos florales como foliares, aunque sólo se pudieron realizar los análisis de plantas de *A. lyrata* en condiciones normales de crecimiento y sometidas a tratamiento hormonal

con GA. La restricción se debió a que como consecuencia del alto grado de SI que presenta *A. lyrata* para este genotipo, no se pudieron obtener la cantidad de flores necesarias para evaluar todas las condiciones previamente ensayadas. Aunque se verificó una menor expresión de *AtPUB8* en tejido vegetativo resultó que estos últimos también expresan esta proteína putativa. Sorprendentemente, en estos experimentos se verificó que en hoja la respuesta a GA fue estadísticamente significativa respecto de los controles no tratados (0,7 veces respecto de las plantas no tratadas). Por el contrario, en tejido floral la expresión génica de *AtPUB8* en tejidos florales de *A. lyrata* sometidos a tratamiento hormonal con GA, no exhibe diferencias significativas respecto de las condiciones normales de crecimiento (Figura 55). En cuanto a la expresión de *AtPUB8* en tejido foliar de *A. thaliana*, se verifica que también hay una respuesta positiva a la acción de GA (0,7 veces respecto de la registrada en plantas crecidas en condiciones normales). En el caso del tejido floral de *A. thaliana*, también se verificaron incrementos estadísticamente significativos en las plantas sometidas a tratamiento hormonal con GA respecto de las plantas control (0,6 vs. 1,4 veces) (Figura 54).

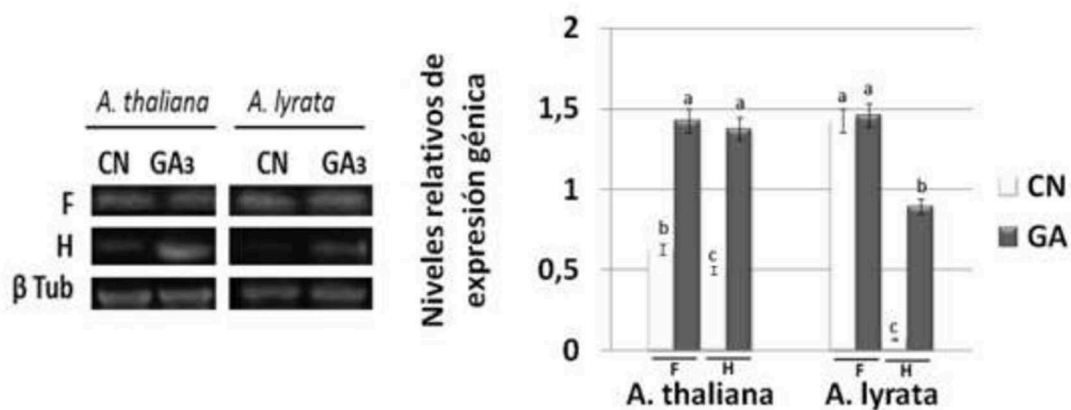


Figura 55: Cuantificación de la expresión génica para *AtPUB8* en *A. thaliana* y en *A. lyrata*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Expresión del gen correspondiente a *AtPUB8* de 257pb en condiciones normales de crecimiento y bajo estrés hormonal con GA, en dos tejidos: flor (F) y hoja (H), en dos genotipos de *Arabidopsis*: *A. thaliana* y *A. lyrata*. Control de expresión interna (β -tubulina: At5g62700 de 151pb).

DISCUSIÓN

ADHESIÓN CELULAR DURANTE LA POLINIZACIÓN

Naturaleza química lipoproteica de las moléculas que intervienen en la interacción polen estigma en *A. thaliana*

El registro más antiguo que se ha encontrado sugiriendo un interés humano en los mecanismos de polinización y fecundación de las angiospermas, es la de un relieve tallado del palacio del rey sirio Ashurnasir-pal II, 883-859 aC, que muestra a un hombre alado portando una inflorescencia masculina y esparciendo el polen sobre las femeninas de árboles de palma (Stanley y Linskens, 1974). Pero no fue sino hasta 1824 que el matemático y astrónomo Giovanni Battista Amici (1786-1863) observó por primera vez los tubos de polen en germinación, sobre un estigma. Más tarde el propio Amici propuso que el tubo polínico lleva los núcleos espermáticos al óvulo donde reside la célula huevo. En 1884, Eduard Adolf Strasburger (1844 – 1912) (Maheshwari, 1950) demostró la fecundación como la fusión de la célula huevo y los núcleos espermáticos en las angiospermas. En 1898, la doble fecundación fue reconocida como una característica única de las plantas con flores.

La reproducción en las angiospermas es un proceso que está sujeto a diferentes tipos de regulación mediados por la interacción entre el polen y el estigma. Esta interacción permite a los tejidos reproductivos femeninos de la planta, identificar y rechazar los granos de polen de especies estrechamente relacionadas (incompatibilidad interespecífica) y en muchas especies de plantas superiores, discriminar granos de polen producidos por la misma planta (autoincompatibilidad). Ambos procesos involucran un rol activo del estigma en el rechazo del polen incompatible y son asimismo muy distintos de la falla de la fecundación que resulta de las cruces interespecíficas entre plantas filogenéticamente distantes (incongruencia). En casos de incongruencia, los sistemas reproductivos de las especies de plantas han divergido tanto, que fracasan en interactuar entre sí en algún punto del proceso de la fecundación. Así, la incongruencia representa una simple falla en la interacción, en

contraposición al rechazo activo del gametofito masculino por los tejidos reproductivos femeninos. En crucíferas autoincompatibles, el arresto del desarrollo del polen que sigue a la autopolinización tiene lugar primariamente antes que el grano de polen germine. En una polinización compatible, el estigma libera agua y otras sustancias al grano de polen maduro deshidratado después que se deposita sobre el estigma. Esto habilita la germinación del grano de polen y la penetración del tubo polínico al estigma, así como su crecimiento a través del tejido de transmisión del estilo y finalmente su llegada al óvulo permitiendo que tenga lugar la fecundación (Dickinson y Lewis, 1973; Heslop-Harrison, 1979; Dickinson y Ellemann, 1985; Pruitt y Hülskamp, 1994). En la polinización incompatible, el estigma no libera agua a los granos de polen propio, impidiendo su germinación. Los granos de polen propios que germinan sobre la superficie del estigma están sujetos al arresto durante el crecimiento del tubo polínico y la penetración del estigma. El *locus* simple, responsable de la especificación de una identidad individual de una planta, se denomina *locus-S* y ha sido genéticamente estudiado y caracterizado desde hace varios años (Nasrallah y col., 1991; Dzelzkalns y col., 1992). Los dos alelos presentes en el *locus-S*, definen la identidad de la planta, con todos los granos de polen que expresan ambos alelos. Esto implica que estos genes actúan esporofíticamente, presumiblemente por ser expresados en las células tapetales diploides que rodean el grano de polen en desarrollo y son responsables tanto de la síntesis y depósito de la pared polínica externa esculpida (exina) así como también de la matriz lipoproteica (trifina) encontrada en las cavidades de la exina. Los posibles productos moleculares han sido identificados como glicoproteínas específicas del *locus-S* (SLSGs) (Nasrallah y col., 1985; Kandasamy y col., 1993) y los receptores *S* quinasa (SRKs) (Stein y col., 1991). Los genes que codifican SLSGs o SRKs son grandes familias multigénicas en *Brassica oleracea* y la función de estas proteínas durante la fecundación u otros aspectos del desarrollo de la planta permanecen como materia de especulación. En *Arabidopsis* existe una familia de genes relacionados, aunque sin función conocida (Dwyer y col., 1994).

Arabidopsis thaliana es una planta de pequeño tamaño, de la familia de las crucíferas, que carece de respuestas de autoincompatibilidad. *Arabidopsis* es particularmente

adecuada para la caracterización genética de las interacciones polen-estigma. Las características que la tornan un modelo ideal para dichos estudios incluyen su corto ciclo de vida, el pequeño tamaño de la planta madura, el pequeño tamaño de su genoma, la autofecundación de flores hermafroditas y un alto número de progenitores por flor (Rédei, 1970; Meyerowitz, 1987). Los enfoques genéticos han sido exitosamente aplicados para identificar genes en varios procesos del desarrollo (Meyerowitz, 1987; Schiefelbein and Somerville, 1990; Jürgens y col., 1991; Coen, 1993; Pruitt y Hülskamp y col., 1994). Preuss y col., 1993 han reportado una mutación que provoca el bloqueo del paso inicial de hidratación.

La adhesión celular desempeña un papel muy importante en todos los sistemas biológicos, participando en los procesos de diferenciación y/o en los de migración celular. Aunque la mayoría de las células vegetales, excepto los granos de polen durante la germinación del tubo polínico, carecen de capacidad de migración, las células implicadas en los procesos de fecundación establecen contactos adhesivos de *novo*. Así, se ha demostrado que las gametas de las plantas establecen complejos mecanismos de interacción finamente regulados que permiten la orientación del tubo polínico hacia el ovario, un proceso que requiere procesos de adhesión célula-célula (Lord y Sanders, 1992; Wilhelmi y Preuss, 1996). En *A. thaliana* la antesis y la autopolinización ocurren durante el estadio 13 (Smyth y col., 1990). Pese a que este proceso es clave en la reproducción de esta especie, se han realizado escasos estudios sobre el mecanismo involucrado y la posible contribución de las moléculas de adhesión celular asociadas al mecanismo de polinización. En 1999 Zinkl y colaboradores definieron y caracterizaron varios aspectos de la adhesión celular durante la reproducción de *Arabidopsis*. Estos fenómenos de adhesión se producen en cuestión de segundos, generan una fuerte interfaz de unión y son específicos de cada especie. En estigmas secos, esta interacción inicial es mediada por moléculas con características lipofílicas. La compleja cubierta extracelular del polen de muchas plantas con flores utiliza proteínas y lípidos para interactuar con las células estigmáticas receptoras femeninas (Dickinson, 2000; Fiebig y col., 2000). Se ha postulado que ésta cubierta facilita la comunicación en plantas con estigmas secos, proveyendo una función similar al exudado rico en lípidos de los estigmas húmedos (Wolters-Arts, y col., 1998). La

proteína más abundante de la cubierta del polen en *Arabidopsis*, es la proteína anfipática de unión a lípidos denominada oleosina u oleopoleína GRP17 (*Glycine-Rich Protein 17*) y ha mostrado ser una proteína clave en el inicio de la polinización (Mayfield y Preuss, 2000). Los estudios preliminares realizados en el marco de esta tesis, permitieron ampliar y corroborar los hallazgos de Zinkl y col., 1999. En dichos estudios se determinó que la especificidad para la adhesión polen-estigma en *A. thaliana* es mediada inicialmente por moléculas de características lipídicas que asumen conformaciones sensibles a ciertos detergentes (Zinkl y col., 1999; Acosta y col., 2007). En dichos estudios, fueron ampliados los rangos de concentraciones ensayadas para los diferentes solventes. Así, se corroboró que el polen unido es insensible a los agentes que interrumpen las interacciones electrostáticas; mientras que un subconjunto de reactivos hidrofóbicos logró desplazar al polen unido, indicando que moléculas de naturaleza hidrofóbica, posiblemente lipofílicas, son las responsables de mediar la adhesión o el anclaje adhesivo inicial. Estos resultados sugieren la posibilidad que las moléculas implicadas en la adhesión, estén ancladas a la superficie celular a través de las interacciones hidrofóbicas y que los detergentes son capaces de liberar todo el complejo de adhesión.

Aunque el reconocimiento celular en otros reinos es fundamentalmente mediado por proteínas, se ha demostrado que las moléculas de naturaleza lipídica, pueden asimismo proporcionar un alto grado de especificidad (Coll y Miller, 1991; Fisher y Long, 1992; Podila y col., 1993). Por lo tanto, moléculas hidrofóbicas, tales como los lípidos, los lipopolisacáridos, o eventualmente las proteínas hidrofóbicas, podrían proporcionar la especificidad necesaria para la adhesión polen-estigma. Así, tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la adhesión polen-estigma no sería únicamente mediada por una interacción proteína-proteína, sino que implica interacciones de una mayor complejidad adaptativa de los múltiples mecanismos de fecundación encontrados en plantas superiores.

Ya que las oleopoleínas poseen un rol clave en la estabilización de los gránulos de triacilglicerol, no puede descartarse que estas interrupciones afecten indirectamente también a dichas proteínas e indirectamente las interacciones adhesivas polen-estigma. Estudios con mutantes de la AtGRP17 muestran que dicha mutación resulta en

retardos significativos en la hidratación del polen, cuando se compara con los tipos salvajes (Mayfield y Preuss, 2000). Se ha especulado que los dominios símil-oleosina estabilizan los cuerpos oleosos en el tapetosoma o alternativamente, que podrían actuar como una secuencia de señalización para la poleína madura (Murphy, 2001). Alternativamente, también se ha especulado que los dominios polenina podrían tener una función como canales acuosos que facilitan la permeabilidad del agua a través de la cubierta lipídica durante la hidratación del polen, o funcionar como moléculas de señalización específica de especie hacia moléculas receptoras sobre la superficie del pistilo que desencadena nuevos pasos en el proceso de polinización (Kim y col., 2002).

En las células eucariotas animales se ha demostrado que las interacciones adhesivas mediadas por cadherinas pueden ser interrumpidas por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA (Nose y col., 1986; Argreves y col., 1987), pero estos compuestos no afectaron la adhesión inicial polen-estigma de *A. thaliana*. Estos experimentos permitirían descartar que los mecanismos de adhesión, puedan estar relacionados con este tipo de moléculas de adhesión- Ca^{+2} dependientes.

En cuanto a los ácidos, tales como el clorhídrico y el acético y las bases como el hidróxido de sodio, provocaron remoción del polen, pero sólo a concentraciones en las cuales se compromete la integridad tisular, sugiriendo que sus efectos no son específicos. En estudios previos se reportó que el efecto de la variación de pH en la unión polen-estigma afecta la cutícula estigmática altamente hidrofóbica y modifica la capacidad germinativa del grano de polen y el posterior avance del tubo polínico por el tracto de transmisión (Roggen y Van Dijk, 1973; Roberts y col, 1983; Hiscock y Allen, 2008). Este efecto no específico, fue inicialmente testado con diferentes concentraciones de ácidos y bases por Zinkl y col. (1999). Tal como fue demostrado en dicho reporte, las diferentes concentraciones de ácidos y bases no permitieron la liberación de los granos de polen del contacto con el estigma, demostrando que los cambios de pH, en este caso, no son determinantes para la alteración de los procesos de polinización, germinación y fecundación.

El conjunto de reactivos que no provocaron la interrupción de los procesos de adhesión, demuestran las notables propiedades de la interfaz polen-estigma. La unión es resistente a disruptores clásicos, como quelantes de cationes divalentes, agentes

caotrópicos, agentes reductores y oxidantes (sugiriendo independencia, respectivamente, de los enlaces disulfuro o una conformación similar a la exhibida por los hidratos de carbono) y sales. Los mecanismos de adhesión también resultaron refractarios a la acción de proteasas, aunque estas enzimas podrían haber tenido impedimentos estéricos para acceder y afectar a moléculas de adhesión de naturaleza proteica que pudiesen actuar en esta interfaz. Tampoco se puede descartar la posibilidad que existan proteínas implicadas en el proceso de adhesión, pero que estas sean notablemente estables e insensibles a la acción de proteasas. Sin embargo, como se ha indicado, el conjunto de ensayos realizados y los antecedentes previos, permiten sugerir que la interacción de adhesión inicial no estaría mediada por proteínas y que las interacciones electrostáticas no son las únicas responsables de tal fenómeno. Los detergentes no desnaturizantes, no iónicos (como el Tritón X-100), y los desnaturizantes aniónicos (como el SDS) promovieron el desprendimiento del polen unido, sugiriendo que los detergentes de esta naturaleza perturban la estabilidad de las moléculas de adhesión.

Morfología e histología de las estructuras reproductivas involucradas en el contacto polen-estigma

Luego de estos primeros estudios funcionales, en la presente tesis se realizó la caracterización morfológica de las estructuras que participan en el mecanismo de adhesión celular durante el contacto polen-estigma en *A. thaliana*. Dichos estudios se basaron en un conjunto de técnicas de microscopía. Las técnicas de MO se utilizaron para la visualización de células teñidas con azul de toluidina, aunque su resolución queda restringida a 0,2 μm . La utilización de MET permitió estudiar los detalles ultraestructurales intracelulares, los cuales pueden ser visualizados con una resolución teórica de 0,2 nm, mientras que la MEB permitió observar detalles de la superficie de las muestras con niveles de resolución de entre 4 y 20 nm, los que no se podrían resolver de otra manera con las técnicas de microscopía de luz transmitida. Las imágenes aportan una buena profundidad de campo (Wilson y Bacic, 2012), facilitando la visualización de muestras biológicas tales como las estructuras reproductivas presentes en tejido floral de *A. thaliana*.

Utilizando MO pudo observarse la presencia de papilas estigmáticas unicelulares. El estigma de *A. thaliana*, de acuerdo a la morfología de la superficie receptiva y la cantidad de secreción presente durante el período receptivo (Helsop-Harrison, 1977), puede caracterizarse como un estigma seco, con células receptoras concentradas en zonas o cabezas y superficie papilada. Estas características son las que particularmente se encuentran en el género *Brassica*. Como parte del ovario, se distinguen el tracto de transmisión y el *replum* que separan ambos lóculos, con sus respectivos óvulos parietales. Esta disposición se verifica en las especies del género *Arabidopsis* (Heslop-Harrison y col., 1977; Roberts y col., 1984; Spielman y col., 1997; Hiscock y Allen, 2008; Safavian y Goring, 2013).

Dado que la MO no permite caracterizar en detalle al contacto entre el grano de polen y el estigma, se utilizó MET con el fin de obtener los detalles ultraestructurales de dicha interacción. En las papilas sin polinizar se observaron claramente la cutícula y la pared celular adyacentes a la membrana plasmática. En dichos estudios se detectaron depósitos osmiofílicos, característicos del metabolismo intracelular, pequeños y dispersos, sugiriendo escasa actividad metabólica. Cuando se produce el contacto inicial del grano de polen con la papila estigmática, se observa claramente el depósito lipídico, que sería exudado por el gametofito masculino, que como se señaló previamente, es característico de las especies de estigmas secos, tales como los de *Brassica*. Sin embargo, en la presente tesis se logró determinar que la superficie de contacto lipídico de dicha interacción, es discontinua lo que hasta el presente trabajo no había sido reportado en la literatura. Dicha discontinuidad en la interacción polen-estigma, habilita la posibilidad que, adicionalmente a la naturaleza lipofílica de este contacto, también intervengan proteínas en el proceso. Dicha hipótesis incrementó el interés de indagar sobre posibles actores proteicos en el proceso de adhesión de las gametas femeninas y masculinas. Adicionalmente, luego de este contacto inicial, se observa una dramática reorientación de la gran vacuola central hacia el punto de contacto. Asimismo, se detecta un aumento en el número de agregados osmiofílicos y pequeñas vacuolas ubicadas en el punto de contacto. Como se discutirá más adelante, estos hallazgos fueron corroborados posteriormente en los estudios inmunohistoquímicos en los que se detectaron proteínas ARM en las papilas,

presentes durante el contacto polen-estigma en presencia del tratamiento hormonal con GA. Esta reorientación vacuolar hacia el contacto con el gametofito masculino, muestra que existen proteínas que activan su expresión en determinadas condiciones de tratamiento, favoreciendo el contacto para su posterior hidratación. Estos resultados constituyen una evidencia morfológica que soporta la idea que, durante la interacción polen-estigma, existiría alguna clase de comunicación cruzada entre ambas células. En mamíferos, los contactos entre las células y la matriz extracelular inducen la remodelación del citoesqueleto y la activación de cascadas de señalización (Gumbiner y col., 1996; O'Toole y col., 1997). Del mismo modo, los eventos de adhesión polen-estigma demuestran que desencadenan procesos de reorganización citoplasmática e inician la señalización que regula la hidratación del grano de polen y el posterior avance del tubo polínico (Elleman y col., 1992). Después de la hidratación, el grano de polen produce una excrecencia a través de una abertura o área delgada en la pared. Este es el sitio de crecimiento que resulta en la producción del tubo polínico, que en última instancia, transmitirá las células espermáticas hacia el saco embrionario. El proceso inicial de germinación está regido por un complejo control, un regulador importante de este proceso es ROP (*Rho-like GTPase of plants*), una GTPasa que comparte el mismo ancestro que Cdc42, Rac y Rho de la familia RHO de pequeñas GTPasas (Fu y Yang, 2001). La función de ROP en la germinación fue estudiada en *Arabidopsis* utilizando la sobreexpresión de *rop1* y mutantes *rop*. La expresión de un mutante *rop1* dominante negativo (DN) inhibe la germinación del polen (Li y col., 1999), mientras que la sobreexpresión del *rop1* salvaje promueve dicha germinación.

Una vez que ocurre la germinación, el mantenimiento del crecimiento polar del tubo polínico es también controlado por ROP en una compleja red de señalización que incluye la regulación de un gradiente de Ca^{+2} y la regulación de la polimerización de actina F (Hepler y col., 2001).

Finalmente, en la presente tesis, los experimentos con reactivos que perturban el contacto polen-estigma, mostraron que luego de la remoción química de los granos de polen, se observa sobre la superficie de la papila una huella que revela la existencia del contacto. En esta situación también se verifican indicadores de una intensa actividad metabólica y reorientación de la gran vacuola central hacia el sitio de contacto. Como

se discutirá más adelante, estos hallazgos se corroboraron en los estudios de localización de las proteínas AtARMS por inmunohistoquímica, en las que se detecta una huella en la superficie de la papila estigmática, posterior al contacto. Dichas evidencias morfológicas e inmunohistoquímicas sugieren que el complejo de adhesión polen-estigma es el responsable de la comunicación entre ambas células, ya que previo a dicho contacto se observa, utilizando técnicas de MET, una escasa cantidad de agregados osmiofílicos, que son indicativos de una actividad metabólica muy restringida. Por el contrario, durante y luego del contacto se incrementa la actividad metabólica desencadenada por la interacción inicial y se verifica un aumento de partículas osmiofílicas en el interior de la gran vacuola central y en el citoplasma circundante, esto también se comprueba en la intensidad de la marcación de la red vacuolar de las imágenes de inmunohistoquímica de los estigmas polinizados en las plantas salvajes. Sin embargo, al presente no se ha podido dilucidar si la señalización a través de la trifina ocurre simultáneamente con, o inmediatamente después, del proceso de adhesión (Zinkl y col., 1999).

Adhesión del grano de polen al estigma

Las superficies ornamentadas de las células reproductivas masculinas y femeninas en las flores han sido objeto de atención por su variedad y significado evolutivo. Estas estructuras y las moléculas que participan en las interacciones sexuales, siguen estando entre las características más diversas y de más rápida evolución conocidas. Aún cuando puede verificarse una amplia variedad de estrategias, cada elemento participa en la realización de las mismas funciones, ya sea protegiendo el polen y el estigma del medio ambiente, como garantizando la entrega y la captura de polen así como la promoción de su hidratación y germinación para permitir la entrada de los tubos polínicos apropiados en el estigma y guiar los tubos al ovario. Así, la captura de los granos de polen por los estigmas involucran estrategias ecológicas mediadas por un conjunto de polinizadores bióticos y abióticos (insectos, viento, etc.) y moleculares que generan fuertes interacciones adhesivas para posibilitar su retención. La interfaz polen-estigma difiere en las distintas especies como resultado de la amplia variabilidad en la morfología y el contenido de los exudados del estigma así como la naturaleza de la exina y la cubierta de polen.

Sobre los estigmas secos de las Brassicaceae, especialmente los de *A. thaliana*, los granos de polen de otras familias botánicas no se adhieren correctamente, lo que demuestra una especificidad que restringe el acceso al polen inapropiado (Luu y col., 1998; Zinkl y col., 1999).

En *Arabidopsis*, la naturaleza de la interface polen-estigma sufre modificaciones a medida que progresa la polinización, tornándose con el tiempo considerablemente más fuerte, con diferentes tipos de contactos adhesivos (Luu y col., 1997a; Luu y col., 1997b; Zinkl y col., 1999; Edlund y col., 2004; Acosta y col., 2007).

