



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Conservación funcional parcial de los genes de la función B de *Lacandonia schismatica* en
Arabidopsis thaliana

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

EDUARDO FLORES SANDOVAL

**DIRECTORA DE TESIS: MARÍA ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES
COTUTORA: ADRIANA GARAY ARROYO**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Flores
Sandoval
Eduardo
56559730
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
401049701

Datos del tutor

Dra
Álvarez-Buylla
Roces
María Elena

Datos del co-tutor

Dra
Garay
Arroyo
Adriana

Datos del sinodal 1

Dra
García
Ponce de León
Berenice

Datos del sinodal 2

Dr
Piñero
Dalmau

Datos del sinodal 3

Biol
Vázquez-Lobo
Yuren
Alejandra

Datos del Trabajo Escrito.

Conservación funcional parcial de los genes de la función B de *Lacandonia schismatica* en *Arabidopsis thaliana*
87 p.
2007

*...convince evolutionists that evolution is not only
a statistical genetical problem but also one of
the developmental potentialities of the organism*

R. Goldschmidt, 1951

We believe that punctuational change dominates the history of life...

S.J. Gould & N. Eldredge, 1977

*...But a large mutation, a drastic freakish, revolutionary change,
is equivalent to a mad leap into the wild blue yonder*

R. Dawkins, 1986

*...it should be noted that the mutations described here
resemble similar, perhaps homologous,
mutations in other species of plants*

J. Bowman, D. Smyth & E. Meyerowitz, 1989

AGRADECIMIENTOS

A Elena Álvarez-Buylla Roces, por darme una oportunidad cuando toqué a su puerta con curiosidad pero con absoluta ignorancia. Por darme el regalo de la investigación independiente y ser ejemplo de un quehacer científico comprometido con el país. Por la paciencia y la ayuda para clarificar las decisiones del futuro.

A Adriana Garay Arroyo por haberme guiado y haber hecho conmigo los experimentos expuestos en esta tesis. Su entusiasmo constante le dio fluidez a este proyecto. Le agradezco las reuniones de los lunes, las discusiones experimentales, la música, las charlas y la energía en las mañanas para avanzar con pasos de gigante.

A Berenice García Ponce de León por enseñarme el rigor científico y a trabajar con orden en la investigación. Por el tiempo para enseñar y compartir lo mucho que sabe. Por la energía y consejos de las tardes.

A Francisco Vergara Silva, por confiarme su conocimiento, su trabajo y el primer experimento de mi vida.

A Enrique Ortiz Moreno, por enseñarme a Mendel, por su paciencia y su música. Por la energía en las noches.

A Rigoberto Pérez Ruiz por enseñarme a hacer cruza y a obtener los genes de una planta.

A Alejandra Vázquez-Lobo y Daniel Piñero por revisar ésta tesis, iniciarme en el análisis evolutivo y aceptarme dentro de su taller.

A Silvia Espinosa Matías del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias (UNAM) quien tomó las fotos de MEB expuestas en esta tesis, por su apoyo y guianza en el mundo secreto de lo diminuto.

A Laura M. Márquez del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología (UNAM) por su apoyo en la secuenciación de diversas reacciones obtenidas para esta tesis.

A Rosalinda Tapia López, Anidia Blanco Jarvio, Alma Piñeyro Nelson, Mitzi Villajuana Bonequi,

Marcelina García Aguilar, Maria Zaharieva y Armando Bravo, por enseñarme a usar las manos en el laboratorio y no morir en el intento.

A Mariana Benítez y Carlos Espinosa por explicarme la complejidad. Por la crítica inteligente y constructiva y darme perspectivas diferentes acerca de la naturaleza de la vida.

A John L. Bowman por compartir su sabiduría y darme un espacio para iniciar algo que no sabía como iniciar. Por su hospitalidad, entusiasmo y amistad en tiempos de cambio.

A la banda del Laboratorio que me tocó y que me ofreció su amistad y compañerismo: Adrianas, Almas, Álvaro, Aida, Andrea, Anidia, Bere, Carlos, Elena, Enrique, Eric, Gerardo, Gretel, José, Marce, Mariana, Mitzi, Nayelli, Rigo, Rosalinda, Sinué, Stefan, (y los nuevos! David, Karla, Abril, Mario y Miguel).