Es ampliamente reconocido que la autopolinización no necesariamente conduce a procesos de autofecundación ya que un alto porcentaje de plantas con flores (hasta el 70%) presentan sistemas genéticos que promueven la autoincompatibilidad (SI) garantizando de este modo la variabilidad genética, vía la fecundación cruzada. Estos sistemas guardan ciertas semejanzas con los sistemas de receptores basados en interacciones proteicas y se ha postulado que serían activados inmediatamente a continuación del establecimiento de la interacción de tipo lipofílica. Estos mecanismos son los responsables del reconocimiento del polen propio por el pistilo y su subsiguiente rechazo, mucho antes de que exista el riesgo de autofecundación y su efecto en la depresión endogámica. Así, es ampliamente reconocido y aceptado que los sistemas de SI permiten optimizar el potencial de la exogamia. Debido a las consecuencias genéticas, ecológicas y evolutivas, durante los últimos 20 años la SI ha sido ampliamente estudiada y caracterizada (Franklin-Tong, 2008; Ferrer y Good, 2012; Leducq y col., 2014). En especies de *Brassica* se han identificado las moléculas que actúan mediando el reconocimiento del polen por el estigma y que inician la respuesta SI. La base molecular para el reconocimiento del polen durante la respuesta SI ha sido estudiada demostrándose que la proteína BnARC1 es una molécula central en la respuesta SI de este género (Stone, 1999; Stone, 2003). Esta proteína contiene dominios con repeticiones armadillo que participan en las interacciones proteína-proteína. Dichas interacciones específicas son dependientes de la fosforilación del dominio quinasa de SRK (Gu, 1998). Sin embargo, tanto la vía de transducción de la señal desencadenada por la activación de SRK, como el mecanismo celular por el cual

se rechaza el polen incompatible aún permanecen sin haber sido completamente dilucidadas.

A diferencia de la atención que se ha prestado a las investigaciones sobre los mecanismos que involucran la SI, los procesos de la autofecundación y SC han sido sistemáticamente soslayados y subvalorados, como sí estos no constituyesen un dispositivo fundamental en la evolución y la ecología de las plantas superiores. La importancia de la autopolinización (así como de la apomixis) fueron originalmente reconocidas por Baker como mecanismos claves en las plantas con flores (Baker, 1948; Baker, 1967). La ley de Baker invoca la importancia del aseguramiento reproductivo basado en la selección de los mecanismos de autofecundación, SC y apomixis (Hörandl, 2008).

En los modelos de metapoblaciones, la selección para garantizar la reproducción es mayor, conforme disminuye la tasa de ocupación de nuevas colonias (Levins, 1969; Pannell y Barrett 1998). Más allá de la fase de la colonización, la reproducción uniparental actuaría aliviando la fecundidad reducida que surge como consecuencia de la limitada cantidad de polen en pequeñas poblaciones fundadoras y/o como compensación de la falta de polinizadores adecuados en la región colonizada (Rambuda y Johnson 2004). Varias líneas de evidencia sugieren que las transiciones desde la fecundación cruzada a la autofecundación han ocurrido varias veces en linajes independientes. En las angiospermas, tales transiciones tienden a estar asociadas con conjuntos de cambios, incluyendo las diferencias morfológicas (por ejemplo, disminución del tamaño floral) y genómicas (por ejemplo, reducción en el tamaño del genoma), así como propiedades genéticas de la población (por ejemplo, la reducción de la heterocigosidad; revisados en Charlesworth 2003). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la escala temporal (*timing*) y los procesos que impulsan dicha transición, se han mantenido fuera del alcance de la investigación experimental, incluso para especies con mecanismos de autofecundación muy bien estudiados, (como *Caenorhabditis elegans* y *A. thaliana*) los que se sabe cambiaron de mecanismos de fecundación cruzada a autofecundación (Marais y col., 2001; Nasrallah y col., 2004).

Investigaciones recientes han encontrado evidencias que la transición de autoincompatibilidad ancestral a autocompatibilidad completa en *A. thaliana* habría

ocurrido muy recientemente (Kusaba y col., 2001) y sugiere que dicho proceso fue consecuencia de una fijación selectiva de un alelo no funcional ($\psi SCR1$) del gen SCR, que determina la especificidad en la respuesta de incompatibilidad. La principal evidencia es la carencia de polimorfismo en el *locus SCR* en *A. thaliana*. Sin embargo, el gen *SRK* estrechamente emparentado, que determina la especificidad estigmática en las especies de Brassicaceae autoincompatibles, posee una extremadamente alta diversidad de secuencia, con tres haplotipos *SRK* divergentes, dos de ellos presentes en múltiples cepas. Esta alta diversidad es extremadamente inusual en esta especie y sugiere la posibilidad que múltiples diferentes haplotipos de *SRK* puedan haberse preservado de ancestros autoincompatibles de *A. thaliana* (Bechsgaard y col., 2006).

Por este motivo y con el objetivo de profundizar sobre el mecanismo de adhesión polen-estigma en una especie SC como *A. thaliana*, en una tercera etapa, los estudios de la presente tesis se orientaron a tratar de comenzar a clarificar este proceso tanto a nivel molecular como funcional. Para la consecución de este objetivo se trabajó en el rastreo de moléculas con niveles de homología a BnARC1 en *A. thaliana*, que permitan comenzar a explicar los posibles roles de éstas en sistemas SC, así como los mecanismos moleculares implicados en este tipo de polinización.

PROTEÍNAS CON REPETICIONES ARMADILLO EN *A. THALIANA*: ATARMS

AtPUB16 se encuentra filogenéticamente relacionada a BnARC1

Las estrategias de control de las funciones proteicas, basada en su inactivación por destrucción desarrollada por las plantas, son un conjunto de procesos bien estudiados y conocidos. Como ya se indicó previamente, un mecanismo fundamental para las plantas, se basa en el Sistema Ubiquitina/Proteosoma (UPS), un mecanismo altamente regulado de degradación y *turnover* intracelular. A través de la acción concertada de una serie de enzimas, las proteínas son marcadas con ubiquitina, señalizando su degradación proteosomal. Aun cuando no existen datos definitivos, si se considera la homología de las secuencias de aminoácidos, se estima que 5% del genoma de *Arabidopsis*, se compone de elementos de la vía del UPS (Smalle y Vierstra, 2004). Las vías que utilizan el sistema UPS para controlar la señalización de GA se encuentra altamente conservada en especies que van desde monocotiledóneas (como el arroz y

la cebada) hasta las dicotiledóneas (como *Arabidopsis*). En plantas, de la totalidad de los componentes de la maquinaria de ubiquitinación, aproximadamente la mitad son redundantes o parcialmente redundantes, e influyen sobre diversas respuestas al ambiente o modulan diversos procesos del desarrollo de las plantas. Notablemente, múltiples aspectos de las respuestas a estreses bióticos y abióticos requieren o son modulados por ubiquitinación (Callis, 2014). El UPS posee un amplio espectro de acciones desde su actividad como componentes amplificadores de la expresión génica, a reguladores de la abundancia de proteínas. Estas estrategias que implican la degradación de proteínas, a simple vista podrían considerarse como un costo energético desfavorable. Sin embargo, dicha estrategia dotaría a las plantas de la capacidad de responder más rápidamente ante posibles cambios ambientales (o los requeridos durante la ontogenia), que aquellos demandados para modificar las tasas de transcripción. Recientes reportes en este campo han identificado a la conjugación de ubiquitina, como un mecanismo importante en la regulación de factores de transcripción de respuesta a estrés y otras proteínas reguladoras. Mediante la modulación de la concentración y la actividad de estas últimas, la ubiquitinación jugaría un rol central en la regulación de los cambios transcripcionales requeridos para la adaptación al estrés abiótico (Cho y col., 2006, Samuel y col., 2008; Park y col., 2011; Lyzenga y Stone, 2011; Dubois y col., 2013; Clark y Millar, 2015).

Con el objetivo de caracterizar en *A. thaliana* proteínas ARMs, homólogas a BnARC1, se realizó un estudio bioinformático basado en la realización de un alineamiento múltiple y a partir del mismo, se efectuaron estudios comparativos, utilizando herramientas que permiten el cálculo de distancias filogenéticas.

En trabajos previos se ha reportado una caracterización filogenética de AtARMs agrupándolas de acuerdo a la presencia de dominios ARM y U-box (Mudgil y col., 2004). En la presente tesis se decidió incluir en dichos análisis tanto las AtARMs, como la secuencia correspondiente a BnARC1. Esta inclusión provocó un reordenamiento de las secuencias, diferente a la obtenida por el grupo de Mudgil, ubicando más cerca de BnARC1 a aquellas secuencias que poseen relación evolutiva con la misma. Es sabido que existen diversas formas de determinar la historia evolutiva de un conjunto de secuencias relacionadas. Algunos métodos utilizan como

información de partida, conjuntos de características (por ejemplo: el tipo de residuo presente en cada posición de las secuencias comparadas) mientras que otros se basan en medidas de distancias entre las secuencias. Los métodos basados en distancias (NJ), permiten construir árboles filogenéticos basados en la distancia genética entre pares de secuencias de ADN o proteínas. Estos requieren un alineamiento múltiple como información de entrada (Saitou y Nei, 1987). Difieren de los métodos basados en caracteres (MP, ML), en que los datos utilizados se presentan en una matriz de distancias, obtenida a partir del alineamiento de las secuencias, en lugar de emplear el propio alineamiento como ocurre en el resto de los métodos (Otu y Sayood, 2003). De esta manera se comparan las secuencias completas, otorgando un mayor significado evolutivo y evocando una imagen intuitiva del “grado de parentesco” entre ambas (Kahl y Meksem, 2008). Los primeros son los llamados métodos algorítmicos, agrupan las secuencias según distintos criterios, creando un nuevo nodo en cada paso y conduciendo a la obtención de un único árbol, considerado el más ajustado a los datos (Figura 31 A). La principal ventaja de los métodos basados en distancias, es su bajo costo computacional, lo que resulta de particular utilidad cuando se desea comparar un gran número de secuencias. Entre las desventajas más relevantes se pueden mencionar que el alineamiento múltiple conlleva pérdida de información, es sensible al orden de entrada de los datos y se genera un árbol único, por lo que se desechan árboles que podrían ser igualmente válidos y consistentes con los datos (Farris y col., 1996).

El método de máxima parsimonia (MP) se basa en caracteres y por tanto trata de utilizar cada una de las posiciones del alineamiento múltiple como una pista en la búsqueda del árbol más probable. Tiene la ventaja de ser relativamente rápido con grandes matrices de datos, robusto si las longitudes de rama son cortas (amplio muestreo o baja divergencia) y se pueden inferir estados ancestrales (Kahl y Meksem, 2008).

El método de máxima verosimilitud (ML), selecciona el árbol con mayor probabilidad de explicar los datos, utilizando el modelo evolutivo para establecer la probabilidad de cada tipo de mutación en las secuencias. Tiene la ventaja de ser robusto y poco sensible a la violación de sus asunciones (Huelsenbeck, 1995), es el método menos

afectado por el error de muestreo ya que proporciona las estimaciones con menor varianza y permite la superposición de múltiples cambios en una misma posición (Hillis y col., 1996). En este trabajo, el análisis filogenético se llevó a cabo con secuencias pertenecientes a una súperfamilia, por lo que se trata de secuencias de proteínas homólogas con una estructura similar para las que existe alguna evidencia que sugiere un origen evolutivo común y con muy diversas funciones (Murzin y col., 1995).

Con el fin de otorgar consistencia y robustez al análisis de filogenia, en esta tesis se utilizaron los tres métodos de reconstrucción filogenética: vecinos cercanos (NJ) basado en distancias, máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) basado en criterios de optimización. Todos los árboles filogenéticos reconstruidos permitieron identificar un conjunto de genes que codifican para polipéptidos que pertenecen a la súperfamilia de las proteínas ARM de *A. thaliana*. AtPUB16 es la secuencia que se encuentra ligada más directamente al nodo que conecta BnARC1 y AtPUB17. En todas las reconstrucciones filogenéticas obtenidas, se verifica una posición coincidente de AtPUB16 en el nodo próximo más cercano al punto que une a BnARC1 con AtPUB17, sugiriendo funciones biológicas para AtPUB16 relacionadas tanto con la presencia de dominios ARM como U-box homólogos en las tres secuencias (Kahl y Meksem, 2008). La función biológica como ligasa de ubiquitina E3, que actúa marcando proteínas para su degradación vía proteosoma involucradas en diferentes vías de señalización, se ha descrito tanto para BnARC1 como para AtPUB17. BnARC1 actúa marcando proteínas involucradas en la vía de hidratación y posterior germinación del grano de polen compatible (Stone y col., 2003), mientras que AtPUB17 participa en mecanismos de defensa a patógenos (Yang y col., 2006). Ambas poseen dominios ARM, característicos de proteínas involucradas en la interacción proteína-proteína y un dominio U-box presente en todas las ligasas de ubiquitina E3. Dado que AtPUB16 es la secuencia próxima siguiente a ambas en las reconstrucciones filogenéticas, se propone para la misma, una función biológica similar como ligasa de ubiquitina E3 en un mecanismo de señalización nuevo, aún no caracterizado.

AtPUB16 posee dominios y estructura 3D similares a BnARC1 y AtPUB17

La existencia de una asociación entre la secuencia de aminoácidos y las estructuras secundarias adoptadas en la proteína, es la hipótesis fundamental sobre la cual están

basados todos los métodos de predicción de estructura secundaria (Sander y Schneider, 1991). Cuando se utilizan bases de datos tales como SMART o Pfam, se pueden predecir patrones y perfiles que conforman una región particular o dominio en la arquitectura de una proteína. La similitud observada a nivel de las estructuras secundarias, evidencia una frecuencia relativamente alta de aminoácidos comunes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis filogenético se utilizó la base de datos SUPERFAMILY (Gough y col., 2002) detectándose dos regiones importantes en AtPUB16: una región RING/U-box de los residuos de aminoácidos 265 al 346 y una región ARM que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos del 385 al 639. Esto sugiere que *AtPUB16* podría codificar para una proteína con características funcionales homólogas a las desempeñadas por BnARC1 y/o AtPUB17. Se ha demostrado que estos últimos polipéptidos actúan como ligasas de ubiquitina E3, BnARC1 en el citosol de las papilas estigmáticas de especies de *B. napus*, promoviendo el rechazo de granos de polen propio (Stone y col., 2003), mientras que AtPUB17 está involucrada en procesos de muerte celular programada y defensa en *A. thaliana* (Yang y col., 2006), tal como se ha descrito anteriormente. Un homólogo funcional de BnARC1 en *A. thaliana* podría desempeñar funciones diferentes, dado que se trata de una especie SC. Esto fortalece la idea propuesta por algunos autores quienes afirman que las proteínas PUBs-ARM podrían estar involucradas en diversos procesos del desarrollo: el reconocimiento y rechazo del polen incompatible (BnARC1), en respuesta al estrés por luz como a giberelinas (PHOR1 de *Solanum tuberosum*), interactuando con receptores quinasa involucrados en desarrollo y crecimiento (NtPUB4 de *Nicotiana tabacum*), regulando los procesos de muerte celular y de respuestas defensivas (SPL11 de arroz) (Coates, 2003; Samuel y col., 2006; Coates y col., 2006) o como regulador positivo de procesos relacionados con la defensa en *A. thaliana* (AtPUB17) (Yang y col., 2006).

El modelado por homología constituye un conjunto de métodos de predicción que utiliza técnicas muy potentes basadas en el modelado tridimensional (3D). Estos métodos se basan en el hecho de que todas las parejas de proteínas que presentan una identidad de secuencia mayor al 30%, poseen estructuras 3D similares, sugiriendo roles biológicos análogos (Sander y Schneider, 1991). De este modo es posible

construir el modelo de una proteína de estructura desconocida, partiendo de la semejanza de secuencia con proteínas de estructura conocida (Blundell y col., 1987). En base a estos antecedentes, en la presente tesis se utilizó el programa PyMOL (*Molecular Graphics System*), una herramienta de visualización de fuente abierta para estudios de biología estructural (<http://sourceforge.net/projects/pymol/>). Este programa permite generar imágenes de alta calidad 3D de macromoléculas biológicas, como las proteínas. Los resultados obtenidos de la modelización, mostraron que espacialmente AtPUB16 exhibe una estructura C-terminal similar a BnARC1, AtPUB17, AtPUB19, AtPUB10 y AtPUB11, lo que permite asumir que poseen mecanismos de acción semejantes, aunque las funciones puedan diferir tanto tisular como temporalmente.

Las AtARMs muestran diferentes patrones de expresión proteica en función del tratamiento aplicado, aunque sólo GA favorece la interacción polen-estigma

Tal como ha sido propuesto por Coates (2007), las proteínas ARM participan en las vías de señalización por GA y ABA, funcionando como ligasas de ubiquitina E3 en diferentes procesos del desarrollo, regulando la degradación de proteínas que conduce a diversas respuestas celulares específicas. Un ejemplo de proteína ARM que participa en las vías de señalización hormonal es PHOR1 que, como ya se describió previamente, funciona como ligasa de ubiquitina E3, regulando el proceso que promueve la acumulación de sustancias de reserva, como el almidón (Amador y col., 2001), en estrecha relación con la vía de señalización por GA (Zawaski y col., 2012). Asimismo, ARIA es una proteína ARM de *A. thaliana* que actúa como regulador positivo de respuesta a ABA, modulando la actividad transcripcional del factor de transcripción ABF2. En respuesta al estrés salino se han identificado aumentos transcripcionales de genes que codifican para proteínas ARMs involucradas en la degradación de proteínas por ubiquitinación en los que a las 6 h posteriores al estrés con NaCl, se activa la expresión génica de BG55, una proteína ARM que estaría actuando como ligasa de ubiquitina E3 (Banzai y col., 2002). Teniendo en cuenta estos antecedentes en los que se estudiaron proteínas ARMs bajo diferentes condiciones, como parte de este trabajo se propuso la evaluación en el tejido floral de los patrones de expresión proteica bajo diferentes

tratamientos hormonales y de estrés salino. Los resultados permitieron detectar tres grupos correspondientes a rangos de pesos moleculares distintos: el grupo A (de 73 a 80 kDa), al cual pertenecen 6 AtARMs; el grupo B (de 58 a 66 kDa) donde se encuentran 11 AtARMs el y grupo C (de 34 a 41 kDa) con 10 AtARMs. Los resultados sugirieron que la expresión de estas proteínas AtARMs responden diferencialmente al agregado de GA, ABA y NaCl, dado que las AtARMs del tejido floral clasificadas en los grupos A y B pudieron ser inmunolocalizadas en todos los tratamientos, las agrupadas en el restante (grupo C), sólo fueron detectadas por inmuno *blots* bajo condiciones de tratamiento hormonal y estrés salino.

Con el objetivo de hallar evidencias funcionales que permitiesen relacionar el grupo de proteínas AtARMs detectadas en los *western blots* con el mecanismo de adhesión polen-estigma, se realizó el ensayo de polinización en todas las condiciones mencionadas. Los resultados más notables de dichos ensayos se verificaron bajo la acción de GA. En estos se comprobó un aumento significativo del número de granos de polen adheridos y penetrantes. Tal como ha sido ampliamente aceptado, entre los diversos eventos fisiológicos regulados por GA, el desarrollo y funcionalización de las estructuras reproductivas, constituye uno de los acontecimientos más importantes (Pharis y King, 1985). Los resultados obtenidos en los experimentos de la presente tesis, permitieron comprobar que el agregado exógeno de GA provoca una estimulación de la interacción polen-estigma, provocando un aumento significativo del número de granos de polen germinados, actuando como regulador positivo del mecanismo de polinización en *A. thaliana*. El efecto de GA en la interacción polen-estigma ya ha sido reportada y caracterizada en estudios previos en los que se demostró que en especies de *Brassica* autoincompatibles, el agregado de esta hormona y otros reguladores del crecimiento, provoca la transformación a un mecanismo de autocompatibilidad (Hiratsuka y col., 1984; Kashyap y Gupta, 1989). Adicionalmente, Goto y Pharis (1999) mostraron que el desarrollo normal de los estambres de *Arabidopsis* requiere mayores concentraciones de GA, que los demandados para el desarrollo de otros órganos florales. Así, mutantes deficientes en GA o en la vía de transducción de señales mediadas por GA, típicamente exhiben estambres cortos, como resultado de la reducción de la extensión de células dentro del

filamento, de modo que la autopolinización se ve comprometida (Cheng y col., 2004). Estudios más recientes también indican que las GAs están involucradas tanto en la viabilidad del polen como en el crecimiento del tubo polínico en *Arabidopsis* y en el arroz (Singh y col., 2002; Chhun y col., 2007). En esta última especie, la aplicación exógena de GA revirtió significativamente la macho-esterilidad causada por bajas temperaturas, mientras que la aplicación exógena simultánea de GA con sacarosa mejora sustancialmente el grado de desarrollo normal del polen (Sakata y col., 2014). Estos antecedentes, concuerdan con los ensayos de polinización realizados en el presente trabajo, tal como lo reflejan los aumentos significativos del número de granos de polen depositados.

En diversas especies, los roles de las GAs bioactivas (GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇) han sido identificados y determinados en eventos posteriores a la fecundación, formación y desarrollo del fruto (Yuda y col., 1981; Zhang y col., 2005; Zhang y col., 2007). Los estudios de Kato y col., 2010 sugieren que la vía de señalización por GA puede regular el crecimiento del tubo polínico, tanto en *Arabidopsis* como en arroz. Asimismo, se ha probado que el estigma y el estilo están sujetos a regulación por GA, vía mediación de proteínas DELLA (Harberd, 2003; Eckardt, 2007; Fuentes y col., 2012). En función de estos antecedentes, se postuló que las variaciones en los perfiles de expresión de proteínas AtARMs en las plantas sometidas a tratamiento por GA, podrían deberse a la activación de mecanismos que favorecen y refuerzan la autopolinización en los que participarían este conjunto de proteínas.

Se ha postulado que la regulación mediada por GA de proteínas DELLA, constituye un requisito clave para el crecimiento óptimo de los tejidos florales y para garantizar la eficiencia de la fecundación (Fuentes y col., 2012). No obstante estos trabajos, otros autores sostienen que en la activación de la expresión génica de la vía DELLA, puede no ser crítica, ya que reportes recientes basados en genotipos mutantes de tomate, permiten postular que la vía de señalización por GA, resulta en esta especie, independiente de estas (Livne y col., 2015).

Al presente, existen escasos antecedentes disponibles que permitan determinar el rol de las GAs en los eventos previos a la fecundación en *A. thaliana*. La expresión de las proteínas AtPUB-ARMs: AtPUB16, AtPUB19, AtPUB2 y en menor medida AtPUB11 es

inducida bajo tratamiento con GA, constituyendo uno de los primeros antecedentes que permiten sugerir un mecanismo previo relacionado con la activación de su expresión génica, en una especie autocompatible como *A. thaliana*. Tal hallazgo fue posteriormente corroborado en esta tesis con los estudios de RT-*sq*PCR y *q*PCR, utilizando cepas salvajes y mutantes para *AtPUB16* y el receptor de GAs, *GID1A*.

En relación con los bioensayos realizados para evaluar posibles efectos del ABA en una especie autocompatible, se verificó que el agregado de esta hormona produce una disminución extremadamente significativa del número de granos de polen adheridos y penetrantes en relación con las condiciones normales de crecimiento. Al presente, no se han reportado estudios que permitan relacionar esta hormona con el proceso de autocompatibilidad en plantas SC. De acuerdo a los resultados obtenidos esta fitohormona estaría implicada en mecanismos que de algún modo inhiben el proceso de autopolinización o al menos interfieren el contacto polen-estigma en esta especie. Si bien no hay una base racional para sugerir que pueda participar en el rechazo de polen propio, su participación en vías de rechazo podría estar relacionada con mecanismos de senescencia floral. Aún no ha sido dilucidada la integración de la vía de señalización por ABA para dirigir las respuestas al estrés abiótico y biótico relacionados con la muerte celular programada y la senescencia (Christmann y col., 2006). Aunque se ha detectado que la aplicación exógena de ABA a ciertas flores acelera la senescencia de la flor, mostrando una relación inversa entre niveles de ABA y edad floral (Borochoy y Woodson, 1989). Una de las pruebas complementarias realizadas en la presente tesis fue el analizar los perfiles de expresión génica de la calosa sintasa *Cal5S*. En dichos estudios se verificaron incrementos significativos de esta enzima en los tejidos florales de las plantas tratadas con ABA. Por otra parte estos hallazgos fueron reforzados en el ensayo de polinización, ya que en estos estudios se detectaron depósitos de calosa en el interior de las papilas estigmáticas, emulando los mecanismos de rechazo del polen propio (Goring, 2000; You y col., 2010). Al presente no existen antecedentes de otros grupos de investigación que hayan indagado el posible efecto del tratamiento con ABA en el proceso de autofecundación en *A. thaliana* y el significado de estos experimentos aún no resulta claro y de alguna manera podrían ser considerados contradictorios. Sin embargo, en los estudios de RT-

sqPCR, se verificó que en las plantas tratadas con ABA, las proteínas putativas AtPUB19, AtPUB2 y FL17 exhiben incrementos significativos de expresión génica. AtPUB19 es una ligasa de ubiquitina E3 que ha sido implicada en la regulación negativa de las respuestas a la sequía mediadas por ABA (Liu y col., 2011; Seo y col., 2012). Para AtPUB2 y FL17 aún no han sido postulados roles biológicos. Los resultados de la presente tesis sugirieren una posible participación de dichas AtARMs en la activación de mecanismos de senescencia floral luego de la autopolinización. Se sabe que el éxito de la polinización es tal vez el factor externo más determinante en la afectación de la senescencia floral, mecanismo que se induce cuando se produce un depósito reducido de granos de polen sobre el estigma en flores polinizadas. Mientras que la SI resulta en una polinización ineficaz, no habiendo senescencia del tejido floral, el reconocimiento del polen propio del no propio y el rechazo del primero, resulta esencial en la senescencia inducida por polinización (Jordan, 2006). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado por Stead (1992) y van Doorn (1997) y es el resultado de eventos altamente coordinados que comienzan con la germinación del polen sobre el estigma y conducen a cambios que provocan la incapacidad del tubo polínico para alcanzar el ovario (Jordan, 2006). Así, la falla de fecundación constituye uno de los factores que induce la senescencia floral, proceso que se desencadena como consecuencia de muchos tipos de estreses abióticos (Tripathy y Tuteja, 2007). En el presente trabajo de tesis, se ha determinado la presencia de calosa en las papilas del estigma, como respuesta al tratamiento mediado por ABA, impidiendo el ingreso del tubo polínico al tracto de transmisión, evitando así la fecundación de los óvulos.

La sobreexpresión de *AtPUB19*, observados por la aplicación ectópica de esta fitohormona, podría constituir una respuesta al alterar los fenómenos de senescencia floral en este modelo.

El estrés salino evaluado no modificó los niveles de expresión de los grupos de proteínas AtARMs detectadas por *western blot*. Asimismo, en los test de polinización de las plantas tratadas con NaCl, no se observan diferencias significativas respecto de los controles no tratados, por lo que se concluyó que este no tendría implicancias sobre la interacción polen-estigma, a diferencia de lo observado por Banzai (2002)

donde la expresión de proteínas PUB-ARMs en otras especies se modifica en función del estrés salino aplicado.

El agregado exógeno de GA induce significativamente la expresión génica de AtPUB16, AtPUB19 y AtPUB2

En paralelo con los estudios de expresión proteica y los funcionales de polinización, en la presente tesis se estudiaron los niveles de expresión génica de proteínas AtARMs putativas, predichas en los estudios bioinformáticos. Los genes analizados fueron aquellos que codifican para AtARMs filogenéticamente cercanas a BnARC1 (AtPUB17, AtPUB16, AtPUB19, AtPUB10 y AtPUB11). Las proteínas putativas más relacionadas filogenéticamente con BnARC1: AtPUB17, AtPUB16 y AtPUB19 se encuentran en el grupo A de las AtARMs detectadas por *western blot*, junto con AtPUB2, AtPUB5 y Fl17.

Estos estudios se llevaron a cabo tanto en condiciones normales de crecimiento como en plantas sometidas al agregado exógeno de ABA, GA y NaCl, dado que como se indicó precedentemente, se ha probado que el UPS involucra las proteínas PUBs-ARMs que en diferentes especies se expresan bajo condiciones de estrés abiótico (Banzai y col., 2002; Coates, 2006; Samuel y col., 2009).

Del análisis del conjunto de proteínas AtARMs previamente descrito, se seleccionaron las AtPUB-ARMs para estudiar los niveles de expresión génica fundados en la base de datos de microarreglos de *eFP Browser* (www.bar.utoronto.ca) que presenta resultados en condiciones normales de crecimiento y bajo tratamiento hormonal y estrés salino en estadio de crecimiento 1.0 (cotiledones completamente abiertos, Boyes y col., 2001) (Figura 56). Dichos reportes fueron comparados con los datos obtenidos en el presente trabajo de tesis por RT-*sq*PCR en tejido floral. Los resultados utilizando dicha base de datos, demostraron que el grupo de genes para las AtPUB-ARMs estudiadas en este trabajo, tienen una expresión diferencial, dependiendo del tratamiento evaluado. En concordancia con lo observado en los experimentos de este trabajo, *AtPUB17* no muestra diferencias significativas en los niveles de expresión génica en condiciones normales de crecimiento comparadas con el tratamiento hormonal y estrés salino utilizando microarreglos, así en ambos estudios se muestra que ni las hormonas ni el estrés salino modificaron los niveles de expresión génica para este gen. De acuerdo a estos resultados, se concluyó que esta proteína no estaría

involucrada en los procesos de interacción polen-estigma bajo las condiciones evaluadas.

En relación a *AtPUB16*, de acuerdo con los datos de microarreglos, se verifica que sólo el tratamiento hormonal con GA provoca un significativo aumento de su expresión génica en la planta completa (no se discrimina el tejido reproductivo), luego de una hora de tratamiento con la fitohormona sin mostrar diferencias significativas bajo tratamiento con ABA y NaCl (Figuras 56a y 56c). Así, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis mediante RT-*sq*PCR en tejido floral permitieron verificar que la expresión génica de *AtPUB16* se induce significativamente por GA, resultando concordantes y ampliatorios con los resultados detectados con el *eFP Browser*.

Los niveles de expresión génica para *AtPUB19* utilizando la base de datos *eFP Browser* mostraron un aumento significativo frente en plantas tratadas ABA (1 y 3 h posteriores al tratamiento, hpt), con GA (0,5 y 1 hpt), y con NaCl (3 hpt en vástago y 6 hpt en raíz). En los resultados obtenidos en el presente trabajo, pudo detectarse que las condiciones evaluadas aumentan significativamente la expresión génica de *AtPUB19* en tejido floral, en concordancia con los resultados obtenidos por microarreglos. La expresión génica de *AtPUB19* se incrementa en raíces de las plantas sometidas a estrés salino y en plántulas bajo tratamiento hormonal con ABA y en menor proporción con GA (Yee y col., 2009). *AtPUB19* pertenece a la clase II de proteínas PUBs de *Arabidopsis* las cuales contienen un dominio U-box seguido de hasta cinco potenciales repeticiones ARM (Azevedo y col., 2001) y podría participar en vías de señalización como ligasa de ubiquitina E3 mediando en la regulación de la germinación de la semilla (Dong y col., 2006; Bergler y Hoth, 2011; Liu y col., 2011; Seo y col., 2012).

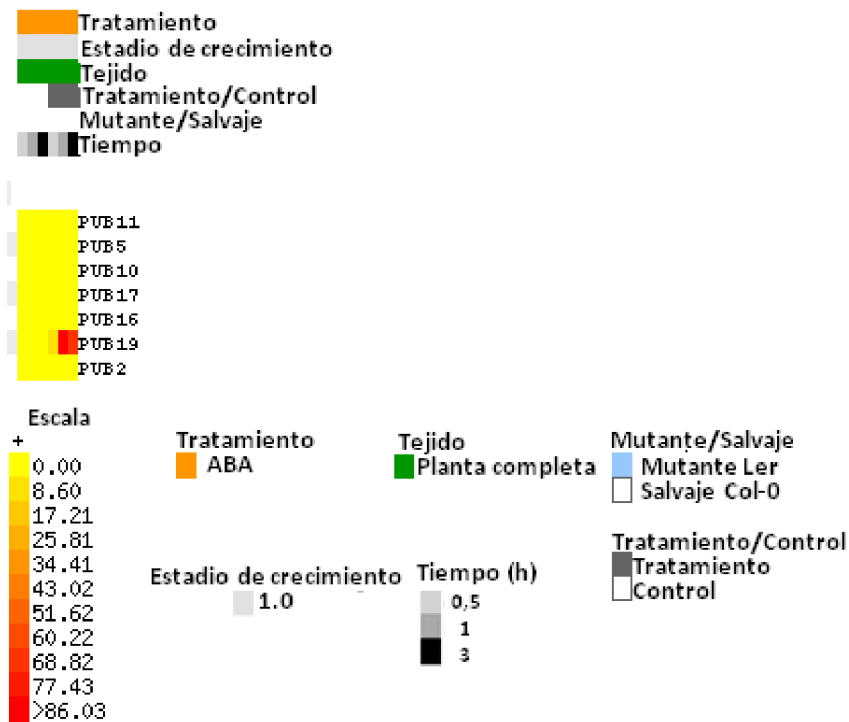


Figura 56: Perfiles de expresión génica utilizando microarreglos para genes *AtPUB-ARM*: *AtPUB16*, *AtPUB17*, *AtPUB19*, *AtPUB5*, *AtPUB2*, *AtPUB10* y *AtPUB11* bajo estrés abiótico hormonal y salino: ABA, GA y NaCl. Los *Heat Maps* o *Northern* electrónicos fueron generados a partir de los datos colectados de la base de datos pública *AtGenExpressConsortiumdata sets* (Kilian y col., 2007; Goda y col., 2008) disponible a través del *Expression Browser tool* (Toufighi col., 2005) del BAR (www.bar.utoronto.ca). La escala de color indica los niveles absolutos de expresión (promedio de las replicas bajo estrés relativo al promedio de las replicas control). **(A) Perfiles de expresión de las *AtPUBs* de plantas completas en respuesta a ABA. Luego de 7 días de luz continua las plantas fueron analizadas a las 0,5, 1 y 3 h después del tratamiento con ABA 10 μ M (cada bloque corresponde a un tiempo, de izquierda a derecha). Los datos fueron obtenidos a partir del *AtGenExpress Hormone Series* (Goda y col., 2008).**

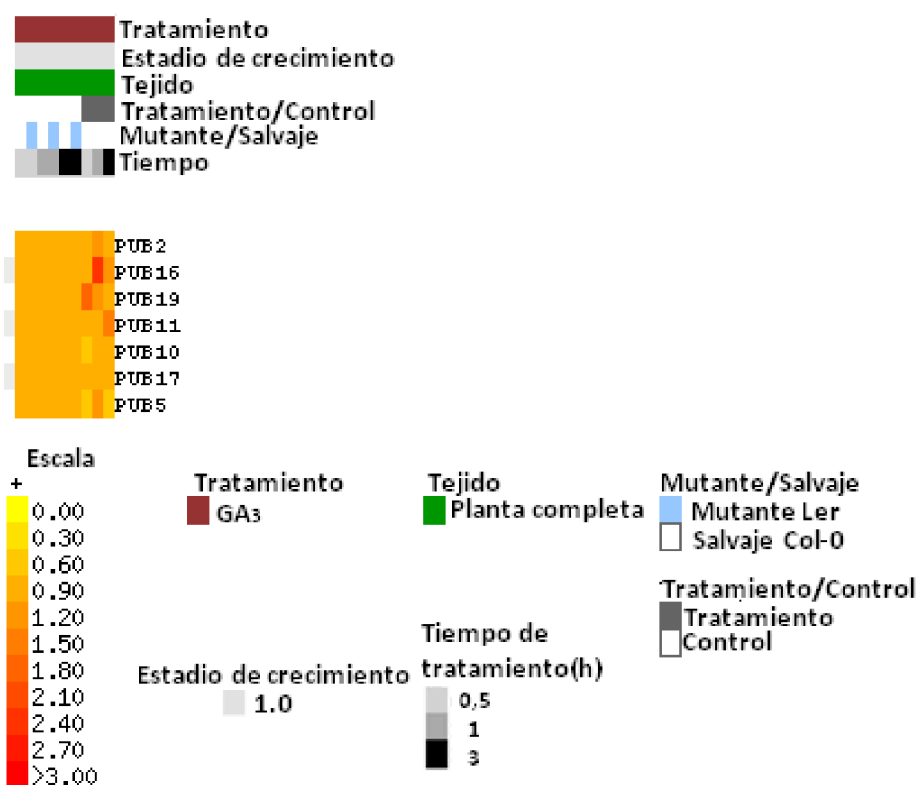


Figura 56 (B) Perfiles de expresión de las AtPUBs de plantas completas en respuesta a GA. Luego de 7 días de luz continua las plantas fueron analizadas a las 0,5, 1 y 3 h después del tratamiento con GA 1 μ M (cada bloque corresponde a un tiempo, de izquierda a derecha). Los datos fueron obtenidos a partir del *AtGenExpress Hormone Series* (Goda y col., 2008).

Para *AtPUB10* y *AtPUB11* los resultados de expresión génica de la base de datos muestran que el primero disminuye su expresión génica con GA y el segundo aumenta sus niveles de expresión frente al mismo tratamiento, sin mostrar diferencias con ABA y NaCl respecto del control sin tratamiento para ambos genes. Los resultados de la presente tesis mostraron tendencias semejantes, detectándose una disminución de *AtPUB10* frente a GA y un aumento de *AtPUB11* frente a la misma condición. Mientras que para ABA y NaCl, tampoco se detectaron diferencias significativas respecto del control sin tratamiento, de acuerdo con lo observado en los resultados con microarreglos. Debido a las respuestas detectadas para ambas proteínas en el tejido floral, se considera que este nuevo resultado descriptivo, deberá ser profundizado en futuros trabajos funcionales, para intentar lograr dilucidar su rol en la fisiología de *A. thaliana*. Aún con estas restricciones, estos hallazgos constituyen un aporte original respecto de estas AtPUB-ARMs en los tejidos reproductivos.

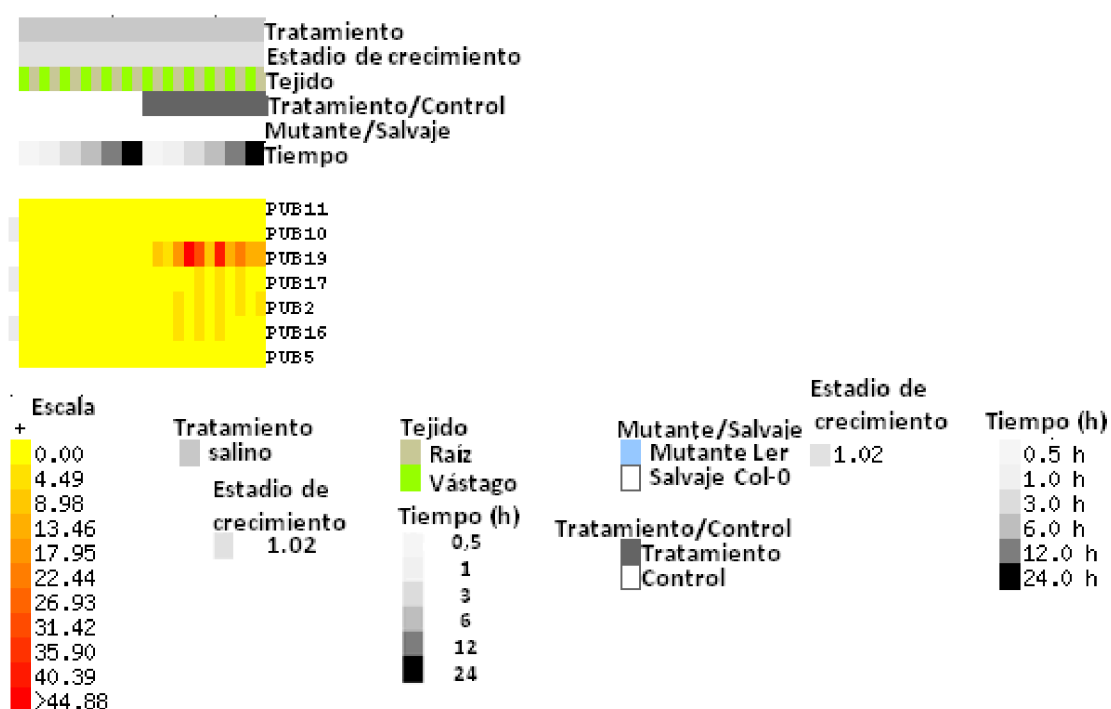


Figura 56 (C) Perfiles de expresión de las AtPUBs de plantas completas en respuesta a estrés salino. Vástagos y raíz de plantas crecidas 18 días fueron analizadas luego de 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h de tratamiento (cada bloque corresponde a un tiempo diferente, de izquierda a derecha) adicionando NaCl 150 mM al medio de crecimiento. Los datos fueron obtenidos del *AtGenExpress Abiotic Stress Series* (Kilian y col., 2007) perteneciente al BAR.

Finalmente, los niveles de expresión génica de *AtPUB5* y *AtPUB2* también fueron evaluados y comparados con la base de datos *eFP Browser*. Allí pudo observarse que bajo acción de GA los niveles de expresión génica de *AtPUB5* disminuyen tal como fue detectado por los experimentos de RT-*sqPCR* en este trabajo. Para *AtPUB2* se detecta aumento de la expresión génica en plantas tratadas con GA utilizando microarreglos, emulando los resultados del presente trabajo. Sin embargo, para ambos genes, no se detectan diferencias con el control sin tratamiento en los resultados por microarreglos bajo acción de ABA y estrés con NaCl. No obstante, en el tejido floral evaluado en el presente trabajo, se observó una disminución de la expresión génica para *AtPUB5* y un aumento de la misma para *AtPUB2* tanto en los tratamientos con ABA como en los estresados con NaCl, hecho que fue observado en los resultados por RT-*sqPCR*. En relación con *AtPUB2*, la información disponible es sumamente escasa, aunque por homología se ha propuesto que, también tendría una función como ligasa de ubiquitina E3 en respuesta a patógenos (Ascencio-Ibanez, y col., 2008). Estos resultados son coincidentes con los verificados por microarreglos en los que ésta

molécula, muestran incrementos de su expresión génica en presencia de infecciones por patógenos, o en respuesta a inductores derivados de los mismos (Yee y col., 2009) así como también bajo tratamiento con ABA y estrés salino en raíz (Yee, 2011). Para *AtPUB5* no existen antecedentes disponibles pero por su homología funcional y su cercanía filogenética con PUBs de diferentes especies de *Brassica* (Indriolo y col., 2012), se postula que esta proteína sería una ligasa de ubiquitina E3.

Los datos de expresión génica disponibles por microarreglos para las AtPUB-ARMs bajo las condiciones evaluadas (hormonal y salino) corresponden a un estadio del desarrollo previo al tejido floral evaluado en la presente tesis (Toufighi y col., 2005; Yee y col., 2009). Por lo que el estudio de la expresión génica de las AtPUB-ARMs de este trabajo, significa un aporte original para la caracterización funcional de esta súperfamilia de proteínas, ya que en flores sometidas a tratamiento con ABA, GA y NaCl no existen datos relevantes. Asimismo, no existen antecedentes sobre estudios de expresión génica del conjunto de proteínas AtPUB-ARMs con un posible rol en la etapa de adhesión, reconocimiento y posterior aceptación del polen propio en especies SC.

Uno de los resultados más destacables, fue el incremento significativo de la expresión génica de *AtPUB16* en plantas sometidas aGA, sugiriendo una respuesta directa frente al agregado exógeno de esta hormona. Asimismo, teniendo en cuenta su relación filogenética con BnARC1, luego de *AtPUB17*, se encuentra *AtPUB16*. Adicionalmente, teniendo en cuenta que el grupo de proteínas AtARMs donde se localiza *AtPUB16* aumentó sus niveles de expresión bajo GA en los estudios por *western blot*, y que este mismo tratamiento hormonal mostró un aumento de granos de polen adheridos/penetrantes por estigmas en los ensayos de polinización, *AtPUB16* se convierte en la proteína putativa candidata a ser caracterizada.

Por lo anteriormente expresado, resulta de gran interés abordar estudios sobre la posible participación de AtPUB-ARMs en mecanismos de adhesión celular en plantas, tales como el proceso de polinización en especies SC, para las cuales no se cuenta con antecedentes disponibles.

De manera particular, se analizó la expresión génica de *AtPUB16* por microarreglos utilizando la base de datos del eFPBrowser. Como puede observarse en la figura 57, la

expresión génica en condiciones normales de crecimiento se detecta sólo en raíz, mientras que bajo tratamiento (Figura 58) se muestran pictogramas prácticamente sin diferencias. Sólo se conocen estos perfiles de expresión génica bajo diferentes tratamientos para estadios tempranos del desarrollo, como se describió previamente. Por lo que este trabajo de tesis realiza un primer abordaje de la expresión génica de las AtPUB-ARMs en tejido floral bajo tratamiento hormonal y estrés salino.

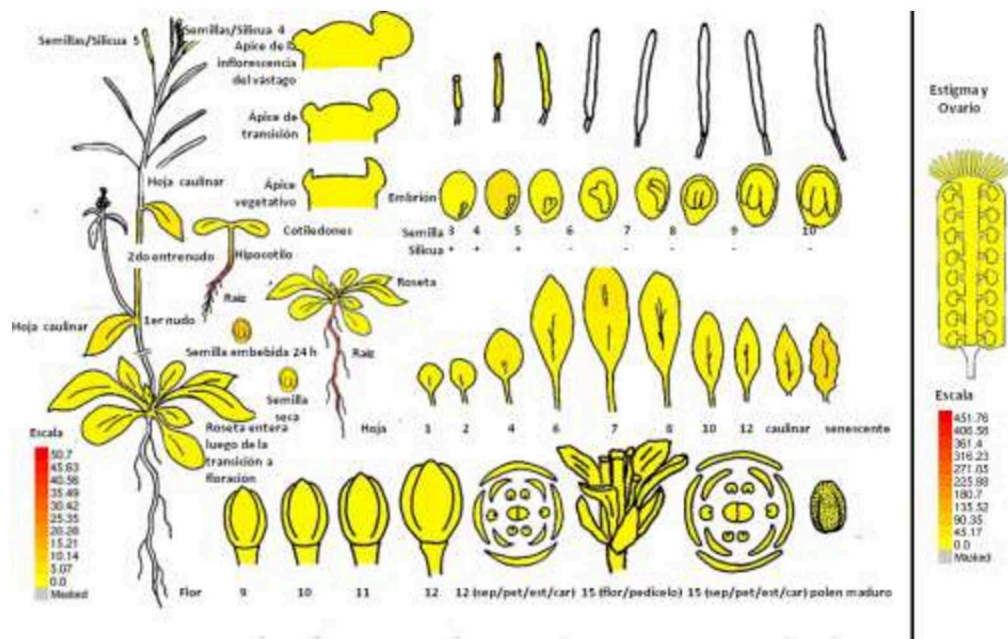


Figura 57: Representaciones esquemáticas de los patrones de expresión absoluta de la serie de desarrollo vegetal de *A. thaliana*. Los resultados fueron generados con el ArabidopsiseFP Browser utilizando la base de datos *The Bio-Analytic Resource* (BAR: www.bar.utoronto.ca). Los números indican el estadio de desarrollo y la escala la expresión absoluta en cada tejido: embrión, semilla (seca e hidratada: Nambara lab <http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentpage.pl?experimentid=183>), silicuas, hojas, rosetas, raíz, hipocotilo, cotiledones y flor. Abreviaturas: sep: sépalo; pet: pétalo; est: estambre y car: carpelo. Se muestra a la derecha el patrón de expresión génica de *AtPUB16* en condiciones normales de desarrollo en estigma y ovario, con su escala correspondiente en la parte inferior.