A la Comunidad Chol de Frontera Corozal, Chiapas. A Florencio y en especial a Don Gabriel por su ayuda en la colecta de *Lacandonia schismatica*.

A la banda de biólogos y no biólogos de la Facultad de Ciencias, que saben quienes son! Los quiero mucho. Les doy las gracias por su amistad sincera, por compartir su inteligencia, su compromiso social, su amor por la naturaleza, por ayudarme a estudiar para los exámenes, por suavizar mi seriedad y timidez y mostrarme una cara feliz de la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y los Profesores de la Facultad de Ciencias, por formar a un biólogo seguro de su profesión.

DEDICATORIA

A mis padres, que me enseñaron a labrar la tierra con respeto. Por hacerme entender que el esfuerzo se cosecha, pero que también es una flor en sí. Por su apoyo incondicional y su amor.

A Rubén y a Samuel, que me enseñaron a leer, a escribir y a pensar. Capitanes que guían, que extraño y que admiro.

A mis amig@s, que me enseñaron a sentir.

A la ex - banda del setenta y seis (y anexos), que me enseñaron la música.

A l@s que están lejos...

A la Selva y a su gente, que hicieron posible todo esto.

Índice

Resumen.....	I
Agradecimientos.....	III
Abreviaturas.....	V
Índice.....	VI
Prefacio.....	1
Introducción.....	3
<i>Lacandonia schismatica</i> (Triuridaceae).....	3
<i>La homeosis en los dos linajes más antiguos de monocotiledóneas</i>	5
Los ejes reproductivos de <i>Lacandonia schismatica</i> : ¿flores o inflorescencias?.....	7
Figura 1. Hipótesis de ubicación de la familia Triuridaceae dentro del orden Pandanales	12
Sistema modelo en angiospermas: <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
El modelo ABC de determinación de identidad de órganos florales.....	14
Figura 2. Modelo ABC de identidad de órganos florales.....	17
La familia de genes MADS-box en Plantas.....	18
Genes B de identidad de órganos florales en monocotiledóneas y variaciones en el modelo ABC.....	19
Las gramíneas y la conservación de la función B.....	20
Los casos en Liliaceae y pequeñas variantes del modelo ABC.....	23
¿Qué pasa con los tépalos?.....	24
Los genes B de las Orquídeas muestran mayor divergencia funcional.....	26
<i>LsAP3</i> y <i>LsPI</i> de <i>Lacandonia schismatica</i> se expresan conjuntamente en el centro de la flor...29	
Objetivos e hipótesis.....	31
Figura 3. ¿Genes B de <i>L. schismatica</i> y <i>A. thaliana</i> funcionalmente conservados?.....	33
Métodos.....	34
Análisis genotípico de líneas de complementación y de sobreexpresión.....	35
Análisis fenotípico de líneas de complementación y sobreexpresión.....	36
Obtención de líneas de complementación quiméricas en fondos mutantes.....	37
Resultados.....	40
Conservación funcional de <i>LsPI</i> al sobreexpresarse en <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
Figura 4. Sobreexpresión de <i>LsPI</i> en fondo <i>wt</i> y <i>pi-1</i> de <i>A. thaliana</i>	42
Conservación funcional parcial de <i>LsAP3</i> al sobreexpresarse en <i>Arabidopsis thaliana</i>	43

Figura 5. Sobreexpresión de <i>LsAP3</i> en fondo <i>wt</i> y <i>ap3-3</i> de <i>A. thaliana</i>	45
Figura 6. Fenotipos florales de líneas de sobreexpresión en fondo silvestre y mutante	46
Figura 7. Fenotipos florales de líneas de sobreexpresión en fondo silvestre y mutante (MEB)	47
Figura 8. Expresión de genes B de <i>L. schismatica</i> en líneas de sobreexpresión	48
Sobreexpresión simultanea de <i>LsAP3</i> y <i>LsPI</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
Tabla 1	49
Tabla 2	50
Construcciones quiméricas sin complementación en fondos mutantes sencillos y putativa conservación de un heterodímero funcional en <i>L. schismatica</i>	50
Figura 9. Controles de complementación usando construcciones quiméricas en <i>A. thaliana</i>	53
Figura 10. Fenotipos florales de construcciones quiméricas con genes B de <i>L. schismatica</i>	54