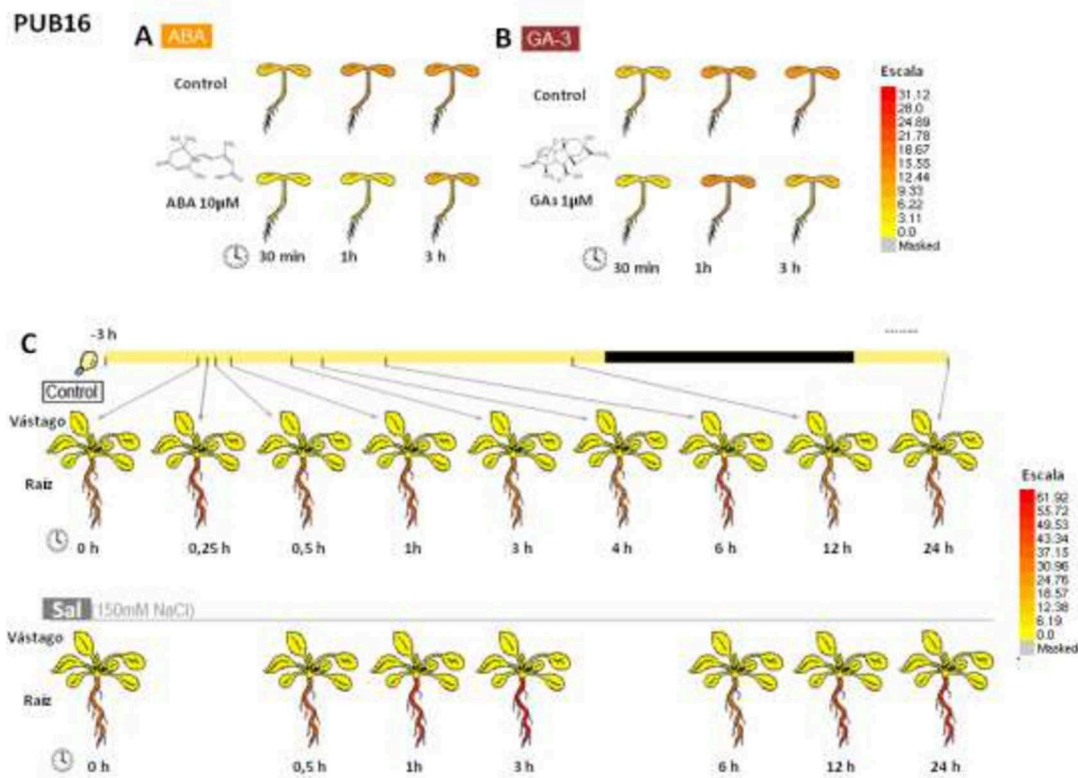


Figura 58: Patrones de expresión génica de *AtPUB16* (A) y (B) en respuesta al tratamiento hormonal y (C) en respuesta a estrés salino. Las representaciones esquemáticas de las expresiones a partir del set de datos de la serie de tratamientos (Kilian et al., 2007) fueron generados con el *Arabidopsis eFP Browser* utilizando la base de datos *The Bio-Analytic Resource* (BAR: www.bar.utoronto.ca). Sólo se cuenta con datos a partir de los cambios en la expresión génica en los tejidos de vástago y raíz a los 18 días después de la adición de ABA 10uM, GA₃ 1 uM y NaCl 150 mM al medio de cultivo. Los valores absolutos se muestran en cada una de las escalas para ambas condiciones (con y sin tratamiento).

LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL RECEPTOR QUINASA ARK3 NO SE MODIFICA FRENTE A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS, MIENTRAS QUE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE EXO70A1 RESULTA DEPENDIENTE DE GA

El receptor ortólogo de SRK (caracterizado en especies de *Brassica*), de *A. thaliana* es receptor quinasa ARK3. Por esta razón, se postularon funciones similares relacionadas con la interacción y fosforilación de proteínas AtPUB-ARMS, homólogas a BnARC1 en *A. thaliana*, (Samuel y col., 2008; Xing y col., 2013). Así, resultó de interés estudiar su expresión génica hipotetizándose que podría constituir un posible activador de las AtARMS vía su fosforilación. El que los niveles de expresión de ARK3 sean similares en todas las condiciones evaluadas (esto es, no se verifican diferencias significativas bajo

tratamiento comparado con los controles normales) impide postularlo concluyentemente como receptor específico de las AtARMs. Sin embargo, dado que los niveles de expresión son relativamente elevados en todas las condiciones evaluadas, no puede descartarse la posibilidad que la regulación de la expresión génica de este receptor, tenga un *timing* diferente del de las proteínas AtARMs, con las que podría interactuar. Actualmente algunos autores proponen una conversión génica en el dominio quinasa de SRK dando origen a ARK3, promovido por modificaciones evolutivas del receptor transmembrana que conducen a la producción de nuevas especificidades de sustratos (Guo y col., 2011; Yamamoto y Nishio, 2014). De acuerdo con esto y teniendo en cuenta que nuestros resultados mostraron que ARK3 se expresa en tejido floral independientemente del tratamiento al cual se somete a las plantas, ARK3 podría constituirse en un activador de nuevos sustratos (AtARMs) vía fosforilación.

En la cascada que se intentaba dilucidar, EXO70A1 podría considerarse como una posible molécula blanco para cualquiera de los genes putativos estudiados que mostraron respuesta significativa ante el tratamiento con GA (AtPUB16, AtPUB19, AtPUB2). Aunque en este caso no se cuenta con datos de la expresión génica por microarreglos, se ha reportado que EXO70A1 se ensambla con las subunidades restantes del complejo de exocitosis para reclutar las vesículas secretoras (Zarsky y col., 2013), en dichas estructuras, las proteínas SNARE median la fusión de las vesículas a la membrana plasmática y la proteína cargo ACA13, recientemente caracterizada (Iwano y col., 2014) interviene en la hidratación del polen propio y posterior entrada del tubo polínico a través de la pared celular de la papila estigmática. De acuerdo con estos hallazgos, es probable que las AtARMs que se expresan significativamente bajo tratamiento con GA, impidan la degradación o inactivación de EXO70A1, blanco involucrado en la aceptación del polen SC. De este modo, dichas proteínas podrían actuar modulando la concentración y actividad de otras proteínas reguladoras. Para probar esta hipótesis, en trabajos futuros, que exceden los objetivos planteados en este trabajo de tesis, se deberían evaluar posibles mecanismos de interacción entre ambas moléculas, así como la posible translocación a la vía proteosomal para su degradación final.

LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE *AtPUB8* AUMENTAN LA SC EN GENOTIPOS DE *A. THALIANA*

Como se analizó en la introducción, la ruptura de la barrera de polinización en flores autoincompatibles es un fenómeno conocido como pseudo-autocompatibilidad o SI transitoria. Dicho fenómeno ha sido descrito como una estrategia de aseguramiento reproductiva que le permite a estas plantas autofecundarse, una vez que se han agotado las oportunidades de cruzamiento (Nasrallah y Wallace, 1968; Levin, 1996; Good-Avila y Stephenson, 2002; Barrett, 2002; Vallejo-Marin y Uyenoyama, 2004; Kalisz y col., 2004; Goodwillie, y col., 2005; Brennan y col., 2005; Mable y col., 2005). La pseudo-autocompatibilidad en la naturaleza, prevalece como una estrategia de apareamiento mixto, pero los mecanismos moleculares subyacentes son desconocidos. *A. thaliana*, pese a ser una especie autocompatible, presenta una variación críptica natural de pseudo-autocompatibilidad, que fue descubierta por transformación de diferentes líneas con los genes *SRK* y *SCR* de su especie hermana *A. lyrata* (autoincompatible) (Nasrallah y Nasrallah, 2002; Nasrallah y col., 2004). En dichos trabajos se determinó que *AtPUB8* funciona como una ligasa de ubiquitina E3 que regula los transcritos del receptor quinasa *SRK* e interviene en el proceso de pseudo-autocompatibilidad (PSC) dependiente de la edad floral (Liu y col., 2007). Los estudios de Tsuchimatsu y col., (2010) observaron variaciones en la manifestación de las respuestas de SI reconstituidas en diferentes ecotipos de *A. thaliana*, que exhibían un debilitamiento de la respuesta SI debido al añejamiento de las flores (PSC).

Dado que *A. thaliana* es una especie SC, se hipotetizó que *AtPUB8* podría estar involucrada en mecanismos que difieren de la regulación de transcritos de *SRK* verificada en *A. thaliana* transgénicas, o en ecotipos en los que los genes para *SRK* y *SCR*, se mantienen intactos, no como pseudo-genes como ocurre en Col-0. Los estudios de Liu y col., (2007), mostraron que en *A. lyrata AtPUB8* es de expresión ubicua, aunque lo hace preferencialmente en el estigma. En este sistema *AtPUB8* actuaría indirectamente regulando los niveles de transcripción de *SRK*, ubiquitinando un factor requerido para la transcripción o para la estabilidad del transcripto, ya sea provocando su degradación o promoviendo su redistribución subcelular (Schnel y Hicke, 2003). En función de estos antecedentes, en la presente tesis se analizó la expresión de *AtPUB8*

tanto en tejido floral, como foliar, en *A. thaliana* y *A. lyrata* tanto en plantas crecidas en condiciones normales, como sometidas a GA.

Estos experimentos mostraron que GA, no provoca cambios significativos de la expresión génica de *AtPUB8* en condiciones de SI, en relación a las condiciones normales de crecimiento. Por el contrario, en *A. thaliana* se verifica un aumento significativo de la expresión génica de *AtPUB8* frente al agregado de GA. Ya que *A. thaliana* es una especie autocompatible, dicho incremento podría significar un reforzamiento del proceso de SC en estigmas de esta especie.

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES REPRODUCTIVAS DE LAS PLANTAS MUTANTES PUB16

En función que de las AtPUB-ARMs evaluadas en las distintas etapas de esta tesis AtPUB16 emergió como la molécula clave del proceso y cuya expresión se ve influenciada significativamente por GA, en la última etapa del presente trabajo se procedió a evaluar un mutante *loss of function* para dicha molécula. Como parte complementaria de este trabajo, se realizó la caracterización fenotípica de la mutante *pub16*, dado que no se dispone de datos fenotípicos sobre dicho genotipo. Los datos obtenidos mostraron que entre las plantas salvajes y las mutantes no hubo diferencias significativas respecto a los parámetros relacionados con el desarrollo (número de hojas finales, radio de roseta y longitud del tallo) alcanzado para ambos tratamientos (-GA y +GA). Por lo que puede sugerirse que *AtPUB16* no tiene una implicancia directa en el desarrollo vegetativo de la planta. Cuando se analiza el efecto entre tratamientos pudo detectarse que GA afecta el desarrollo del tallo adelantando el proceso de floración, dando lugar a la formación de plantas de menor talla promedio.

Respecto de las variables reproductivas estudiadas, los datos obtenidos muestran retardos en la floración de las plantas mutantes, pero se observa respuesta a GA adelantado la floración. Asimismo para *pub16* se observó una reducción del 20% en el número de silicuas, 36% en la longitud de las mismas y un 60% en el número de semillas por silicua, mostrando que *pub16* tendría alguna implicancia en estos aspectos reproductivos.

Esta caracterización aporta resultados aún no documentados para la mutante *pub16* de *A. thaliana*. De acuerdo a los parámetros evaluados, AtPUB16 podría tener alguna

participación en los mecanismos de polinización, ya que todas las variables reproductivas fueron afectadas. Asimismo, dado que la longitud de radícula fue el único parámetro vegetativo que mostró una disminución significativa, es posible que AtPUB16 tenga alguna participación en mecanismo de ubiquitinación de proteínas en los procesos de desarrollo y extensión de raíz, tal como fue propuesto por Libault y col. (2007).

LOS NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ATPUB16 NO MUESTRAN VARIACIÓN FRENTE AL AGREGADO DE GA EN LAS MUTANTES *PUB16* Y *GID1A*

En esta última etapa el análisis se realizó utilizando la técnica de *real time* PCR (RT-*q*PCR), la cual posee mayor sensibilidad de detección que la técnica de PCR de punto final convencional, es más rápida y disminuye el riesgo de falsos negativos. Dado que los datos son tomados en la fase exponencial del proceso, se garantiza que ninguno de los componentes de la PCR sea limitante del proceso de amplificación. Asimismo es una técnica que posee menos probabilidad de contaminación, con lo que disminuyen los falsos positivos (Higuchi y col., 1993; Freeman y col., 1999; Raeymaekers, 2000).

Los perfiles de expresión génica se evaluaron tanto en genotipos de *A. thaliana* salvajes como mutantes para el gen *pub16* y mutantes para el receptor de GA presente en pistilo, *gid1a*, bajo tratamiento hormonal con GA, el cual sería el principal mediador para desencadenar la respuesta de reforzamiento de la SC en *A. thaliana*.

Dichos estudios permitieron verificar que, en las plantas salvajes, los niveles de expresión en las plantas crecidas en condiciones normales y tratadas con GA exhiben tendencias similares a las verificadas por RT-*sq*PCR. Sin embargo, dada la mayor sensibilidad de la técnica, se observa una amplificación de los valores de los niveles de expresión génica en genotipos salvajes sometidos al tratamiento. Así, en dichos estudios el nivel de expresión de *AtPUB16* exhibe un notable incremento en las plantas sometidas al tratamiento con GA respecto de las crecidas en condiciones normales. Dicha diferencia mostraba valores de 1,44 veces cuando se aplicó la RT-*sq*PCR. En la evaluación de los mutantes *pub16*, sometidos a las mismas condiciones experimentales, no se detecta expresión génica demostrando que *AtPUB16* constituye uno de los blancos principales de la activación por GA. En paralelo, el ensayo funcional

de polinización, permitió corroborar que los genotipos salvajes exhiben aumentos significativos en el número de granos de polen unidos a estigmas bajo tratamiento con GA, comparado con los estigmas polinizados en condiciones normales de crecimiento. Cuando se analizan los índices de polinización de las plantas *pub16*, tanto en condiciones control como sometidas a GA, se observa que en ambos casos se verifican un número mínimo de adhesiones polen-estigma, corroborando que GA participa en la activación mediada por AtPUB16 en los mecanismos de polinización. Así, en la presente tesis se aporta una sólida comprobación empírica que la actividad de GA actuaría potenciando los procesos de adhesión polen-estigma en *A. thaliana*, vía la intervención de AtPUB16.

Cuando se estudiaron los niveles de expresión génica de *AtPUB16* en las mutantes *gid1a* por RT-*qPCR*, se detectó que los índices de expresión génica disminuyeron en un 50%. Esto indicaría que AtPUB16 utiliza para activar su expresión génica al receptor GID1A, aunque no se puede descartar la utilización de los receptores GID1B y GID1C, redundantes funcionalmente con el primero, ya que se detectaron niveles de expresión génica de *AtPUB16* iguales a la mitad de los observados para las condiciones normales de crecimiento. Asimismo, el ensayo de polinización para las mutantes *gid1a* mostró un número significativamente menor de granos de polen germinados que los observados en el genotipo salvaje, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, con y sin GA.

Tomados en conjunto, estos resultados permiten postular un rol biológico clave de AtPUB16, en el proceso de polinización de las especies SC. Dicho mecanismo de activación sería potenciado por GA, y tendría como consecuencia el incremento de los contactos polen-estigma, sugiriendo la participación de GID1A como el posible receptor de giberelinas. AtPUB16 podría postularse como una proteína ARM con un dominio U-box que, en presencia de GA exógeno, aumenta el número de adhesiones polen-estigma, favoreciendo el mecanismo de polinización frente a dicho tratamiento hormonal.

LAS PROTEÍNAS AtARMS SE EXPRESAN EN ESTIGMAS DE PLANTAS SALVAJES DE *A. THALIANA* TRATADAS CON GA, EN RESPUESTA AL CONTACTO CON EL GRANO POLEN

Como se demostró previamente, del conjunto de proteínas AtARMS estudiadas en el presente trabajo de tesis, AtPUB16 y AtPUB2 activan su expresión génica *de novo* bajo tratamiento hormonal con GA, mientras que AtPUB19 y AtPUB11 aumentan sus niveles de expresión en presencia de este tratamiento.

Adicionalmente y con el objetivo de obtener evidencias morfológicas de la localización subcelular de las proteínas AtARMS, se evaluó su expresión proteica en flores tanto para plantas crecidas en condiciones normales de crecimiento, como sometidas a tratamiento con GA. Particularmente, fueron analizadas flores durante el contacto polen-estigma a través de estudios de IF. Las reacciones permitieron detectar proteínas ARM en genotipos de *A. thaliana* salvaje cuya expresión se incrementa significativamente cuando las plantas son sometidas al agregado de GA exógeno. Como se indicó previamente, los estudios sobre expresión génica en microarreglos (Yee y Goring, 2009) permitieron demostrar que las ligasas de ubiquitina E3 son reguladas por estreses abióticos (Lee y Kim, 2011). Estos resultados, tomados conjuntamente con los obtenidos mediante las técnicas de *western blot* y los ensayos de polinización permiten postular que el agregado de GA potencia la interacción polen-estigma en *A. thaliana*, promoviendo la activación de la expresión de proteínas ARM.

Los estudios de inmunofluorescencia permitieron demostrar que el tratamiento con GA provoca una reorientación de la gran vacuola central. Dicha estructura sufre un desplazamiento hacia el punto de contacto con el grano de polen, sugiriendo que esta interacción inicial en presencia de GA estimula la expresión de las proteínas involucradas en la vía de señalización que favorece al mecanismo de polinización. En presencia de GA, el interior de las papilas exhibe señal fluorescente cuya intensidad se incrementa en un 30% comparada con la observada en ausencia de GA. Estos datos resultan concordantes con los reportados por Samuel, (2008) para interacciones compatibles, donde la red vacuolar adopta una distribución semejante en el interior de la papila unicelular. Las reacciones permitieron demostrar la existencia de proteínas ARM que se expresan durante el contacto polen-estigma sólo cuando las plantas son tratadas con GA exógena. Aún cuando no existen anticuerpos específicos para

determinar específicamente la AtPUB-ARM detectada, todos los indicios desarrollados mediante los estudios bioinformáticos y de expresión génica, permitirían sugerir que AtPUB16 sería la principal candidata inducida por GA, la cual actuaría en su regulación positiva.

Utilizando microscópica electrónica tridimensional, Iwano y col. (2007) demostraron la estrecha asociación que existe entre el citoesqueleto de actina con la red vacuolar apical, detectando cambios en dicha red en las papilas estigmáticas de *Brassica*. Así, una vez que se han producido polinizaciones SC la red vacuolar se orienta hacia el sitio de contacto del polen, mientras que cuando se producen polinizaciones SI la red vacuolar en las papilas estigmáticas se observa alterada. La reorganización de los filamentos de actina y probablemente su despolimerización, están implicados en la respuesta SI de las células del estigma y se producen luego de la autofosforilación de SRK (Iwano y col., 2007). La polimerización de actina y la formación del haz de actina en la papila son eventos indispensables para la hidratación y la germinación del polen. Durante la respuesta SI, la reorganización de la actina y su despolimerización previenen la germinación del polen ya que el citoesqueleto de actina está implicado en el control de la función y de la estructura 3D de vacuolas en las células de la papila antes y durante la polinización propia y cruzada. Iwano y col. (2007) propusieron que estos cambios en la reorganización de los filamentos de actina estaban relacionados con la hidratación y el transporte de iones a los granos de polen compatibles, mientras se restringe el transporte hacia los granos de polen incompatibles. Estos cambios de la vacuola central también están vinculados a la dinámica de actina tanto en las polinizaciones compatibles como en las incompatibles. En relación con las primeras, se verifica que hay una acumulación de haces de actina en la región apical de la papila estigmática adyacente al grano de polen aproximadamente al inicio del contacto polen-estigma. En conjunto, estos datos sugieren que la autopolinización afecta la dinámica del citoesqueleto de actina, que conduce a cambios en la estructura vacuolar asociados con la hidratación y la germinación del polen (Iwano y col., 2004; Iwano y col., 2007), tal como pudo observarse en los resultados de IF obtenidos en el presente trabajo donde la reorientación vacuolar se observa como un evento posterior al contacto del grano de polen con el estigma.

LOS GENOTIPOS MUTANTES *PUB16* Y *GID1A* DE *A. THALIANA* NO EXPRESAN SIGNIFICATIVAMENTE PROTEÍNAS ATARM Y EL NÚMERO DE GRANOS DE POLEN ADHERIDOS POR ESTIGMA DISMINUYE

Con el objetivo de corroborar los hallazgos de expresión génica mencionados previamente donde se detectó una disminución de la expresión del gen *AtPUB16* en *pub16* y *gid1a*, se analizó, utilizando técnicas de IF, la expresión de proteínas ARM en ambos genotipos mutantes de *A. thaliana*, tanto en condiciones normales como en las plantas sometidas al tratamiento con GA durante el contacto polen-estigma. Como se describió previamente en la sección resultados, no se verificó expresión significativa de proteínas AtARM en el interior de las papilas, en los mutantes *pub16* y *gid1a* (ver descripción de ambas mutantes en Materiales y Métodos). Estos resultados, en primer lugar, permiten sugerir que AtPUB16 es la proteína responsable de la mayor parte de la fluorescencia detectada en los estigmas de las plantas salvajes ya que en mutantes para este gen, la señal IF disminuye un 90% en relación a los valores hallados en las plantas salvajes. En segundo lugar, estos estudios permiten postular que GID1A, podría ser el receptor de GA responsable de su internalización celular, ya que en mutantes para este gen la IF disminuye en valores cercanos al 80% sin que se verifiquen diferencias significativas entre las plantas crecidas bajo condiciones normales y las tratadas con GA. Esto indicaría que posiblemente sea el receptor GID1A el que estaría siendo utilizado por este tejido para el ingreso de GA a la papila estigmática. El hecho que se detecten niveles basales de marca fluorescente en las papilas de estas mutantes indica que hay otras proteínas ARM que se expresan independientemente de la presencia del tratamiento hormonal, en un porcentaje similar al observado para el genotipo salvaje sin GA.

Adicionalmente, el ensayo de polinización permitió demostrar que bajo esta condición de tratamiento, el genotipo salvaje aumenta significativamente el número de granos de polen adheridos mientras que para las mutantes no se verifica respuesta en las plantas tratadas con GA. Dichos resultados evidencian que GA es un jugador clave que involucrado en la vía de señalización permite la interacción del polen con el estigma mediada en algún punto por AtPUB16. Se ha reportado que GA activa la expresión de genes involucrados en diferentes procesos del desarrollo de las plantas (Bouquin y col.,

2001; Yee y Goring, 2009). Los mecanismos moleculares por los cuales la forma bioactiva de GA regula el crecimiento y desarrollo de las plantas están siendo actualmente estudiado a través de caracterizaciones genéticas y bioquímicas permitiendo la identificación de diversos intermediarios claves en la señalización por GA (Gomi y Matsuoka, 2003; Sun y Gubler, 2004). Tal como es ampliamente conocido, GA es una fitohormona que interviene en la activación de diferentes procesos celulares en respuesta al estrés abiótico y las evidencias encontradas en los experimentos de esta tesis, constituyen los primeros estudios que permiten involucrar a GA, en los procesos de polinización en las especies SC.

POSIBLE ROL DE ATPUB16 EN EL MECANISMO DE SC

Se han caracterizado ampliamente los mecanismos SI a través de los cuales las plantas regulan el rechazo del polen propio, evitando la autopolinización (Stein y col., 1991; Kusaba y col., 2001; Nasrallah y col., 2002; Nasrallah y col., 2004; Liu y col., 2007; Rea y col., 2010; Kitashiba y col., 2011; Goring y col., 2014). Pero muy poco se conoce respecto de los mecanismos que regulan la SC, proceso que permite la aceptación del polen propio, favoreciendo la autopolinización (Samuel y col., 2009, Iwano y col., 2014). Para un sistema autocompatible como el que exhibe *A. thaliana*, se ha reportado un mecanismo en el cual EXO70A1 es requerida para promover la hidratación del polen y crecimiento del tubo polínico pudiendo funcionar como parte del complejo exocítico, liberando vesículas secretoras a la membrana plasmática para liberar factores esenciales para el grano de polen. En el modelo para la aceptación del polen propio (Figura 10), una vía de respuesta basal desconocida se activa en la papila estigmática bajo el grano de polen compatible que conduce a la activación de la secreción de las vesículas. Como se reportó previamente, el trabajo de investigación del grupo de Goring y col., (2014) sobre *Brassica* y *Arabidopsis* reveló un posible papel para el complejo exocítico EXO70A1 en el reclutamiento de las vesículas secretoras en la membrana plasmática de las papilas estigmáticas (Samuel y col., 2009; Safavian y Goring, 2013; Safavian y col., 2014).