Discusión.....	55
-----------------------	-----------

Conclusiones y Perspectivas.....	62
---	-----------

Apéndices.....	67
-----------------------	-----------

Clonación e identificación de genes homólogos a AGAMOUS a partir de experimentos de 3'RACE....	64
Obtención de secuencias de 18S gDNA y ATPA mitocondrial para <i>Soridium spruceanum</i> (Triuridaceae), <i>Pentastemona egregia</i> y <i>Pentastemona sumatrana</i> (Stemonaceae).....	66

Referencias.....	71
-------------------------	-----------

ABREVIATURAS

wt	Tipo Silvestre
CaMV	Virus del Mosaico de la Coliflor
DNA	Ácido Desoxirribunocléico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
cDNA	DNA sintetizado a partir de una Retro-Transcripción
AP1	APETALA 1
AP2	APETALA 2
AP3	APETALA 3
PI	PISTILLATA
AG	AGAMOUS
DEF	DEFICIENS, ortólogo de AP3 de <i>Antirrhinum majus</i>
GLO	GLOBOSA, ortólogo de PI de <i>Antirrhinum majus</i>
LsAP3	Gen ortólogo de AP3 de <i>Lacandonia schismatica</i>
LsPI	Gen ortólogo de PI de <i>Lacandonia schismatica</i>
LsAG1	Gen ortólogo de AG de <i>Lacandonia schismatica</i>
LsAG2	2da copia homóloga de AGAMOUS de <i>Lacandonia schismatica</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a partir de una Retro-transcripción
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
MS	Murashige/ Skoog
Kan	Kanamicina
gDNA	DNA genómico
RACE	Amplificación Rápida de extremos de DNA complementarios
pb	Pares de bases nucleotídicas

Nota Genes se escriben en cursivas y proteínas en letra normal

RESUMEN

Este trabajo está encaminado a entender las causas próximas que subyacen a la morfología floral homeótica de *Lacandonia schismatica*: Una monocotiledónea mexicana endémica a la Selva Lacandona que posee 3 estambres centrales rodeados de numerosos carpelos y 6 órganos de perianto denominados tépalos. Este arreglo floral está fijado en las poblaciones naturales de la especie y ofrece una gran oportunidad para entender el papel que tienen las mutaciones homeóticas en la generación de nuevas especies (Vergara-Silva *et al*, 2003).

El objetivo del trabajo es conocer el grado de conservación de las secuencias de cDNA de los genes MADS-box tipo B de *L. schismatica* (*LsAP3* y *LsPI*) y aquellos de la planta experimental modelo *Arabidopsis thaliana*. Estos genes codifican para factores de transcripción y pertenecen a una familia multigénica llamada MADS-box. En particular pertenecen al linaje *DEF/AP3* y *GLO/PI*, respectivamente (Kramer *et al*, 1998). En la planta modelo *A. thaliana*, *AP3* y *PI* determinan la identidad de pétalos y estambres al interactuar con los genes tipo A y C, respectivamente de acuerdo al modelo combinatorio ABC de identidad de órganos florales. Mutaciones en estos genes en *A. thaliana* producen fenotipos homeóticos en los que los pétalos se sustituyen por sépalos y los estambres por carpelos (Bowman *et al*, 1989).

Resultados previos para los patrones de expresión de los genes B de *L. schismatica* durante su desarrollo floral, sugerían que la homeosis observada en esta especie se debe a una expresión conjunta de los genes B en el centro de la flor (Vergara-Silva & Álvarez-Buylla, Com. Personal). Esta sería la causa proximal más sencilla para explicar la apomorfía floral de *L. schismatica* sí y sólo si, las secuencias codificantes de *LsAP3* y *LsPI* tienen funciones conservadas con respecto a las de *A. thaliana*.

Para probar esta hipótesis analizamos líneas transgénicas de *A. thaliana* creadas por la Dra. Barbara Ambrose que expresan *LsPI* y *LsAP3* bajo la dirección del promotor de sobreexpresión 35S del CaMV y los promotores endógenos de *AP3* y *PI* tanto en fondos mutantes como silvestre.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la sobreexpresión de *LsPI* en *A. thaliana* puede determinar identidad de estambres y pétalos tanto en fondo silvestre como mutante, mientras que la sobreexpresión de *LsAP3* sólo puede determinar identidad de estambres en fondo mutante. La expresión de *LsAP3* y *LsPI* guiada por los promotores de los respectivos genes B de *A. thaliana* no tiene efectos de complementación en fondos mutantes sencillos. Solamente líneas de *A. thaliana* dobles mutantes para *AP3* y *PI* y expresando *LsAP3* y *LsPI* muestran “rescate” parcial de pétalos y estambres, sugiriendo la conservación del heterodímero funcional de los genes B en *L. schismatica*. Estos datos apoyan la hipótesis proximal que establece que la homeosis de *L. schismatica* se debe a un desplazamiento en el sitio de expresión de sus genes B hacia la parte central de la flor (Vergara-Silva *et al*, 2000; Vergara-Silva, *et al* 2003).

PREFACIO

La presente tesis de licenciatura se enmarca en un proyecto iniciado en el Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología (LaGeMoDyEP-IE) de la UNAM hace más de diez años. Este proyecto ha estado enfocado a entender las causas genéticas proximales y últimas del fenotipo floral de la monocotiledónea mexicana *Lacandonia schismatica*. En particular esta tesis contribuye al desarrollo de aproximaciones genético-moleculares proximales para entender los eventos histórico-evolutivos que dieron origen a la nueva vía de desarrollo floral en el linaje de la familia Triuridaceae a la cual pertenece esta angiosperma. El estudio de la evolución del desarrollo de *L. schismatica* y en particular de los procesos involucrados en la emergencia de la ontogenia floral particular de esta especie, también contribuirán a dilucidar los caminos posibles a través de los cuales puede diversificarse la forma de las especies.

Lacandonia schismatica, planta endémica a la Selva de Chiapas posee una morfología floral nunca antes descrita en otras especies o mutantes de sistemas modelo y que además está fijada en las poblaciones naturales de la especie. *L. schismatica* posee flores hermafroditas con estambres en el centro de la flor y carpelos alrededor. Lo asombroso de este suceso biológico es su rareza: desde *Amborella* hasta *Arabidopsis*, el *bauplan* floral característico de una angiosperma hermafrodita es la disposición central del gineceo con respecto al androceo. De esta manera, el fenómeno presente en *L. schismatica* puede verse ya sea como el desplazamiento espacial de una estructura u órgano hacia un sitio nuevo (heterotopía) o como la sustitución de una estructura u órgano por otra (homeosis).

Para el entendimiento de un evento evolutivo como el representado en la morfología floral de *L. schismatica* el proyecto del LaGeMoDyEP-IE de la UNAM plantea preguntas fundamentales en el debate actual de la biología evolutiva y pone a prueba las formas

tradicionales neodarwinistas de entender el origen de las especies. *L. schismatica* nos da la oportunidad de preguntarnos tanto acerca de la emergencia y la canalización de estructuras complejas de plantas y animales.

En cuanto a los procesos próximos detrás de la homeosis las preguntas que se han estado abordado en el proyecto al cual pertenece esta tesis son, entre otras: ¿Cuáles fueron los genes específicos responsables del cambio en la ontogenia del linaje de *L. schismatica*?, ¿Este es un evento resultado de un cambio multigénico complejo o de genes aislados?, ¿Son cambios en las secuencias promotoras de los patrones espacio-temporales de expresión o en las codificantes de las proteínas, o en ambos, los cruciales para explicar el cambio de posición de los órganos florales de *L. schismatica*?, ¿Es posible reproducir éste cambio a nivel experimental en sistemas experimentales en el laboratorio?

Por otro lado, el proyecto de *L. schismatica* se ha ocupado de preguntas acerca de las causas últimas de la evolución orgánica y aborda preguntas que se habían formulado principalmente a partir del estudio de la ontogenia animal: ¿La evolución de *bauplanes* depende de divergencias en la estructura de las redes que forman los “genes reguladores maestros” del desarrollo?, ¿La emergencia de la ontogenia floral de *L. schismatica* fue un evento gradual o puntual?, ¿Hubo una población ancestral con un fenotipo floral intermedio entre el de *L. schismatica* y el resto de sus especies hermanas?, ¿Es posible pasar de un fenotipo floral a otro sin estados intermedios, dada la modificación de los elementos genéticos o epigenéticos pertinentes?, ¿La heterotopía floral presente en *L. schismatica* es adaptativa o se fijó por eventos aleatorios como la deriva génica en poblaciones pequeñas?, ¿Cuál es el papel de las distintas fuerzas evolutivas en el origen de nuevas ontogenias en la naturaleza?, ¿Cómo es que el fenotipo de un “mounstro esperanzado” pueda haberse fijado en poblaciones naturales?