Los resultados presentados hasta aquí, sugieren que del conjunto de proteínas AtARMs estudiadas en este trabajo, podría adjudicarse la expresión proteica, por lo menos, a AtPUB16, AtPUB2, AtPUB19 y AtPUB11. Las dos primeras muestran que los niveles de

transcriptos iniciales son detectables sólo en presencia de GA mientras que AtPUB19 y AtPUB11 aumentan su expresión génica bajo dicho tratamiento hormonal. Estos resultados fueron corroborados por RT-*q*PCR para AtPUB19, AtPUB2 y AtPUB11 (resultados posteriores a la realización del presente trabajo). Del grupo de proteínas AtARMs estudiados aquí, estas cuatro son las candidatas que cumplen con la condición de expresarse sólo en presencia de GA o de aumentar su expresión génica bajo este tratamiento hormonal. Este resultado no descarta la presencia de otros polipéptidos AtARMs presentes en el estigma bajo este tratamiento. Sin embargo, sólo AtPUB16 muestra la relación evolutiva más estrecha con BnARC1, sus plegamientos 3D son comparables y mutantes en dicho gen no muestran expresión de proteínas AtARMs en el interior de las papilas del estigma durante el contacto con el polen. Estos resultados sugieren que el aumento de marca fluorescente en las IF observado para *A. thaliana* salvaje bajo tratamiento hormonal con GA, se debería al menos a la presencia de AtPUB16, polipéptido que participaría en el mecanismo de polinización, de una forma diferente a la función desempeñada por BnARC1, favoreciendo la interacción polen-estigma en una especie SC, tal como *A. thaliana* (Figura 59).

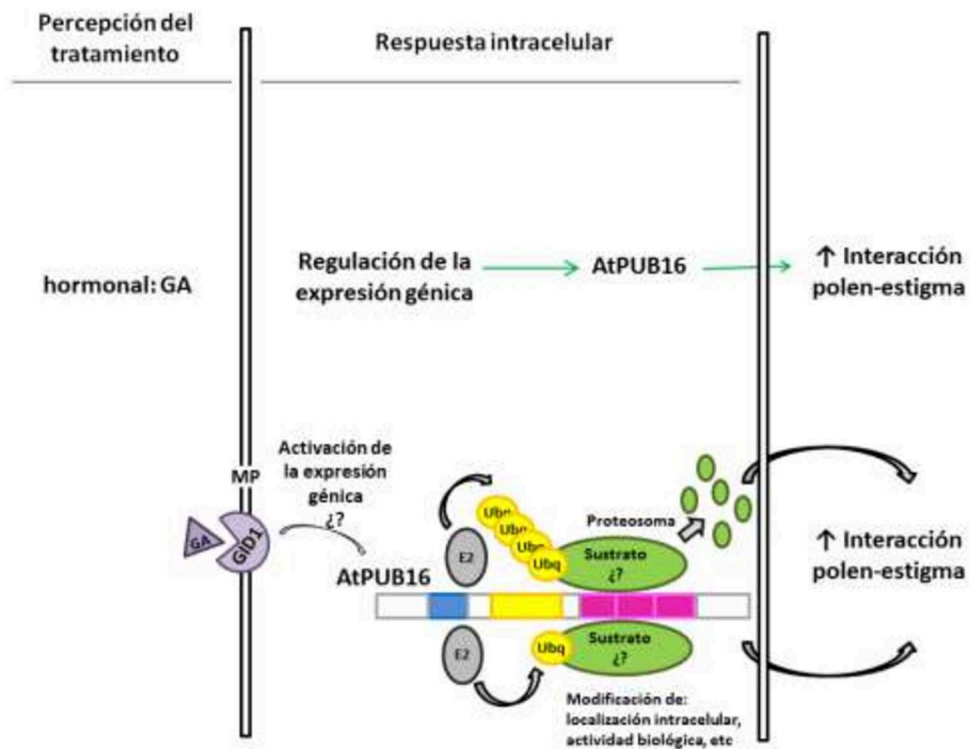


Figura 59: Esquema representando un posible rol de las AtPUB-ARMs en respuesta al tratamiento hormonal durante el mecanismo de polinización en una especie SC. Luego de la percepción del tratamiento hormonal con GA, vía GID1A, se desencadena una respuesta intracelular modificando los niveles de expresión génica de AtPUB-ARMs: aumentando para AtPUB16, AtPUB19, AtPUB2 y AtPUB11; e inhibiendo la expresión de AtPUB5 y AtPUB10. Como consecuencia de esto, se produce la tolerancia al estrés detectándose un aumento de interacciones polen-estigma, favoreciendo la autopolinización en especies SC. En el esquema se muestra AtPUB16 (674 aminoácidos) con las regiones UND (caja celeste); U-box: 273 – 347 (caja amarilla); ARM 1: 399 – 438, ARM 2: 441 – 481 y ARM 3: 484 – 523 (cajas rosas). GA: giberelinas. MP: membrana plasmática.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Se corrobora que la naturaleza química inicial de la adhesión polen-estigma durante el mecanismo de polinización en *A. thaliana* es lipoproteica, mediada en una primera instancia por moléculas lipofílicas, estableciéndose posteriormente la interacción proteína-proteína.
- Los estudios morfológicos mostraron que luego del contacto polen-estigma se verifica un aumento de componentes osmiofílicos discontinuos en las papilas estigmáticas, comprobándose un aumento del metabolismo intracelular en dichas células.
- El uso de herramientas bioinformáticas permitió encontrar 113 *loci* correspondientes a proteínas ARM en el genoma de *A. thaliana* (AtARMs). Los alineamientos múltiples correspondientes a los residuos de aminoácidos junto con las reconstrucciones filogenéticas permitieron detectar proteínas pertenecientes a la súperfamilia de AtARM, con alta homología a BnARC1, donde AtPUB16 posee la secuencia filogenéticamente más próxima a BnARC1, luego de AtPUB17, para las cuales se han postulado funciones tales como ligasas de ubiquitina E3 por homología funcional.
- Mediante la técnica de *western blot*, se observó que en el rango 34 a 80 kDa se encuentran expresadas en tejido floral la mayoría de las proteínas AtARM mostrando diferentes patrones de expresión en función de los tratamientos aplicados.
- El grupo de proteínas AtARMs en el cual se encuentra AtPUB16 (73-80 kDa) muestra un significativo aumento de los niveles de expresión proteica comparado con ABA y NaCl, cuando se aplica GA a la planta. Los polipéptidos detectados por *western blot* con el anticuerpo anti-ARMC8 en dicho rango, corresponderían a AtPUB16 y/o AtPUB19 y/o AtPUB2, dado que no se detecta

expresión génica en CN (*AtPUB16* y *AtPUB2*) o lo hacen débilmente (*AtPUB19*), y su expresión se incrementa respectivamente, en flores de plantas tratadas con GA.

- Los ensayos de polinización utilizando MEF mostraron un aumento en el número de granos de polen germinados sobre estigmas bajo tratamiento con GA comparadas con las plantas control no tratadas. Esto permite sugerir la participación de GA en las vías de señalización que favorecen los mecanismos de autocompatibilidad.
- *AtPUB16* y *AtPUB2* responden específicamente a GA, ya que se observó la inducción de la expresión génica de ambas en presencia del agregado exógeno de GA, condición que aumenta la expresión basal de *AtPUB19*.
- Las RT-*sq*PCR mostraron que las expresiones génicas de algunas *AtARMs* estarían siendo reguladas por hormonas: por GA (activación para *AtPUB16*, *AtPUB19*, *AtPUB2* y *AtPUB11* e inhibición para *AtPUB10* y *AtPUB5*) y por ABA (activación para *AtPUB19* y *AtPUB2*). Finalmente, el estrés salino sólo activa la expresión génica de *AtPUB16*, *AtPUB19* y *AtPUB2*, sin que se verifiquen efectos sobre la expresión del resto de los genes *AtARMs*.
- *EXO70A1* se expresa en plantas tratadas con GA, convirtiéndolo en un posible candidato para la regulación del mecanismo de exocitosis liberando factores necesarios para la hidratación del polen propio. Por el contrario, el receptor ARK3 (homólogo al BnSRK) podría comportarse tanto como un receptor no específico, o bien poseer un *timing* de expresión diferente al de las *AtARMs* con las que interacciona.
- *AtPUB8* aumenta su expresión génica en tejido floral bajo tratamiento con GA sugiriendo una posible participación de esta ligasa de ubiquitina E3 en el mecanismo de SC, reforzando los mecanismos de autopolinización.
- Por técnicas de IF se observó expresión de proteínas *AtARMs* en plantas salvajes tratadas con GA mientras que en genotipos mutantes *pub16* y *gid1a* no se observó expresión significativa de proteínas *AtARMs* en las papilas evaluadas durante el contacto polen-estigma. Esto sugiere que la inmunomarcación

observada en las plantas salvajes en presencia de GA, correspondería fundamentalmente a la expresión de *AtPUB16*.

- De acuerdo a los resultados obtenidos utilizando RT-*q*PCR, se postula que GA estaría activando la expresión génica de *AtPUB16*, tal como ha sido postulado para otras proteínas *AtPUB-ARM*, cuya expresión génica responde al tratamiento hormonal aplicado (Yee y col., 2009).

CONCLUSION GENERAL

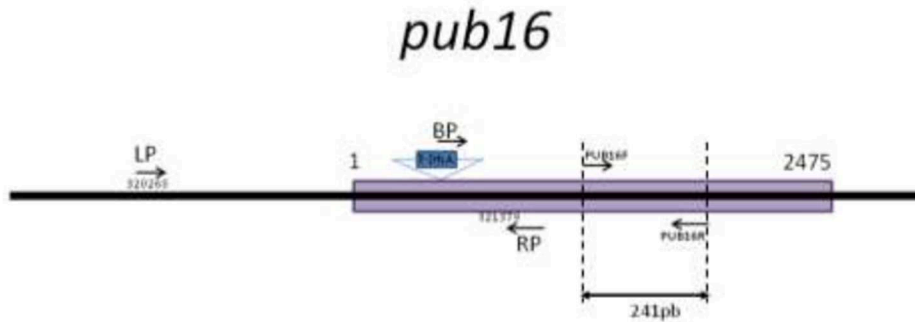
Los resultados hallados en este trabajo de tesis permiten determinar que una vez que el grano de polen entra en contacto con el estigma, el polen es capturado y se establece un contacto lipoproteico entre la superficie de la cubierta del polen y la cutícula del estigma, tal como fue demostrado previamente para especies de *Brassica* (Elleman y Dickinson, 1990; Preuss y col., 1993). Tanto GA como ABA parecen actuar como reguladores de la expresión génica, activando o inhibiendo los genes *AtARMs* que participan en el mecanismo de autopolinización, reconocimiento y aceptación del polen propio. En presencia de GA exógeno, se expresa *AtPUB16*, homólogo a *BnARC1*, potenciando los mecanismos de autopolinización en *A. thaliana* (Acosta y col., 2012). Estos hallazgos permiten postular un posible rol biológico de *AtPUB16* en dicho mecanismo, como una posible ligasa de ubiquitina E3 involucrada en el mecanismo de SC, favoreciendo el proceso de autopolinización en presencia de tratamiento hormonal con GA. Esto podría ocurrir marcando proteínas para su degradación vía proteosoma (poliubiquitinación de proteínas blanco que inhiben el proceso de aceptación del polen propio) o modificando su localización intracelular (monoubiquitinación de proteínas blanco cuya actividad biológica permite un aumento de las interacciones polen-estigma). Estos resultados también sugieren que existen proteínas *AtARM* que se expresan en las papilas del estigma bajo tratamiento con GA y que dicho tejido podría utilizar el receptor *GID1A* para internalizar la fitohormona. Dado que no se cuenta con precedentes sobre estudios de expresión génica de *AtARMs* en tejido floral bajo las condiciones evaluadas en el presente trabajo, estos resultados constituyen un aporte original permitiendo asignar nuevas funciones a esta súperfamilia de proteínas.

ANEXO I

OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE PCR, RT- QPCR Y PARA VERIFICACIÓN DE MUTANTES.

Nombre del Gen	Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido reverso 5'-3'	Tamaño (pb)
ARK3	ACGGGTCGGATGGTTGCGTG	CCGACCCGCTACCCCGGATA	204
AtPUB8	TCCGGCAATCGAACTTGCC	GAGTCTCGCTTCGTGAGTCG	257
CaIS5	CATTGGTCAGCGAGTCCTGG	TCCTTCGCTGCTGCAAAC	475
AtPUB2	ACAACAAGTCCCTCATCGCG	TCTACTGCTCCAGCTTCGA	287
AtPUB19	GAGTTACGGCGGACTCGATG	AGAGACCCAACGACGTCCT	202
AtPUB5	AGTGCACGCTTTCTCGTACC	CAGCGCCTGAAGCAGAATCT	429
FL17	ACTTATGAACGGCGCGAGAC	TGCTTGAACAGTGGCTCCAC	209
EXO1	GCGCAAACGCTCAGGAAAC	TGCGCACAGATCTGACCATG	334
AtPUB17	CAAAACGGGACGCCGAGAGG	GTAGCAACCCCGCAATCGCA	364
AtPUB11	ATCTCTCGGTGGTGCGCTGA	TCGCACCTGACCCGCCTATT	460
AtPUB10	AGACGCAGCTACGGCTCTGT	GCAGCTGCGTTCTCTCGGTT	261
AtPUB16	AATCGCCGGGATCAAGCACC	GTGGCGGCGGAAATCTGGAG	241
βTUB	GAGAATGCTGATGAGTGCATGG	CAGGGAACCTCAGACAGCAA GT	151
Verificación de mutante <i>pub16</i>	LP_PUB16F: ATTCACCGGAAAGTGGAGAG	RP_PUB16R: CAAGCTCGTGAAAGTTGAAGG	1112
	LBa1: TGTTTACGTAGTGGGCCATCG	RP_PUB16R: CAAGCTCGTGAAAGTTGAAGG	474- 774
Verificación de mutante	LP_GID1AF CTGCGAGCGATGAAGTTAATC	RP_GID1AR: TCACCAGCCAAGAAAATATGG	1133

gid1a	Lba1:	RP_GID1AR:	461-
	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	TCACCAGCCAAGAAAATATGG	761



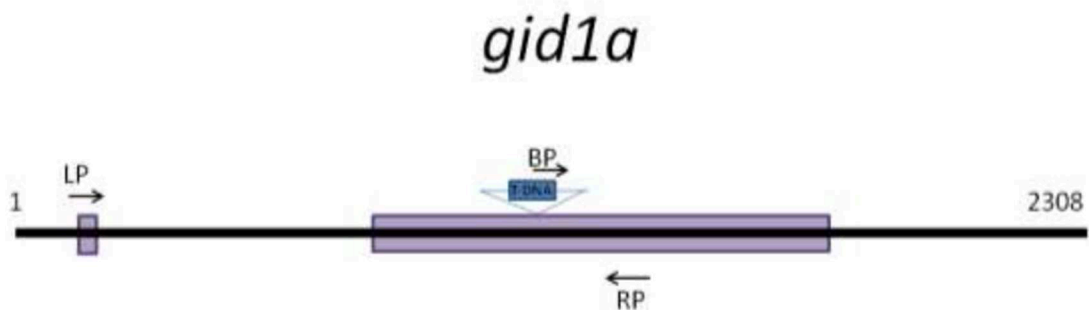
PUB16 no posee intrones. El gen (único exón: caja violeta) contiene 2475pb

Verificación de mutante:

LP+RP = 1112 pb en WT. No hay amplificación en la mutante

BP (Lba1)+RP aprox. 500 pb en la mutante. No hay amplificación en WT.

PUB16F+PUB16R = 241pb específicos del gen



GID1A posee dos exones (cajas violeta) y un intrón. El gen contiene 2308pb

Verificación de mutante:

LP(GID1AF)+RP(GID1AR) = 1133 pb en WT. No hay amplificación en la mutante

BP (Lba1)+RP aprox. 550 pb en la mutante. No hay amplificación en WT.

ANEXO II

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.

- **Solución Hoagland modificada** según Epstein, 1972: $(\text{NO}_3)_2 \text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,55 mM; NO_3K 0,52 mM; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mM; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,11 mM; BO_3H_3 0,046 μM ; $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00076 μM ; $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,00031 μM ; $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,0078 μM ; $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,00045 μM ; $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9 mM; NaOH 25 mM.

- **FAA:** (etanol absoluto, ácido acético glacial, formaldehído, agua desionizada, en proporción 50:5:10:35).

- **Medio Murashige y Skoog:** KNO_3 1,9 g/l; NH_4NO_3 1,65 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,37 g/l; KH_2PO_4 0,17 g/l; Na_2EDTA 37,3 mg/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8 mg/l; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3 mg/l; H_3BO_3 6,2 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añaden 8 g/l de agar.

- **Solución de siembra de ADN y ARN en geles de agarosa:** Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v). SSC 1X: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M.

- **TAE 1X:** Tris-acetato 40 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM.

- **TBE 1X:** Tris-HCl 89 mM (pH 8,0); ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM (pH 8,0).

- **TE:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,5).

- **Primer mix 10X:** se preparan 100 μl de manera tal que cada cebador se encuentra en una concentración igual a 2 μM . En todos los casos se utilizaron las siguientes combinaciones oligonucleótidos, diseñando una pimer mix 10X para cada gen a testear:

Oligonucleótido 100 μM (stock)	Volumen de c/u para volumen final de la primer mix=100 μl
F1 ^(*)	1
R1 ^(*)	1
Fx ^(**)	1
Rx ^(**)	1
Volumen de TE	96

(*) Oligonucleótidos para β -tubulina

(**) Oligonucleótidos para el x gen a testear.

- **Solución salina para precipitar ARN:** 0,8 M citrato de sodio y 1,2M cloruro de sodio

- **Acetato de uranilo:** se prepara al 2% en agua destilada ó acetona, previamente centrifugado durante 30 min a 2000-3000 rpm, durante 5 min a T_{amb} .

- **Citrato de plomo:** se prepara hirviendo agua destilada durante 15-20 min en Erlenmeyer con capuchón de papel de aluminio para evitar disolución de CO_2 . Se toma un frasco pequeño, se agrega media granalla de NaOH, 0,0375 g de citrato de plomo y 5 ml del H_2O_d hirviendo (para evitar que precipite).

Soluciones provistas por el *kit* para extracción de ADNg (NucleoSpin®Plant II, MACHEREY-NAGEL):

- **Solución PL1:** solución amortiguadora de lisis (CTAB)

- **Solución PC:** solución amortiguadora de unión (hidrocloruro de guanidina y etanol)

- **Solución PW1:** solución amortiguadora de lavado (hidrocloruro de guanidina e isopropanol)

- **Solución PW2:** solución amortiguadora de lavado (etanol)

- **Solución PE:** 5 mM Tris-HCl, pH 8,5.

- **Solución amortiguadora de homogeneización para proteínas:** 50mM Tris Acetato pH= 7,9; 100mM Acetato de potasio; 1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glicerol.

- **Reactivo de Bradford:** pesar 100 mg de azul de coomassie G-250, agregar 50 ml etanol al 95% (v/v) y 100 ml de ácido fosfórico al 85% (v/v) y se completó a un volumen de un litro con agua destilada. El reactivo se deja en agitación durante toda la noche y se almacenó en heladera a 4 °C.

- **Solución amortiguadora de siembra 5X de proteínas:** Tris-HCl 1M pH=6,8 60mM, glicerol 25%; 2-mercaptoetanol 14,4 mM Azul de bromofenol 0,1%.

- **Solución amortiguadora de transferencia:** Tris 48 mM, glicina 39 mM, 20% (v/v) de metanol, pH 9,2.

- **TBS (*Tris Buffered Saline*)**: mezclar 5ml de Tris-Hcl 2M pH=7,5 (10mM), con 37,5 ml NaCl 4M (150mM) y agregar 957,5ml H₂O destilada.
- **SB2**: 0,5% (p/v) de BSA en TBS.
- **Reactivo Vectastain ABC Western Blot Detection Procedure (Vector Laboratorios - Vectastain ABC Elite System)**: Este sistema de alta sensibilidad puede ser utilizado para detectar antígenos unidos a membranas de nitrocelulosa o PVDF luego de ser transferidos a partir de una electroforesis. La optimización de las condiciones de revelado fue puesta a punto para el antígeno en particular. Todas las incubaciones se llevan a cabo a T_{amb}. El reactivo VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector) debe ser preparado según las instrucciones del fabricante. Brevemente: 1- Adicionar 4 gotas del reactivo A (avidina DH) a 10 ml de SB2 y luego 4 gotas del reactivo B (enzima biotinilada); 2- Mezclar y esperar 30 min para permitir la formación del complejo antes de usar; 3- Preparar solo 30 min antes de ser usada.
- **Solución de fijación para IHQ**: paraformaldehído 4% en PBS 1X suplementado con Tritón X-100 0,1%.
- **PBS 10X**: 2 g KCl, 80 g NaCl, 17,8 g Na₂HPO₄·2 H₂O y 2,4 g KH₂PO₄ y ajustar a pH= 7,4 con KOH luego de la dilución en agua para obtener el PBS 1X
- **Solución de bloqueo**: albumina sérica bovina al 3% (BSA; Sigma[®], A9647) in PBS 1X

ANEXO III

GRUPOS DE ATARMS Y SUS CORRESPONDIENTES PESOS MOLECULARES OBTENIDO DE LAS BASES DE DATOS TAIR Y UNIPROT.

Tabla mostrando los grupos correspondientes a los rangos de PM obtenidos en los resultados por *western blot* a través de la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) y UniProt: base de datos de dominios y familia de proteínas:

	TAIR	PM	UniProt
Grupo A: 6 polipéptidos de 73-80 kDa	AT5G01830	73600,00	Q9LZW3
	AT1G60190	76013,00	O80792
	AT5G67340	78119,20	Q5XEZ8
	AT1G29340	79834,00	Q9C7R6
	AT4G31520	79089,40	Q9SV18
	AT4G36550	79918,00	O23225
Grupo B: 11 polipéptidos de 58-66 kDa	AT5G50900.1	59269,40	Q9FI58
	AT5G22820.2	59452,50	C0Z225
	AT2G45720.1	59521,60	O64651
	AT3G15180.2	60184,50	F4IXH9
	AT3G03970.1	61441,70	Q9SQR5
	AT2G16960.1	61693,90	Q9ZVW7
	AT1G01830.2	61923,40	Q93YW3
	AT1G54385.1	62152,40	Q5XVI1
	AT2G05810.1	62895,70	Q8S8G1
	AT1G61350	63020,00	O64785
	AT5G62580	66616,00	Q6NPR6
Grupo C: 10 polipéptidos de 34-41 kDa	AT3G58180	34092,10	Q94JW0
	AT1G08315	34439,60	Q0WNZ8
	AT5G14510	35649,40	Q9LY78
	AT3G01450	36346,60	Q9SGH3
	AT1G15165	37879,00	F4HZI0
	AT5G14790	38008,20	Q9LEQ9
	AT3G01400	38275,50	Q9SGH8
	AT5G58680	39038,00	Q8LGC7
	AT3G18530	41339,60	F4J8S4
	AT1G14300	41930,30	Q9M9T2

BIBLIOGRAFÍA

Aberle, H.; Butz, S.; Stappert, J.; Weissig, H.; Kemler, R. y Hoschuetzky, H. (1994) *Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins*. J. Cell Sci. 107 (12): 3655-3663.

Acosta, M. G.; Lassaga, S. L. y Casco, V. H. (2007) *Estudio y caracterización de la naturaleza química de la adhesión celular polen-estigma en Arabidopsis thaliana*. Rev. Científica Agropecuaria 2: 141-147.

Acosta, M. G.; Langhi, D.; Lassaga, S. y Casco V. H. (2008) *Caracterización morfológica de las estructuras reproductivas de Arabidopsis thaliana*. Int. J. of Morph. 3: 730-731.

Acosta, M. G.; Ahumada, M.; Lassaga, S. y Casco, V. H. (2012) *PUB16 gene expression under abiotic stress and their putative role as an ARM repeat protein in Arabidopsis thaliana self-pollination pathway*. Adv Biosci Biotechnol. 3 (5): 609-619.

Alberts, B.; Yohnson, A.; Lewis, J. Raff, M.; Roberts, K. y Wlater, P. (2002) *Molecular Biology of the cell*, 4th edition. Cap. 19. New York.

Allen, A.M.; Thorogood, C.J.; Hegarty, M.J.; Lexer, C. y Hiscock, S.J. (2011) *Pollen–pistil interactions and self-incompatibility in the Asteraceae: new insights from studies of Senecio squalidus (Oxford ragwort)*. Annals of Botany 108: 687–698.

Alonso, J. M.; Stepanova, A. N.; Lisse, T. J.; Kim, C. J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D. K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadriab, C.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C. C.; Parker, H.; Prednis, L.; Ansari, Y.; Choy, N.; Deen, H.; Geralt, M.; Hazari, N.; Hom, E.; Karnes, M.; Mulholland, C.; Ndubaku, R.; Schmidt, I.; Guzman, P.; Aguilar-Henonin, L.; Schmid, M.; Weigel, D.; Carter, D. E.; Marchand, T.; Risseeuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W. L.; Berry, C. C. y Ecker, J. R. (2003) *Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana*. Science 301 (5633): 653-657.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990) *Basic local alignment search tool*. J. Mol. Biol. 215 (3): 403-410.

Alvarez-Buylla, E. R.; Azpeitia, E.; Barrio, R.; Benítez, M. y Padilla-Longoria, P. (2010) *From ABC genes to regulatory networks, epigenetic landscapes and flower morphogenesis: making biological sense of theoretical approaches*. Semin. Cell Dev. Biol. 21 (1): 108-117.

Amador, V.; Monte, E.; García-Martínez, J. L. y Prat, S. (2001) *Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to Drosophila armadillo*. Cell 106 (3): 343-354.

Andrade, M. A. y Bork, P. (1995) *HEAT repeats in the Huntington's disease protein*. Nat. Genet. 11 (2): 115-116.

Argaves, W. S.; Suzuki, S., Arai, H.; Thompson, K.; Pierschbacher, M. D. y Ruoslahti, E. (1987) *Amino acid sequence of the human fibronectin receptor*. J. Cell Biol. 105 (3): 1183-1190.

Ascencio-Ibanez, J. T.; Sozzani, R.; Lee, T. J.; Chu, T. M.; Wolfinger, R. D.; Cella, R. y Hanley-Bowdoin, L. (2008) *Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection*. Plant Physiol. 148 (1): 436-454.

- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. F.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. y Struhl, K. (1987) *Current protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Azevedo, C.; Santos-Rosa, M. J. y Shirasu, K. (2001) *The U-box protein family in plants*. Trends Plant Sci. 6 (8): 354-358.
- Baker, H. G. (1948) *Dimorphism and monomorphism in the Plumbaginaceae. I. Survey of the family*. Ann. Bot. (N.S.). 12: 207-219.
- Baker, H. G. (1967) *Support for Baker's law—as a rule*. Evolution 21: 853-856.
- Banzai, T.; Hershkovits, G.; Katcoff, D. J.; Hanagata, N., Dubinsky, Z. y Karube, I. (2002) *Identification and characterization of mRNA transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differential display in the mangrove, Bruguiera gymnorrhiza*. Plant Sci. 162: 499-505.
- Barrett, S. CH. y Cruzan, M. B. (1994) *Incompatibility in heterostylous plants*. In: Williams, E. G.; Clarke, A. E.; Knox, R. B. Eds.: Advances in cellular and molecular biology of plants. Genetic control of self incompatibility and reproductive development in flowering plants. Vol 2. Kluwer, Dordrecht 189-219.
- Barrett, S. C. H. (2002) *The evolution of plant sexual diversity*. Nature Rev. Genetics 4: 274-284.
- Baskin, T. I.; Busby, C. H.; Fowke, L. C.; Sammut. M. y Gubler, F. (1992) *Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa*. Planta 187: 405-413.
- Bauer, E.; Kudla, J. y Harter K. (2007) *The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses*. Plant J. 50 (2): 347-363.
- Bechsgaard, J. S.; Castric, V.; Charlesworth, D. Vekemans, X. y Schierup, M. H. (2006) *The Transition to Self-Compatibility in Arabidopsis thaliana and Evolution within S-Haplotypes over 10 Myr*. Mol. Biol. Evol. 23 (9): 1741-1750.
- Bedinger, P. (1992) *The remarkable biology of pollen*. Plant Cell 4 (8): 879-887.
- Bedinger, P. A.; Hardeman, K. J. y Loukides, C. A. (1994) *Travelling in style: the cell biology of pollen*. Trends. Cell Biol. 4 (4): 132-138.
- Bergler, J. y Hoth, S. (2011) *Plant U-box armadillo repeat proteins AtPUB18 and AtPUB19 are involved in salt inhibition of germination in Arabidopsis*. Plant Biol. 13 (5): 725-730.
- Blackmore, S.; Wortley, A. H.; Skvarla, J. J. y Rowley, J. R. (2007) *Pollen wall development in flowering plants*. New Phytol. 174 (3): 483-498.
- Blundell, T. L.; Sibanda, B. L.; Sternberg, M. J. y Thornton, J. M. (1987) *Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules*. Nature 326: 347-352.
- Borochoy, A. y Woodson, W. R. (1989) *Physiology and biochemistry of flower petal senescence*. Hort. Rev. 11: 15-43.
- Bouquin, T.; Meier, C.; Foster, R.; Nielsen, M. E. y Mundy, J. (2001) *Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid*. Plant Physiol. 127 (2): 450-458.
- Boyes, D. C.; Zayed, A. M.; Ascenzi, R.; McCaskill, A. J.; Hoffman, N. E.; Davis, K. R. y Görlach, J. (2001) *Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants*. Plant Cell 13: 1499-1510.

- Bradford, M. M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brennan, A. C.; Harris, S. A. y Hiscock, S. J. (2005) *Modes and rates of selfing and associated inbreeding depression in the self-incompatible plant *Senecio squalidus* (Asteraceae): a successful colonizing species in the British Isles*. New Phytol. 168: 475-486.
- Brugière, N.; Rothstein, S. J. y Cui, Y. (2000) *Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility*. Trends. Plant Sci. 5 (10): 432-438.
- Cai, Y.; Zhuang, X.; Wang, J.; Wang, H.; Lam, S. K.; Gao, C.; Wang, X. y Jiang, L. (2012) *Vacuolar degradation of two integral plasma membrane proteins, AtLRR84A and OsSCAMP1, is cargo ubiquitination-independent and prevacuolar compartment-mediated in plant cells*. Traffic 13 (7): 1023-1040.
- Callis, J.; Carpenter, T.; Sun, C. W. y Vierstra, R. D. (1995) *Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia*. Genetics 139 (2): 921-939.
- Callis, J. y Vierstra, R. D. (2000) *Protein degradation in signaling*. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 381-386.
- Callis, J. (2014) *The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System*. The Arabidopsis Book 7: e0174. doi:10.1199/tab.0123.
- Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M. (1993) *Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth*. Plant J. 3 (1): 1-30.
- Carter, R. S.; Pennington, K. N.; Arrate, P.; Oltz, E. M. y Ballard, D. W. (2005) *Site-specific monoubiquitination of *IkappaB* kinase IKKbeta regulates its phosphorylation and persistent activation*. J. Biol. Chem. 280 (52): 43272-43279.
- Chapman, L.A. y Goring, D.R. (2010) *Pollen–pistil interactions regulating successful fertilization in the Brassicaceae*. J. Exp. Bot. 61: 1987-1999.
- Charlesworth, D. (2003) *Effects of inbreeding on the genetic diversity of plant populations*. Phil. Trans. Roy. Soc. B. 358: 1051-70.
- Chastagner, P.; Israël, A. y Brou, C. (2006) *Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains*. EMBO Rep. 7 (11): 1147-1153.
- Chen, L. y Hellmann, H. (2013) *Plant E3 ligases: flexible enzymes in a sessile world*. Mol. Plant. 6 (5): 1388-1404.
- Cheng, H.; Qin, L.; Lee, S.; Fu, X.; Richards, D. E.; Cao, D.; Luo, D.; Harberd, N. P. y Peng, J. (2004) *Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function*. Development 131 (5): 1055-1064.
- Cheung, A. Y.; Wang, H. y Wu, H. M. (1995) *A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth*. Cell 82 (3): 383-393.
- Chhun, T.; Aya, K.; Asano, K.; Yamamoto, E.; Morinaka, Y.; Watanabe, M.; Kitano, H.; Ashikari, M.; Matsuoka, M. y Ueguchi-Tanaka, M. (2007) *Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice*. Plant Cell 19 (12): 3876-3888.
- Chinnusamy, V.; Schumaker, K. y Zhu, J. K. (2004) *Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants*. J. Exp. Bot. 55 (395): 225-236.

- Cho, S. K.; Chung, H. S.; Ryu, M. Y.; Park, M. J.; Lee, M. M.; Bahk, Y. Y.; Kim, J.; Pai, H. S. y Kim, W. T. (2006) *Heterologous expression and molecular and cellular characterization of CaPUB1 encoding a hot pepper U-Box E3 ubiquitin ligase homolog*. Plant Physiol. 142 (49): 1664-1682.
- Cho, S. K.; Ryu, M. Y.; Song, C.; Kwak, J. M. y Kim, W. T. (2008) *Arabidopsis PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress*. Plant Cell 20 (7): 1899-1914.
- Christmann, A.; Moes, D.; Himmelbach, A.; Yang, Y.; Tang, Y. y Grill, E. (2006) *Integration of abscisic acid signalling into plant responses*. Plant Biol 8: 314-325.
- Clark, J. N. y Millar, A. H. (2015) *Protein turnover in plant biology*. Nature Plants 1: 15017.
- Coates, J. C. (2003) *Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom*. Trends. Cell Biol. 13 (9): 463-471.
- Coates, J. C.; Laplaze, L. y Haseloff, J. (2006) *Armadillo-related proteins promote lateral root development in Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103 (5): 1621-1626.
- Coates, J. C. (2007) *Plant Cell Monographs: Plant Growth Signalling* Ed.: Bogre and Beemster, Springer, 299-314
- Coen, E. S. y Carpenter, R. (1993) *The Metamorphosis of Flowers*. Plant Cell. 10 (10): 1175-1181.
- Colebrook, E.H.; Thomas, S.G.; Phillips, A.L. y Hedden, P. (2014) *The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress*. J Exp Biol., 217, 67-75.
- Coll, J. C. y Miller, R. L. (1991) *The nature of sperm chem-attractants in coral and starfish. In Comparative spermatology 20 years after: papers presented at the 6th International Congress of Spermatology*. Ed.: B. Baccetti. New York: Raven Press. 129-134.
- Conacci-Sorrell, M.; Zhurinsky, J. y Ben-Ze'ev, A. (2002) *The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer*. J. Clin. Invest. 109 (8): 987-991.
- Cooper, G. M. y Hausman, R. E. (2013) *The Cell A Molecular Approach. En: Cell Walls, Extracellular Matrix and Cell-Matrix Interactions*. Sixth Edition. Boston, University, EEUU.
- Crooks G.E. Hon, G. Chandonia, J.M. y Brenner S.E. (2004) *WebLogo: a sequence logo generator*. Genome Res., 14: 1188–1190.
- de Graaf, B. H. J.; Derksen, J. W. M. y Mariani, C. (2001) *Pollen and pistil in the progamic phase*. Sex. Plant Reprod. 14 (1): 41-55.
- De Milde, L.; Yoshizumi, T. y Matsui, M. (2013) *The ETHYLENE RESPONSE FACTOR 6 acts as central regulator of leaf growth under water limiting conditions in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 162 (1): 319-332.
- Di Stilio, V. S.; Kumar, R. A.; Oddone, A. M.; Tolkin, T. R. y Salles, P. (2010) *Virus-Induced Gene Silencing as a Tool for Comparative Functional Studies in Thalictum*. PLoS ONE 5 (8): e12064. doi:10.1371/journal.pone.0012064.
- Dickinson, H. G. y Lewis, D. (1973) *The formation of the tryphine coating the pollen grain of Raphanus and its properties relating to the self-incompatibility system*. Proc. R. Soc. London Ser. B. 184 (1075): 149-165.
- Dickinson, H. G. y Elleman, C. J. (1985) *Structural changes in the pollen grain of Brassica oleracea during dehydration in the anther and development on the stigma as revealed by anhydrous fixation techniques*. Micron. 16 (4):255-270.

- Dickinson, H. (1995) *Dry stigmas, water and self-incompatibility in Brassica*. Sex. Plant Reprod. 8 (1):81-10.
- Dickinson, H. G.; Elleman, C. J. y Doughty, J. (2000) *Pollen coatings: Chimaeric genetics and new functions*. Sex. Plant Reprod. 12 (5): 302-309.
- Dill, A.; Thomas, S. G.; Hu, J.; Steber, C. M. y Sun, T. P. (2004) *The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation*. The Plant Cell 16 (6): 1392-1405.
- Dobson, H. E. M. (1989) *Pollenkitt in plant reproduction*. In *The Evolutionary Ecology of Plants*. Ed.: J. H. Bock y Y. B. Linhart. Boulder, CO: Westview Press, 227-246.
- Dong, C. H.; Agarwal, M.; Zhang, Y.; Xie, Q.; Zhu, J. K. (2006) *The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1*. PNAS, USA 103: 8281-8286.
- Downes, B. P.; Stupar, R. M.; Gingerich, D. J. y Vierstra, R. D. (2003) *The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development*. Plant J. 35 (6): 729-742.
- Drechsel, G.; Bergler, J.; Wippel, K.; Sauer, N.; Vogelmann, K. y Hoth, S. (2011) *C-terminal armadillo repeats are essential and sufficient for association of the plant U-box armadillo E3 ubiquitin ligase SAUL1 with the plasma membrane*. J. Exp. Bot. 62 (2): 775-785.
- Dubois, M.; Skirycz, A.; Claeys, H.; Maleux, K.; Dhondt, S.; De Bodt, S.; Vanden Bossche, R.;
- Dumas, C. y Knox, R. B. (1983) *Callose and determination of pistil viability and incompatibility*. Theor Appl Genet. 67 (1): 1-10.
- Dwyer, K. D.; Kandasamy, M. K.; Mahosky, D. I.; Acciai, J.; Kudish, B. I.; Miller, J. E.; Nasrallah, M. E. y Nasrallah, J. B. (1994) *A superfamily of S-locus-related sequences in Arabidopsis: Diverse structures and expression patterns*. Plant Cell 6 (12): 1829-1843.
- Dzelzkalns, V. A.; Nasrallah, J. B. y Nasrallah, M. E. (1992) *Cell-cell communication in plants: Self-incompatibility in flower development*. Dev. Biol. 153: 70-82.
- Eckardt, N. A. (2007) *GA perception and signal transduction: molecular interactions of the GA receptor GID1 with GA and the DELLA protein SLR1 in rice*. Plant Cell 19 (7): 2095-2097.
- Edlund, A. F.; Swanson, R. y Preuss, D. (2004) *Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination*. Plant Cell 16 Suppl. 84-97.
- El Refy, A.; Perazza, D.; Zekraoui, L.; Valay, J. G.; Bechtold, N.; Brown, S.; Hulskamp, M.; Herzog, M. y Bonneville, J. M. (2003) *The Arabidopsis KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles*. Mol. Genet. Genomics 270 (5): 403-414.
- Elleman, C. J. y Dickinson, H. G. (1990) *The role of the exine coating in pollen-stigma interactions in Brassica oleracea*. New Phytol. 114 (3): 511-518.
- Elleman, C. J.; Franklin Tong, V. y Dickinson, H. G. (1992) *Pollination in species with dry stigmas the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes*. New Phytol. 121 (3): 413-424.
- Eschrich, W. y Currier, H. B. (1964) *Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions*. Stain Technology 39: 308-309.
- Escobar, N. M.; Haupt, S.; Thow, G.; Boevink, P.; Chapman, S. y Oparka, K. (2003) *High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata*. Plant Cell 15 (7): 1507-1523.

- Farris, J. V.; Albert, V.; Källersjö, M.; Lipscomb, D. y Kluge, A. (1996) *Parsimony jackknifing outperforms neighbor joining*. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein, J. (1993) *Phylip (Phylogeny Inference Package)*. Version 3.5c. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/phylip.html>. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Ferrándiz, C.; Fourquin, C.; Prunet, N.; Scutt, C. P.; Sundberg, E.; Trehin, C. y Vialette-Guiraud, A. C. M. (2010) *Carpel Development*. *Adv. Bot. Res.* 55: 1-73.
- Ferrer, M. M. y Good, S. V. (2012) *Self-sterility in flowering plants: preventing self-fertilization increases family diversification rates*. *Ann. Bot.* 110 (3): 535-553.
- Fiebig, A.; Mayfield, J. A.; Miley, N. L.; Chau, S.; Fischer, R. L. y 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.
- Finkelstein, R. R.; Gampala, S. S. L. y Rock, C. D. (2002) *Abscisic acid signaling in seeds and seedlings*. *Plant Cell* 14 Suppl, S15-S45.
- Fisher, R. F. y Long, S. R. (1992) *Rhizobium: Plant signal exchange*. *Nature* 357: 655-660.
- Fowler, J. E. y Quatrano, R. S. (1997) *Plant cell morphogenesis: plasma membrane interactions with the cytoskeleton and cell wall*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 697-743.
- Franklin-Tong, V. (2008) *Self-incompatibility in flowering plants. Evolution, diversity, and mechanisms*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Freeman, W. M.; Walker, S. J. y Vrana, K. E. (1999) *Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential*. *Biotechniques* 26: 112-115.
- Freemont, P. S.; Hanson, I. M. y Trowsdale, J. (1991) *A novel cysteine-rich sequence motif*. *Cell* 64 (3): 483-484.
- Fry, S. C.; Aldington, S.; Hetherington, P. R. y Aitken, J. (1993) *Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall*. *Plant Physiol.* 103 (1): 1-5.
- Fu, F. y Yang, Z. (2001) *The Rop GTPase: A master switch of cell polarity development in plants*. *Trends Plant Sci.* 6 (12): 545-547.
- Fu, X. y Harberd, N. P. (2003) *Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response*. *Nature* 421: 740-743.
- Fu, X.; Richards, D. E.; Fleck, B.; Xie, D.; Burton, N. y Harberd, N. P. (2004) *The Arabidopsis mutant sleepy1^{gar2-1} protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates*. *Plant Cell* 16 (6): 1406-1418.
- Fuentes, S.; Ljung, K.; Sorefan, K.; Alvey, E.; Harberd, N. P. y Østergaard, L. (2012) *Fruit growth in Arabidopsis occurs via DELLA-dependent and DELLA-independent gibberellin responses*. *Plant Cell* 24 (10): 3982-3996.
- Fujita, Y.; Nakashima, K.; Yoshida, T.; Katagiri, T.; Kidokoro, S.; Kanamori, N.; Umezawa, T.; Fujita, M.; Maruyama, K.; Ishiyama, K.; Kobayashi, M.; Nakasone, S.; Yamada, K.; Ito, T.; Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) *Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50 (12): 2123-2132.
- Furness, C. A. y Rudall, P. J. (2004) *Pollen aperture evolution - a crucial factor for eudicot success?* *Trends Plant Sci.* 9 (3):154-158.

- Gagne, J. M.; Downes, B. P.; Shiu, S. H.; Durski, A. M. y Vierstra, R. D. (2002) *The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 99 (17): 11519-11524.
- Gaude, T. y McCormick, S. (1999) *Signaling in pollen-pistil interactions*. Semin. Cell Dev. Biol. 10 (2): 139-147.
- Giraudat, J. (1995) *Abscisic acid signaling*. Curr. Opin. Cell Biol. 7 (2): 232-238.
- Goda, H.; Sasaki, E.; Akiyama, K.; Maruyama-Nakashita, A.; Nakabayashi, K.; Li, W.; Ogawa, M.; Yamauchi, Y.; Preston, J.; Aoki, K. Takatsuto, S.; Fujioka, S.; Asami, T.; Nakano, T.; Kato, H.; Mizuno, T.; Sakakibara, H.; Yamaguchi, S.; Nambara, E.; Kamiya, Y.; Takahashi, H.; Hirai, M.Y.; Sakurai, T.; Shinozaki, K.; Saito, K.; Yoshida, S. y Shimada, Y. (2008) *The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access*. Plant J., 55 pp. 526–542.
- Gomi, K. y Matsuoka, M. (2003) *Gibberellin signalling pathway*. Curr. Opin Plant Biol. 6 (5): 489-493.
- Gomi, K.; Sasaki, A.; Itoh, H.; Ueguchi-Tanaka, M.; Ashikari, M.; Kitano, H. y Matsuoka, M. (2004) *GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice*. Plant J. 37 (4): 626-634.
- Good-Avila, S. V. y Stephenson, A. G. (2002) *The inheritance of modifiers conferring self-fertility in the partially self-incompatible perennial, Campanula rapunculoides L. (Campanulaceae)*. Evolution 56 (2): 263-272.
- Goodwillie, C.; Kalisz, S. y Eckert, C. (2005) *The evolutionary enigma of mixed mating in plants: Occurrence, theory and empirical observations*. Annu. Rev. Ecol. Evol. and System 36: 47-79.
- Goring, D. R. (2000) *The search for components of the self-incompatibility signaling pathway(s) in Brassica napus*. Ann. Bot. 85: 147-153.
- Goring, D. R.; Indriolo, E. y Samuel, M. A. (2014) *The ARC1 E3 ligase promotes a strong and stable self-incompatibility response in Arabidopsis species: response to the Nasrallah and Nasrallah commentary*. Plant Cell 26: 3842-3846.
- Goto, N. y Pharis, R. P. (1999) *Role of gibberellins in the development of floral organs of gibberellin-deficient mutant, ga1-1, of Arabidopsis thaliana*. Can. J. Bot. 77: 944-954.
- Gough, J. (2002) *The SUPERFAMILY database in structural genomics*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58 (Pt 11): 1897-1900.
- Graham, T. A.; Weaver, C.; Mao, F.; Kimelman, D. y Xu, W. (2000) *Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex*. Cell 103 (6): 885-896.
- Griffiths, J.; Murase, K.; Rieu, I.; Zentella, R.; Zhang, Z. L.; Powers, S. J.; Gong, F.; Phillips, A. L.; Hedden, P.; Sun, T. P. y Thomas, S. G. (2006) *Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis*. Plant Cell 18 (12): 3399-3414.
- Gu, T.; Mazzurco, M.; Sulaman, W.; Matias, D. D. y Goring, D. R. (1998) *Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase*. Proc. Natl. Acad. Sci. 95 (1): 382-387.
- Gubler, F.; Chandler, P. M.; White, R. G.; Llewellyn, D. J. y Jacobsen, J. V. (2002) *Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression*. Plant Physiol. 129 (1): 191-200.

- Gubler, F.; Millar, A. A. y Jacobsen, J. V. (2005) *Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 (2): 183-187.
- Guerra, D.; Mastrangelo, A. M.; Lopez-Torrejon, G.; Marzin, S.; Schweizer, P.; Stanca, A. M.; del Pozo, J. C.; Cattivelli, L. y Mazzucotelli, E. (2012) *Identification of a protein network inter-acting with TdRF1, a wheat RING ubiquitin ligase with a protective role against cellular dehydration*. *Plant Physiol.* 158 (2): 777-789.
- Gumbiner, B. M. (1996) *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. *Cell* 84 (3): 345-357.
- Guo, Y. L.; Zhao, X.; Lanz, C. y Weigel, D. (2011) *Evolution of the S-locus region in Arabidopsis relatives*. *Plant Physiol.* 157 (2): 937-946.
- Hauvermale, A.L.; Ariizumi, T. y Steber, C.M. (2014) *The roles of the GA receptors GID1a, GID1b, and GID1c in sly1-independent GA signaling*. *Plant Signal Behav.*, 9, e28030.
- Harberd, N. P. (2003) *Relieving DELLA restraint*. *Science* 299 (5614): 1853-1854.
- Harwood, A. y Coates, J. C. (2004) *A prehistory of cell adhesion*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (5): 470-476.
- Hatakeyama, S.; Yada, M.; Matsumoto, M.; Ishida, N. y Nakayama, K. I. (2001) *U-box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases*. *J. Biol. Chem.* 276 (35): 33111-33120.
- Hatakeyama, S. y Nakayama, K. (2003) *U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (4): 635-645.
- Hatzfeld, M. (1999) *The armadillo family of structural proteins*. *Int. Rev. Cytol.* 186: 179-224.
- Hellmann, H. y Estelle, M. (2002) *Plant development: regulation by protein degradation*. *Science.* 297 (5582): 793-797.
- Hepler, P. K.; Vidali, L. y Cheung, A. Y. (2001) *Polarized cell growth in higher plants*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 159-187.
- Heslop-Harrison, J. (1968a) *Synchronous pollen mitosis and the formation of the generative cell in massulate orchids*. *J. Cell Sci.* 3: 457-466.
- Heslop-Harrison, J. (1968b) *The pollen grain wall*. *Science* 161 (3838): 230-237.
- Heslop-Harrison J. (1975) *The adaptive significance of the exine*. In: Ferguson, J. K. y Muller, J. Eds. *The evolutionary significance of the exine*, Linnean Society Symposium Series 1: 27-37.
- Heslop-Harrison Y. y Shivanna K. R. (1977) *The receptive surface of the angiosperm stigma*. *Annals of Botany* 41: 1233-1258.
- Heslop-Harrison, J. (1979) *Aspects of the structure, cytochemistry and germination of rye (Secale cereal)*. *Suppl. I. Ann. Bot.* 44: 1-47.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G. y Watson, R. (1993) *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Hillis, D. M. (1996) *Inferring complex phylogenies*. *Nature* 383: 130-131.
- Hirano K., Ueguchi-Tanaka M. y Matsuoka M. (2008) *GID1-mediated gibberellin signaling in plants*. *Trends Plant Sci.* 136(1): 192-199.
- Hiratsuka, S.; Hirota, M.; Takahashi, E. y Hirata, N. (1984) *The amount of gibberellin-like substances in pistils when overcome self-incompatibility by bud pollination in Japanese pear*. *Technology Bulletin of the Faculty of Horticulture, Chiba University* 34: 1-7.

- Hirsch, A. M. (1999) *Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides). in legume nodulation.* Curr. Opin Plant Biol. 2 (4): 320-326.
- Hiscock, S. J. y Allen, A. M. (2008) *Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus.* New Phytol. 179 (2): 286-317.
- Hörandl, E. (2008) *Evolutionary Implications of Self-Compatibility and Reproductive Fitness in the Apomictic Ranunculus auricomus Polyploid Complex (Ranunculaceae)* Int. J. Plant Sci. 169 (9): 1219–1228.
- Hotton, S. K. y Callis, J. (2008) *Regulation of cullin RING ligases.* Annu. Rev. Plant Biol. 59: 467-489.
- Hua, Z. y Vierstra, R. D. (2011) *The cullin-RING ubiquitin-protein ligases.* Annu. Rev. Plant Biol. 62: 299-334.
- Huber, O. y Sumper, M. (1994) *Algal-CAMs: isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga Volvox with homology to Drosophila fasciclin I.* EMBO J. 13 (18): 4212-4222.
- Huber, A. H.; Nelson, W. J. y Weis, W. I. (1997) *Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin.* Cell 90 (5): 871- 882.
- Huelsenbeck, J. P. (1995) *The performance of phylogenetic methods in simulation.* Syst. Biol. 44: 17-48.
- Huibregtse, J. M.; Scheffner, M.; Beaudenon, S. y Howley, P. M. (1995) *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase.* Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (11): 5249.
- Hülkamp, M.; Miséra, S. y Jürgens, G. (1994) *Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis.* Cell 76 (3): 555-566.
- Hülkamp, M.; Schneitz, K. y Pruitt, R. E. (1995) *Genetic Evidence for a Long-Range Activity That Directs Pollen Tube Guidance in Arabidopsis.* Plant Cell 7 (1): 57-64.
- Hülken, J.; Birchmeier, W. y Behrens, J. (1994) *E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton.* J. Cell Biol. 127 (6 Pt 2): 2061-2069.
- Hur, Y. J.; Yi, Y. B.; Lee, J. H.; Chung, Y. S.; Jung, H. W.; Yun, D. J.; Kim, K. M.; Park, S. S. y Kim, D.H. (2012) *Molecular cloning and characterization of OsUPS, a U-box containing E3 ligase gene that respond to phosphate starvation in rice (Oryza sativa).* Mol. Biol. Rep. 39 (5): 5883-5888.
- Hussain, A.; Cao, D.; Cheng, H.; Wen, Z. y Peng, J. (2005) *Identification of the conserved serine/threonine residues important for gibberellin-sensitivity of Arabidopsis RGL2 protein.* Plant J. 44 (1): 88-99.
- Igawa, T.; Fujiwara, M.; Takahashi, H.; Sawasaki, T.; Endo, Y.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Fukao, Y. y Yanagawa, Y. (2009) *Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from Arabidopsis seedlings.* J. Exp. Bot. 60 (11): 3067-3073.
- Igic, B.; Lande, R. y Kohn, J. R. (2008) *Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences.* Int. J. Plant Sci. 169: 93-104.
- Ikeda, F. y Dikic, I. (2008) *Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series.* EMBO Rep. 9 (6): 536-542.
- Indriolo, E.; Tharmapalan, P.; Wright, S. I. y Goring, D. R. (2012) *The ARC1 E3 ligase gene is frequently deleted in self-compatible Brassicaceae species and has a conserved role in Arabidopsis lyrata self-pollen rejection.* Plant Cell 24 (11): 4607-4620.

- Indriolo E. y Goring D.R. (2014) *A conserved role for the ARC1 E3 ligase in Brassicaceae self-incompatibility*. Front Plant Sci. 2014; 5: 181.
- Itoh, H.; Sasaki, A.; Ueguchi-Tanaka, M.; Ishiyama, K.; Kobayashi, M.; Hasegawa, Y.; Minami, E.; Ashikari, M. y Matsuoka, M. (2005) *Dissection of the phosphorylation of rice DELLA protein, SLENDER RICE1*. Plant Cell Physiol. 46 (8):1392-1399.
- Iuchi, S.; Suzuki, H.; Kim, Y. C.; Iuchi, A.; Kuromori, T.; Ueguchi-Tanaka, M.; Asami, T.; Yamaguchi, I.; Matsuoka, M.; Kobayashi, M. y Nakajima, M. (2007) *Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal*. Plant J. 50: 958-966.
- Iwano, M.; Shiba, H.; Miwa, T.; Che, F. S.; Takayama, S.; Nagai, T.; Miyawaki, A. y Isogai, A. (2004) *Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of Arabidopsis*. Plant Physiol. 136: 3562-3571.
- Iwano, M.; Igarashi, M.; Tarutani, Y.; Kaothien-Nakayama, P.; Nakayama, H.; Moriyama, H.; Jordan, B. R. (2006) *The Molecular Biology and Biotechnology of Flowering*. CABI. Second Edition. Lincoln University. Canterbury, New Zealand.
- Iwano, M.; Shiba, H.; Matoba, K.; Miwa, T.; Funato, M.; Entani, T.; Nakayama, P.; Shimosato, H.; Takaoka, A.; Isogai, A. y Takayama, S. (2007) *Actin dynamics in papilla cells of Brassica rapa during self- and cross-pollination*. Plant Physiol. 144 (1): 72-81.
- Jürgens, G.; Mayer, U.; Torres Ruiz, R. A.; Berleth, T. y Miséra, S. (1991) *Genetic analysis of pattern formation in the Arabidopsis embryo*. Develop. Suppl. 91: 1: 27-38.
- Kalisz, S.; Vogler, D. W. y Hanley, K. M. (2004) *Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive*. Nature 19 430 (7002): 884-7.
- Kandasamy, M. K.; Thorsness, M. K.; Rundle, S. J.; Goldberg, M. L.; Nasrallah, J. B. y Nasrallah, M. E. (1993) *Ablation of papillar cell function in Brassica flowers results in the loss of stigma receptivity to pollination*. Plant Cell 5 (3): 263-275.
- Kandasamy, M. K.; Nasrallah, J. B. y Nasrallah, M. E. (1994) *Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in Arabidopsis*. Development 120: 3405-3418.
- Kashyap, R. y Gupta, S. C. (1989) *The role of gibberellic-acid in the pollen-pistil interaction in sporophytic self-incompatible systems*. Plant Growth Regulation 8: 137-149.
- Kato, N.; He, H. y Steger, A. P. (2010) *A systems model of vesicle trafficking in Arabidopsis pollen tubes*. Plant Physiol. 152: 590-601.
- Katzmann, D. J.; Sarkar, S.; Chu, T.; Audhya, A. y Emr, S. D. (2004) *Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S*. Mol. Biol. Cell 15 (2): 468-480.
- Kearns, C. A. e Inouye, D. W. (1993) *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot.
- Kemp, B. P. y Doughty, J. (2003) *Just how complex is the Brassica S-receptor complex?* J. Exp. Bot. 54 (380): 157-168.
- Kerhoas, C.; Knox, R. B. y Dumas, C. (1983) *Specificity of the callose response in stigmas of Brassica*. Annals of Botany 52: 597-602.
- Khal, G. y Meksem, K. (2008) *The Handbook of Plant Functional Genomics: Concepts and Protocols*. WILEY-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim.

- Kilian, J.; Whitehead, D.; Horak, J.; Wanke, D.; Weinl, S.; Batistic, O.; D'Angelo, C.; Bornberg-Bauer, E.; Kudla, J. y Harter, K. (2007) *The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses*. Plant J. 50 (2): 347-363.
- Kim, H. U.; Hsich, K.; Ratnayake, C. y Huang, A. H. C. (2002) *A novel group of oleosins is present inside the pollen of Arabidopsis*. J. Biol. Chem. 277 (25): 22677-22684.
- Kim, M.; Cho, H. S.; Kim, M.; Lee, J. H. y Pai, H. S. (2003) *CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, interacts with NtPUB4, an armadillo repeat protein, in tobacco*. Biochim. Biophys. Acta 23 1651 (1-2): 50-59.
- Kim, S.; Choi, H.; Ryu, H.; Park, J.; Kim, M. y Kim, S. (2004a) *ARIA, an Arabidopsis arm repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component*. Plant Physiol. 136 (3): 3639-3648.
- Kim, S.; Kang, J.; Cho, D.; Park, J. y Kim, S. (2004b) *ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance*. Plant J. 40 (1): 75-87.
- Kim, S. J.; Ryu, M. Y. y Kim, W. T. (2012) *Suppression of Arabidopsis RING-DUF1117 E3 ubiquitin ligases, AtRDUF1 and AtRDUF2, reduces tolerance to ABA-mediated drought stress*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 420 (1): 141-147.
- Kim, J. H. y Kim, W. T. (2013) *The Arabidopsis RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP3/LOG2 participates in positive regulation of high-salt and drought stress responses*. Plant Physiol. 162: 1733-1749.
- Kitashiba, H.; Liu, P.; Nishio, T.; Nasrallah, J. B. y Nasrallah, M. E. (2011) *Functional test of Brassica self-incompatibility modifiers in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. 108 (44): 18173-18178.
- Knox, R. B. (1984) *Pollen-pistil interactions*. In: Linskens H. F. y Heslop-Harrison J. Eds.: Encyclopedia of Plant Physiology, Newser., Col. 17, Cellular Interactions, 508-608. Springer-Verlag, Berlin.
- Knox, J. P. (1997) *The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls*. Int. Rev. Cytol. 171: 79-120.
- Ko, J. H.; Yang, S. H. y Han, K. H. (2006) *Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis*. Plant J. 47 (3): 343-355.
- Koegl, M.; Hoppe, T.; Schlenker, S.; Ulrich, H. D.; Mayer, T. U. y Jentsch, S. (1999) *A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly*. Cell 96 (5): 635-644.
- Kojima, T.; Kinoshita, M.; Yamada, T.; Umezaki, S.; Iwaizako, M.; Saito, Y.; Noguchi, K. y Takahara, H. (2013) *Molecular Characterization of a Novel Armadillo Repeat-Like Protein Gene Differentially Induced by High-Salt Stress and Dehydration from the Model Legume Lotus Japonicus*. Plant Mol. Biol. Report. Vol. 31, 3: 698-706.
- Koornneef, M. y van der Veen, J. H. (1980). *Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh*. Theor. Appl. Genet. 58: 257-263.
- Kraft, E.; Stone, S. L.; Ma, L.; Su, N.; Gao, Y.; Lau, O. S.; Deng, X. W. y Callis, J. (2005) *Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis*. Plant Physiol. 139 (4): 1597-1611.
- Kusaba, M.; Dwyer, K.; Hendershot, J.; Vrebalov, J.; Nasrallah, J. B. y Nasrallah, M. E. (2001) *Self-Incompatibility in the genus Arabidopsis: Characterization of the S locus in the outcrossing A. lyrata and its autogamous relative A. thaliana*. Plant Cell 13: 627-643.

- Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227 (5259): 680-685.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J. y Higgins, D. G. (2007) *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics 23 (21): 2947-2948.
- Leducq, J.; Gosset, C. C.; Gries, R., Calin, K. y Schmitt, E. (2014) *Self-incompatibility in Brassicaceae: identification and characterization of SRK-like sequences linked to the S-locus in the tribe Biscutelleae*. G3 (Bethesda) 4 (6): 983-992.
- Lee, J. H. y Kim, W. T. (2011) *Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis*. Mol. Cells 31 (3): 201-208.
- Lee, S.; Jung, J. W.; Park, S. B.; Roh, K.; Lee, S. Y.; Kim, J. H.; Kang, S. K. y Kang, K. S. (2011) *Histone deacetylase regulates high mobility group A2-targeting microRNAs in human cord blood-derived multipotent stem cell aging*. Cell Mol. Life Sci. 68 (2): 325-336.
- Lennon, K. A.; Roy, S., Hepler, P. K. y Lord, E. M. (1998) *The structure of the transmitting tissue of Arabidopsis thaliana (L.) and the path of pollen tube growth*. Sex Plant Reprod. 11: 49-59.
- Letunic, I. y Bork, P. (2007) *Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation*. Bioinformatics 23 (1): 127-128.
- Levin, J. Z. y Meyerowitz, E. M. (1995) *UFO: an Arabidopsis gene involved in both floral meristem and floral organ development*. Plant Cell 7 (5): 529-548.
- Levin, D. A. (1996) *The evolutionary significance of pseudo-self-fertility*. Am. Naturalist 148: 321-332.
- Levins, R. (1969) *Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control*. Bulletin of the Entomological Society of America 15: 237-240.
- Li, H.; Lin, Y.; Heath, R. M.; Zhu, M. X. y Yang, Z. (1999) *Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to the tip-localized calcium influx*. Plant Cell 11 (9): 1731-1742.
- Li, W.; Dai, L. y Wang, G. L. (2012) *PUB13, a U-box/ARM E3 ligase, regulates plant defense, cell death, and flowering time*. Plant Signal Behav. 7 (8): 239-250.
- Libault, M.; Wan, J.; Czechowski, T.; Xu, D.; Udvardi, M. y Stacey, G. (2007) *Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor*. Mol. Plant Microbe Interact. 20: 900-911.
- Liu, P.; Sherman-Broyles, S.; Nasrallah, M. E. y Nasrallah, J. B. (2007) *A cryptic modifier causing transient self-incompatibility in Arabidopsis thaliana*. Curr. Biol. 17 (8): 734-740.
- Liu, C.; Thong, Z. y Yu, H. (2009) *Coming into bloom: The specification of floral meristems*. Development 136 (20): 3379-3391.
- Liu, Y. C.; Wu, Y. R.; Huang, X. H.; Sun, J. y Xie, Q. (2011) *AtPUB19, a U-box E3 ubiquitin ligase, negatively regulates abscisic acid and drought responses in Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant 4 (6): 938-946.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001) *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}*. Method. Methods 25 (4): 402-408.
- Livne, S.; Lor, V. S.; Nir, I.; Eliaz, N.; Aharoni, A.; Olszewski, N. E.; Eshed, Y. y Weiss, D. (2015) *Uncovering DELLA-Independent Gibberellin Responses by Characterizing New Tomato procera Mutants*. Plant Cell 27: 1579-1594.

- Lloyd, C. W. (1987) *The plant cytoskeleton: the impact of fluorescence microscopy*. Annu. Rev. Plant Physiol. 38: 119-139.
- Lord, E. M. y Sanders, L. C. (1992) *Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: a special case of cell movement in plants*. Dev. Biol. 153 (1): 16-28.
- Lord, E. M.; Walling, L. L. y Jauh, G. Y. (1996) *Cell adhesion in plants and its role in pollination*. In Membranes: Specialized Functions in Plants, M. Smallwood, J. P. Knox, y D. J. Bowles. Eds.: Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers 21-37.
- Lord, E. (2000) *Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme*. Trends Plant Sci. 5 (9): 368-373.
- Lou, Y.; Xu, X.; Zhu, J.; Gu, J.; Blackmore, S. y Yang, Z. (2013) *The tapetal AHL family protein TEK determines nexine formation in the pollen wall*. Nat. Commun. 5: 3855
- Luu, D. T.; Heizmann, P.; Dumas, C. y Cappadocia, M. (1997a) *Involvement of SLR1 genes in pollen adhesion to the stigmatic surface in Brassicaceae*. Sexual Plant Reproduction 10: 227-235.
- Luu, D. T.; Heizmann, P. y Dumas, C. (1997b) *Pollen-stigma adhesion in kale is not dependent on the self-(in) compatibility genotype*. Plant Physiol. 115 (3): 1221-1230.
- Luu, D. T.; Passelegue, E.; Dumas, C. y Heizmann, P. (1998) *L'adhrence pollen-stigmate n'est pas spécifique de l'espece au sein de la famille des Brassicacées. Pollen stigma capture is not species specific discriminant within the Brassicaceae family*. Comptes Rendus a l'Academie des Sciences 321: 747-755.
- Luu, D. T.; Marty-Mazars, D.; Trick, M.; Dumas, C. y Heizmann, P. (1999) *Pollen-stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins*. Plant Cell 11 (2): 251-262.
- Lyzenga, W. J. y Stone, S. L. (2011) *Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination*. J. Exp. Bot. 63 (2): 599-616.
- Ma, H. (2005) *Molecular genetic analysis of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants*. Annu. Rev. Plant Biol. 56: 393-434.
- Mable, B. K.; Robertson, A. V.; Dart, S.; Di Berardo, C.; Witham, L. (2005) *Breakdown of self-incompatibility in the perennial Arabidopsis lyrata (Brassicaceae) and its genetic consequences*. Evolution Int. J. Org. Evolution 9: 1437-1448.
- Maheshwari, P. (1950) *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. McGraw-Hill, New York.
- Manzano, C.; Abraham, Z.; López-Torrejón, G. y Pozo, J. C. D. (2008) *Identification of ubiquitinated proteins in Arabidopsis*. Plant Mol. Biol. 68 (1-2): 145-158.
- Marais, G.; Mouchiroud, D. y Duret, L. (2001) *Does recombination improve selection on codon usage? Lessons from nematode and fly complete genomes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5688-92.
- Marín, I. (2013) *Evolution of plant HECT ubiquitin ligases*. PLoS One 8 (7): e68536.
- Mauch-Mani, B. y Mauch, F. (2005) *The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions*. Curr. Opin. Plant Biol. 8 (4): 409-414.
- Mayfield, J. A. y Preuss, D. (2000) *Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17*. Nat. Cell Biol. 2 (2): 128-130.
- Mbengue, M.; Camut, S.; de Carvalho-Niebel, F.; Deslandes, L.; Froidure, S.; Klaus-Heisen, D.; Moreau, S.; Rivas, S.; Timmers, T.; Hervé, C.; Cullimore, J.; McGinnis, K. M.; Thomas, S. G.;

- Soule, J. D.; Strader, L. C.; Zale, J. M.; ping Sun, T. y Steber, C. M. (2010) *The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase*. Plant Cell 15 (3): 1120-1130.
- McGinnis, K. M.; Thomas, S. G.; Soule, J. D.; Strader, L. C.; Zale, J. M.; ping Sun, T. y Steber, C. M. (2003) *The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase*. Plant Cell 15: 1120-1130.
- Meyerowitz, E. (1987) *Arabidopsis thaliana*. Ann. Rev. Genet. 21: 93-111.
- Molinier, J.; Lechner, E.; Dumbliuskas, E. y Genschik, P. (2008) *Regulation and role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress*. PLoS. Genet. 4 (6): e1000093
- Monte, E.; Amador, V.; Russo, E.; Martinez-Garcia, J. y Prat, S. (2003) *PHOR1: A U-Box GA signaling component with a role in proteasome degradation?* J. Plant Growth Regul. 22: 152-162.
- Mudgil, Y.; Shiu, S. H.; Stone, S. L.; Salt, J. N. y Goring, D. R. (2004) *A large complement of the predicted Arabidopsis ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family*. Plant Physiol. 134 (1): 59-66.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) *A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures*. Physiol Plant 15: 473-497.
- Murphy, D. J.; Hernández-Pinzón, I. y Patel, K. (2001) *Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues*. J. Plant Physiol. 158: 471-478.
- Murzin, A. G.; Brenner, S. E.; Hubbard, T. y Chothia, C. (1995) *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. J. Mol. Biol. 247: 536-540.
- Nakajima, M.; Shimada, A.; Takashi, Y.; Kim, Y. C.; Park, S. H.; Ueguchi-Tanaka, M.; Suzuki, H.; Katoh, E.; Iuchi, S.; Kobayashi, M.; Maeda, T.; Matsuoka, M. y Yamaguchi, I. (2006) *Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors*. Plant J. 46 (5): 880-889.
- Naranjo, T. A.; Noguera-Salvá, R. y Fariñas Guerrero, F. (2009) *La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). Extracellular matrix: morphology, function and biotensegrity (part I)*. Rev. Esp. Patol. 4: 249-261.
- Nasrallah, M. E. y Wallace, D. H. (1968) *The influence of modifier genes on the intensity and stability of self-incompatibility in cabbage*. Euphytica 17: 495-503.
- Nasrallah, J. B.; Kao, T. H.; Goldberg, M. L. y Nasrallah, M. E. (1985) *A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from Brassica oleracea*. Nature 318: 263-267.
- Nasrallah, J. B.; Nishio, T. y Nasrallah, M. E. (1991) *The self-incompatibility genes of Brassica: Expression and use in genetic ablation of floral tissues*. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 42: 393-422.
- Nasrallah, J. B. (2000) *Cell-cell signaling in the self-incompatibility response*. Curr. Opin Plant Biol. 3 (5): 368-373.
- Nasrallah, M. E.; Liu, P. y Nasrallah, J. B. (2002) *Generation of self-incompatible Arabidopsis thaliana by transfer of two S locus genes from A. lyrata*. Science 297 (5579): 247-249.
- Nasrallah, M. E.; Liu, P.; Sherman-Broyles, S.; Boggs, N. A. y Nasrallah, J. B. (2004) *Natural variation in expression of self-incompatibility in Arabidopsis thaliana: implications for the evolution of selfing*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (45): 16070-16074.

- Nasrallah, J. B. (2005) *Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility: comparisons to animal histocompatibility*. Trends. Immunol. 26 (8): 412-418.
- Nose, A. y Takeichi, M. (1986) *A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos*. J. Cell Biol. 103 (6 Pt 2): 2649-2658.
- Nou, I. S.; Watanabe M.; Isogai, A. y Hinata, K. (1993) *Comparison of S-alleles and S-glycoproteins between two populations of Brassica campestris in Turkey and Japan*. Sex Plant Reprod. 6: 79-86.
- Nüsslein-Volhard, C. y Wieschaus, E. (1980) *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature 287 (5785): 795-801.
- O'Brien, T. P. y McCully, M. E. (1981) *The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods*. Termacarphi Pty. Ltd. Melbourne.
- Ohi, M. D.; Kooi, C. W. V.; Rosenberg, J. A.; Chazin, W. J. y Gould, K. L. (2003) *Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination*. Nat. Struct. Biol. 10 (4): 250-255.
- Olszewski, N.; Sun, T. P. y Gubler, F. (2002) *Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways*. Plant Cell. 14: 61-80.
- O'Toole, E. T.; Mastronarde, D. N.; Giddings, T. H.; Winey, M.; Burke, D. J. y McIntosh, J. R. (1997) *Three-dimensional analysis and ultrastructural design of mitotic spindles from the cdc20 mutant of Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell 8: 1-11.
- Otu, H. H. y Sayood, K. (2003) *A new sequence distance measure for phylogenetic tree construction*. Bioinformatics. 19 (16): 2122-2130.
- Owen, H. A. y Makaroff, C. A. (1995) *Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae)*. Protoplasma 185: 7-21.
- Palma, K.; Zhang, Y. y Li, X. (2005) *An importin alpha homolog, MOS6, plays an important role in plant innate immunity*. Curr. Biol. 15 (12): 1129-1135.
- Pannell, J. R. y Barrett, S. C. H. (1998) *Baker's law revisited: reproductive assurance in a metapopulation*. Evolution 52: 657-668.
- Park, H. J.; Park, H. C.; Lee, S. Y.; Bohnert, H. J. y Yun, D. J. (2011) *Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers in plants*. J. Plant Biol. 54: 275-285.
- Pavri, R.; Zhu, B.; Li, G.; Trojer, P.; Mandal, S.; Shilatfard, A. y Reinberg, D. (2006) *Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II*. Cell 125: 703-717.
- Pearson, W. R. (2013) *An introduction to sequence similarity ("homology") searching*. Curr. Protoc. Bioinformatics. 42: 3.1.1-3.1.8.
- Peña, C.; Sören, N. y Niklas, W. (2011) *The radiation of Satyrini butterflies (Nymphalidae: Satyrinae): a challenge for phylogenetic methods*. Zoological J. Linnean Society. 161: 64-87.
- Peng, J. (1999) *'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators*. Nature 400: 256-261.
- Peng, J. y Harberd, N. P. (2002) *The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination*. Curr. Opin. Plant Biol. 5: 376-381.

- Pharis, R. P. y King, R. W. (1985) *Gibberellins and reproductive development in seed plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. 36: 517-568.
- Pintard, L.; Willems, A. y Peter, M. (2004) *Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family*. EMBO J. 23 (8): 1681-1687.
- Podila, G. D.; Rogers, L. M. y Kolattukudy, P. E. (1993) *Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Phys. 103: 267-272.
- Preuss, D.; Lemieux, B.; Yen, G. y Davis, R. W. (1993) *A conditional sterile mutation eliminates surface components from Arabidopsis pollen and disrupts cell signaling during fertilization*. Genes Dev. 7 (6): 974-985.
- Pruitt, R. E. y Hülskamp, M. (1994) *From pollination to fertilization in Arabidopsis*. In *Arabidopsis*. Ed.: E. M. Meyerowitz and C. R. Somerville. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Punt, W.; Hoen, P. P.; Blackmore, S.; Nilsson, S.; Le Thomas, A. (2007) *Glossary of pollen and spore terminology*. Review of Palaeobotany and Palynology 143: 1-81.
- Pysh, L. D.; Wysocka-Diller, J. W.; Camilleri, C.; Bouchez, D. y Benfey, P. N. (1999) *The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes*. Plant J. 18: 111-119.
- Raab, S.; Drechsel, G.; Zarepour, M.; Hartung, W.; Koshiba, T.; Bittner, F. y Hoth, S. (2009) *Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in Arabidopsis*. Plant J. 59: 39-51.
- Raeymaekers, L. (2000) *Basic principles of quantitative PCR*. Mol Biotechnol. 15: 115-122.
- Rambuda, T. D. y Johnson, S. D. (2004) *Breeding systems of invasive alien plants in South Africa: does Baker's rule apply?* Divers Distrib. 10: 409-416.
- Rea, A.C.; Liu, P. y Nasrallah, J. B. (2010) *Atransgenic self-incompatible Arabidopsis thaliana model for evolutionary and mechanistic studies of crucifer self-incompatibility*. J. Exp. Bot. 61: 1897-1906.
- Rédei, G. P. (1970) *Arabidopsis thaliana*. Heynh. A review of the genetic and biology. Bibliogr. Genet. 20: 1-151.
- Riggleman, B.; Wieschus, E. y Schedl, P. (1989) *Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene*. Genes Dev. 3: 96-113.
- Roberts, I. N.; Gaude, T. C, Harrod, G. y Dickinson, H. G. (1983) *Pollen-stigma interactions in Brassica oleracea: a new pollen germination medium and its use in elucidating the mechanism of self-incompatibility*. Theor. appl. Genet. 65: 231-238.
- Roberts, I. N.; Harrod, G. y Dickinson, H. G. (1984) *Pollen-stigma interactions in Brassica oleracea. I. Ultrastructure and physiology of the stigmatic papillar cells*. J. Cell Sci. 66: 241-253.
- Roberts, K. (1994) *The plant extracellular matrix: in a new expansive mood*. Curr. Opin. Cell Biol. 6 (5): 688-94.
- Roggen, H. P. J. R. y Van Dijk, A. J. (1973) *Electric aided and bud pollination: which method to use dor self-seed production in cole crops (Brassica oleraceae L.)?* Euphytica. 22: 260-263.
- Rubinstein, A. L.; Broadwater, A. H.; Lowrey, K. B. y Bedinger, P. A. (1995) *Pex1, a pollen-specific gene with an extensin-like domain*. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3086-3090.

- Rushton, P. J.; Macdonald, H.; Huttly, A. K.; Lazarus, C. M. y Hooley, R. (1995) *Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes*. *Plant Mol. Biol.* 29: 691-702.
- Ruzin, S. E. (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford, New York: Oxford University Press, Cambridge.
- Sáenz Laín, C. (2004) *Glosario de términos palinológicos*. *Lazaroa* 25: 93-112.
- Safavian, D. y Goring, D. R. (2013) *Secretory activity is rapidly induced in stigmatic papillae by compatible pollen, but inhibited for self-incompatible pollen in the Brassicaceae*. *PLoS One* 8: e84256.
- Safavian, D.; Jamshed, M.; Sankaranarayanan, S.; Indriolo, E.; Samuel, M. A. y Goring, D. R. (2014) *High humidity partially rescues the Arabidopsis thaliana exo70A1 stigmatic defect for accepting compatible pollen*. *Plant Reprod.* 27: 121-127.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987) *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sakata, T.; Oda, S.; Tsunaga, Y.; Shomura, H.; Kawagishi-Kobayashi, M.; Aya, K.; Saeki, K.; Endo, T.; Nagano, K.; Kojima, M.; Sakakibara, H.; Watanabe, M.; Matsuoka, M. y Higashitani, A. (2014) *Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice*. *Plant Physiol.* 164: 2011-2019.
- Salt, J. N.; Yoshioka, K.; Moeder, W. y Goring, D. R. (2011) *Altered germination and subcellular localization patterns for PUB44/SAUL1 in response to stress and phytohormone treatments*. *PLoS One.* 6: e21321.
- Sambrook, J.; Fritschi, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook, D. W. y Russell, J. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Printed in the United States of America.
- Samuel, M. A.; Salt, J. N.; Shiu, S. H. y Goring, D. R. (2006) *Multifunctional arm repeat domains in plants*. *Int. Rev. Cytol.* 253: 1-26.
- Samuel, M. A.; Mudgil, Y.; Salt, J. N.; Delmas, F.; Ramachandran, S.; Chilelli, A. y Goring, D. R. (2008) *Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligases suggest a conserved signaling pathway in Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147: 2084-2095.
- Samuel, M. A.; Chong, Y. T.; Haasen, K. E.; Aldea-Brydges, M. G.; Stone, S. L. y Goring, D. R. (2009) *Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in Brassica and Arabidopsis stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex*. *Plant Cell* 21: 2655-2671.
- Sander, C. y Schneider, R. (1991) *Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment*. *Proteins* 9: 56-68.
- Sasaki, A.; Itoh, H.; Gomi, K.; Ueguchi-Tanaka, M.; Ishiyama, K.; Kobayashi, M.; Jeong, D. H.; An, G.; Kitano, H.; Ashikari, M. y Matsuoka, M. (2003) *Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant*. *Science* 299 1896-1898.
- Satoh, S. (1998) *Functions of the cell wall in the interaction of plant cells: Analysis using carrot cultured cells*. *Plant Cell Physiol.* 39: 361-368.
- Sauer, M.; Paciorek, T.; Benková, E. y Friml, J. (2006) *Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants*. *Nat. Protoc.* 1 (1): 98-103.

- Schiefelbein, J. W. y Somerville, C. (1990) *Genetic Control of Root Hair Development in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 2: 235-243.
- Schnell, J. D. y Hicke, L. (2003) *Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins*. J. of Biol. Chemistry 278: 35857-35860.
- Schopfer, C. R.; Nasrallah, M. E. y Nasrallah, J. B. (1999) *The male determinant of self-incompatibility in Brassica*. Science 286: 1697-1700.
- Schulman, B. A. (2011) *Twists and turns in ubiquitin-like protein conjugation cascades*. Protein Sci. 20: 1941-1954.
- Scott, R.; Hodge, R.; Paul, W. y Draper, J. (1991) *The molecular biology of anther differentiation*. Plant Sci. 80: 167-191.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J.; Nanjo, T.; Fujita, M.; Oono, Y.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A.; Sakurai, T.; Satou, M.; Akiyama, K.; Taji, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Kawai, J.; Hayashizaki, Y. y Shinozaki, K. (2002) *Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray*. Plant J. 31: 279-292.
- Seo, D. H.; Ryu, M. Y.; Jammes, F.; Hwang, J. H.; Turek, M.; Kang, B. G.; Kwak, J. M. y Kim, W. T. (2012) *Roles of four Arabidopsis U-box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of ABA-mediated drought stress responses*. Plant Physiol. 160: 556-568.
- Seymour, G. B.; Tucker, G. y Leach, L. (2004) *Cell adhesion molecules in plants and animals*. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 21: 123-132.
- Sharma, M.; Singh, A.; Shankar, A.; Pandey, A.; Baranwal, V.; Kapoor, S.; Tyagi, A. K. y Pandey, G. K. (2014) *Comprehensive expression analysis of rice Armadillo gene family during abiotic stress and development*. DNA Res. 21: 267-283.
- Shavrukov, Y. (2013) *Salt stress or salt shock: which genes are we studying?* J. Exp. Bot. 64: 119-127.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) *Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways*. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 217-223.
- Shinozaki, K.; Carninci, P.; Kawai, J.; Hayashizaki, Y. y Shinozaki, K. (2002) *Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray*. Plant J. 31: 279-292.
- Singh, K. B., Foley, R. C. y Onate-Sanchez, L. (2002) *Transcription factors in plant defense and stress responses*. Curr. Opin. Plant Biol. 5: 430-436.
- Sinha, N., y Lynch, M. (1998) *Fused organs in the adherent1 mutation in maize show altered epidermal walls with no perturbations in tissue identities*. Plant 206: 184-195.
- Sitte, H.; Neumann, K.; y Edlmann, L. (1989) *Cryofixation and cryosubstitution for routine work in transmission electron microscopy*. In "Science of Biological Specimen preparation". Ed.: A. M. F. O'Hare. Chicago: SEM Inc.
- Smalle, J. y Vierstra, R. D. (2004) *The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway*. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 555-590.
- Smyth, D. R.; Bowman, J. L. y Meyerowitz, E. M. (1990) *Early flower development in Arabidopsis*. Plant Cell 2: 755-767.

- Sorensen, M. B.; Mayer, U.; Lukowitz, W. (2002) *Cellularization in the endosperm of Arabidopsis thaliana is coupled to mitosis and shares multiple components with cytokinesis*. Development 129: 5567-5576.
- Soto, G.; Stritzler, M.; Lisi, C.; Alleva, K.; Pagano, M. E.; Ardila, F.; Mozzicafreddo, M.; Cuccioloni, M.; Angeletti, M. y Ayub, N. D. (2011) *Acetoacetyl-CoA thiolase regulates the mevalonate pathway during abiotic stress adaptation*. J. Exp. Bot. 62 (15):5699-5711.
- Spielman, M.; Preuss, D.; Li F. L.; Brown, W. E.; Scott R. J. y Dickinson, H. G. (1997) *TETRASPORE is required for male meiotic cytokinesis in Arabidopsis thaliana*. Development 124: 2645-2657.
- Stanley, R. G. y Linskens, H. F. (1974) *Pollen biology, biochemistry, management*. Springer, Berlin/Heidelberg/ New York.
- Stead, A. D. (1992) *Pollination-induced flower senescence: a review*. Plant Growth Regulation. 11: 13-20.
- Stein, J. C.; Howlett, B.; Boyes, D. C.; Naerallah, M. E. y Nasrallah, J. B. (1991) *Molecular cloning of a putative receptor kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of Brassica oleracea*. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8816-8820.
- Stephenson, A. G.; Doughty, J.; Dixon, S.; Elleman, C.; Hiscock, S. y Dickinson, H. G. (1997) *The male determinant of self-incompatibility in Brassica oleracea is located in the pollen coating*. Plant J. 12: 1351-1359.
- Stone, S. L.; Arnoldo, M. y Goring, D. R. (1999) *A breakdown of Brassica self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants*. Science 286: 1729-1731.
- Stone, S. L.; Anderson, E. M.; Mullen, R. T. y Goring, D. R. (2003) *ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen*. Plant Cell 15: 885-898.
- Stone, S. L.; Hauksdottir, H.; Troy, A.; Herschleb, J.; Kraft, E. y Callis, J. (2005) *Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis*. Plant Physiol. 137: 13-30.
- Stone, S. L. (2014) *The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling*. Front. Plant Sci. 5: 135.
- Strader, L. C.; Ritchie, S.; Soule, J. D.; McGinnis, K. M. y Steber, C. M. (2004) *Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY*. Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 12771-12776.
- Strimmer, K. y von Haeseler, A. (1996) *Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies*. Mol. Biol. and Evol. 13:964-969.
- Sun, T. P. y Gubler, F. (2004) *Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants*. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 197-223.
- Sunkar, R.; Bartels, D. y Kirch, H. H. (2003) *Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from Arabidopsis thaliana in transgenic plants improves stress tolerance*. Plant J. 35: 452-464.
- Takayama, S. y Isogai, A. (2003) *Molecular mechanism of self-recognition in Brassica self-incompatibility*. J. Exp. Bot. 54: 149-156.
- Tanaka, Y.; Tanaka, N.; Saeki, Y.; Tanaka, K.; Murakami, M.; Hirano, T.; Ishii, N. y Sugamura, K. (2008) *c-Cbl-dependent monoubiquitination and lysosomal degradation of gp130*. Mol. Cell. Biol. 28: 4805-4818.
- Thomas, S. G.; Rieu, I. y Steber, C. M. (2005) *Gibberellin metabolism and signaling*. In: *Vitamins and Hormones*. Vol. 72 (ed. G. Litwack) 289-337. Elsevier, London.

- Thomas, S. G. y Sun, T. P. (2004) *Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short*. Plant Physiol. 1:668-676.
- Thompson, B. E. y Hake, S. (2009) *Translational biology: from Arabidopsis flowers to grass inflorescence architecture*. Plant Physiol. 149: 38-45.
- Toufighi, K.; Brady, S. M.; Austin, R.; Ly, E. y Provard, N. J. (2005) *The Botany Array Resource: e-Northerns, Expression Angling, and promoter analyses*. Plant J. 43: 153-163.
- Tripathi, S. K. y Tuteja, N. (2007) *Integrated signaling in flower senescence: an overview*. Plant Signal Behav. 2: 437-445.
- Tsuchimatsu, T.; Suwabe, K.; Shimizu-Inatsugi, R.; Isokawa, S.; Pavlidis, P.; Städler, T.; Suzuki, G.; Takayama, S.; Watanabe, M. y Shimizu, K. K. (2010) *Evolution of self-compatibility in Arabidopsis by a mutation in the male specificity gene*. Nature 464: 1342-1346.
- Tyler, L.; Thomas, S. G. y Hu, J. (2004) *DELLA Proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis*. Plant Physiology 135: 1008-1019.
- Ueguchi-Tanaka, M.; Ashikari, M.; Nakajima, M.; Itoh, H.; Katoh, E.; Kobayashi, M.; Yuan Chow, T.; ie C Hsing, Y.; Kitano, H.; Yamaguchi, I. y Matsuoka, M. (2005) *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin*. Nature 437: 693-698.
- Vallejo-Marín, M. y Uyenoyama, M. K. (2004) *On the evolutionary costs of self-incompatibility: incomplete reproductive compensation due to pollen limitation*. Evolution 58: 1924-1935.
- van Doorn, W. G. (1997) *Effects of pollination on floral attraction and longevity*. J. Exp. Botany. 48: 1615-1622.
- van Mourik, S.; van Dijk, A. D.; de Gee, M.; Immink, R. G.; Kaufmann, K.; Angenent, G. C.; van Ham, R. C. y Molenaar, J. (2010) *Continuous-time modeling of cell fate determination in Arabidopsis flowers*. BMC Syst. Biol. 4:101-4.
- Vierstra, R. D. (2009) *The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10: 385-397.
- Vogelmann, K.; Drechsel, G.; Bergler, J.; Subert, C.; Philippar, K.; Soll, J.; Engelmann, J. C.; Engelsdorf, T.; Voll, L. M. y Hoth, S. (2012) *Early senescence and cell death in Arabidopsis saul1 mutants involves the PAD4-dependent salicylic acid pathway*. Plant Physiol. 159: 1477-1487.
- Vogelmann, K.; Subert, C.; Danzberger, N.; Drechsel, G.; Bergler, J.; Kotur, T.; Burmester, T. y Hoth, S. (2014) *Plasma membrane-association of SAUL1-type plant U-box armadillo repeat proteins is conserved in land plants*. Front. Plant Sci. 5: 37.
- Vreeland, V.; Wait, J. H. y Epstein, L. (1998) *Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels* 34: 1-8.
- Wang, J.; Qu, B.; Dou, S.; Li, L.; Yin, D.; Pang, Z.; Zhou, Z.; Tian, M.; Liu, G.; Xie, Q.; Tang, D.; Chen, X. y Zhu, L. (2015) *The E3 ligase OsPUB15 interacts with the receptor-like kinase PID2 and regulates plant cell death and innate immunity*. BMC Plant Biol. 15: 49.
- Weigel, D. y Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Weiss, D. y Ori, N. (2007) *Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones*. Plant Physiol. 144: 1240-1246.
- Wheeler, M. J.; Franklin-Tong, V. E. y Franklin, F. C. H. (2001) *The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions*. New Phytol. 151: 565-584.

- Wiborg, J.; O'Shea, C. y Skriver, K. (2008) *Biochemical function of typical and variant Arabidopsis thaliana U-box E3 ubiquitin-protein ligases*. *Biochem. J.* 413: 447-457.
- Wilhelmi, L. K. y Preuss, D. (1996) *Self-sterility in Arabidopsis due to defective pollen tube guidance*. *Science* 274: 1535-1537.
- Willats; Steele-King; Marcus y Knox (1999) *Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation*. *Plant J.* 20: 619-628.
- Wilson, S. M. y Bacic, A. (2012) *Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes*. *Nat. Protoc.* 7: 1716-1727.
- Wolters-Arts, M.; Lush, W. M. y Mariani, C. (1998) *Lipids are required for directional pollen-tube growth*. *Nature* 392: 818-821.
- Wustman, L. y Wetherbee y Gretz (1998) *Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). Iii. Organization Of fucoglucuronogalactans within the adhesive stalks of achnanthes longipes*. *Plant Physiol.* 116: 1431-1441.
- Xing, S.; Li, M. y Liu, P. (2013) *Evolution of S-domain receptor-like kinases in land plants and origination of S-locus receptor kinases in Brassicaceae*. *BMC Evol. Biol.* 13: 69.
- Yakabe, R.; Entani, T.; Shimosato-Asano, H.; Ueki, M.; Tamiya, G. y Takayama, S. (2014) *A pollen coat-inducible autoinhibited Ca²⁺-ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae*. *Plant Cell* 26 (2): 636-649.
- Yamamoto, Y.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. y Noguchi, T. (2003) *Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44: 1192-1201.
- Yamamoto, M. y Nishio, T. (2014) *Commonalities and differences between Brassica and Arabidopsis self-incompatibility*. *Horticulture Research* 1: 14054.
- Yan, S. P.; Zhang, Q. Y.; Tang, Z. C.; Su, W. A. y Sun, W. N. (2006) *Comparative proteomic analysis provides new insights into stress responses in rice*. *Mol. Cell Prot.* 5: 3-9.
- Yang, C. W.; Gonzalez-Lamothe, R.; Ewan, R. A.; Rowland, O.; Yoshioka, H.; Shenton, M.; Ye, H.; O'Donnell, E.; Jones, J. D. y Sadanandom, A. (2006) *The E3 ubiquitin ligase activity of Arabidopsis PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense*. *Plant Cell* 18: 1084-1098.
- Yang, G.; Gao, P.; Zhang, H.; Huang, S. y Zheng, Z. L. (2007) *A mutation in MRH2 kinesin enhances the root hair tip growth defect caused by constitutively activated ROP2 small GTPase in Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2:e1074.
- Yano, K. (2009) *CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume–Rhizobium symbiosis*. *Plant J.* 60: 168-180.
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S. y Madden, T. L. (2012) *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- Yee, D. y Goring, D. R. (2009) *The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates*. *J. Exp. Bot.* 60: 1109-1121.
- Yee, D. (2011) *The Expanding Diversity of Plant U-box E3 Ubiquitin Ligases in Arabidopsis: Identifying AtPUB18 and AtPUB19 Function during Abiotic Stress*

Responses. https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/26265/1/Yee_Donna_201011_PhD_thesis.pdf

You, M. K.; Shin, H. Y.; Kim, Y. J.; Ok, S. H.; Cho, S. K.; Jeung, J. U.; Yoo, S. D.; Kim, J. K. y Shin, J. S. (2010) *Novel bifunctional nucleases, OmBBD and AtBBD1, are involved in abscisic acid-mediated callose deposition in Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152: 1015-1029.

Yuda, E.; Nakagawa, S.; Matsui, H.; Wada, K. y Imai, T. (1981) *The effect of 15- β -OH gibberellins on the fruit set and development of pears*. *HortScience* 16: 436.

Zarsky, V.; Kulich, I.; Fendrych, M. y Pecenkova, T. (2013) *Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways*. *Current Opinion in Plant Biology* 16:726-733.

Zawaski, C.; Ma, C.; Strauss, S. H.; French, D.; Meilan, R. y Busov, V. B. (2012) *PHOTOPERIOD RESPONSE 1 (PHOR1)-like genes regulate shoot/root growth, starch accumulation, and wood formation in Populus*. *J. Exp.Bot.* 63 (15): 5623-5634.

Zeng, L. R.; Qu, S.; Bordeos, A.; Yang, C.; Baraoidan, M.; Yan, H.; Xie, Q.; Nahm, B. H.; Leung, H. y Wang, G. L. (2004) *Spotted leaf11, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity*. *Plant Cell* 16: 2795-2808.

Zeng, L. R.; Park, C. H.; Venu, R. C.; Gough, J. y Wang, G. L. (2008) *Classification, expression pattern, and E3 ligase activity assay of rice U-box-containing proteins*. *Mol. Plant* 1: 800-815.

Zhang, X.; Garreton, V. y Chua, N. H. (2005) *The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation*. *Genes Dev.* 19: 1532-1543.

Zhang, Y.; Yang, C.; Li, Y.; Zheng, N.; Chen, H.; Zhao, Q.; Gao, T.; Guo, H. y Xie, Q. (2007) *SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1912-1929.

Zheng, N.; Schulman, B. A. y Song, L. (2002) *Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex*. *Nature* 416: 703-709.

Zhu, J.; Gong, Z.; Zhang, C.; Song, C.-P.; Damsz, B.; Inan, G.; Koiwa, H.; Zhu, J.-K.; Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. (2002) *OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress*. *Plant Cell* 14: 3009-3028.

Zinkl, G. M.; Zwiebel, B. I.; Grier, D. G. y Preuss, D. (1999) *Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine*. *Development.* 126: 5431-5440.