Desde hace ya varias décadas ha emergido una corriente de pensamiento que plantea que para entender la evolución de las especies, hay que entender la compleja forma en que el genotipo da resultado a las características del fenotipo y como los procesos a distintos niveles de organización que van desde la actividad de ciertas moléculas, sus interacciones, las dinámicas espacio-temporales de las redes genéticas y epigenéticas, las restricciones mecano espaciales de las células, etc., canalizan o restringen la emergencia de nuevas posibilidades de desarrollo y fenotipos. La evolución, por lo tanto, no se puede entender sin la comprensión y consideración explícita de la biología del desarrollo y los procesos genéticos y epigenéticos que la subyacen.

INTRODUCCIÓN

***Lacandonia schismatica* (Triuridaceae)**

Lacandonia schismatica es una monocotiledónea, perene y hermafrodita endémica a cinco localidades de la Selva Lacandona mexicana (Martínez & Ramos, 1989; Vergara-Silva *et al*, 2003). Es una hierba pequeña cuya altura va de los 3 a los 5 cm. Como todos los miembros de la familia Triuridaceae, *L. schismatica* es una planta micoheterótrofa, es decir, no sintetiza clorofila y posee asociaciones simbióticas putativas con una o más especies de hongos, los cuales son intermediarios de una compleja red de circulación de nutrientes entre ella misma y los organismos autótrofos de los cuales obtiene sus alimentos (Vergara-Silva *et al*, 2003; Ambrose *et al*, 2006). Un dato que corrobora el hábito simbiote de *L. schismatica*, es que ha sido imposible reproducirla en un laboratorio o jardín botánico. Esto representa una desventaja porque no se puede hacer experimentación mutagénica o transformación

genética con la especie. Actualmente, *L. schismatica* se considera una especie en peligro de extinción y su distribución está restringida a humedales con altitudes de aproximadamente 200 metros sobre el nivel del mar (msnm). Es importante notar que la distribución geográfica de *L. schismatica* corresponde a las antiguas orillas de un lago que data de la última glaciación Pleistocénica en América hace aproximadamente 7000 años (Vergara-Silva *et al*, 2003).

Como se mencionó en el Resumen de esta tesis, *L. schismatica* es la única angiosperma que presenta una completa inversión en la disposición de los órganos sexuales florales. De manera general, *L. schismatica* posee 3 estambres centrales rodeados por un número variable de carpelos (60 a 80) y 6 tépalos cuya homología con sépalos o pétalos no se ha corroborado a nivel molecular. Este carácter está fijado en poblaciones naturales: desde su descubrimiento, hace más de 20 años (Martínez & Ramos, 1989), la gran mayoría de los miles de individuos colectados y analizados tienen esta peculiaridad fenotípica aunque existen variantes florales para esta especie (Vergara-Silva *et al*, 2003).

Sin embargo, es importante comentar que se han colectado individuos de *Triuris brevistylis* (la especie hermana putativa de *L. schismatica*) con fenotipos florales homeóticos similares a los de *L. schismatica* aunque *T. brevistylis* es principalmente una planta dióica (Vergara-Silva, *et al*. 2003). Análisis muy detallados hechos por Vergara-Silva y colaboradores (2003), han demostrado que una pequeña proporción de individuos de esta especie tienen flores hermafroditas y una plasticidad fenotípica notable en la disposición espacial de sus órganos florales. *T. brevistylis* también es una planta endémica a la Selva Lacandona mexicana y se distribuye en zonas muy similares a las de *L. schismatica* aunque en altitudes mayores (Vergara-Silva, 2003 *et al*).

El hecho de que la heterotopía o inversión homeótica presente en *L. schismatica* esté

fijada a través de las generaciones en poblaciones naturales es notable y vuelve a esta especie un modelo muy interesante y peculiar para estudios de la evolución del desarrollo. *L. schismatica* ofrece una oportunidad inigualable para registrar divergencias ontogenéticas en poblaciones contemporáneas. Esto es, permite un estudio de evolución del desarrollo más allá del registro fósil, permitiendo estudiar estos fenómenos en poblaciones actuales al reconstruir historias evolutivas mediante el uso de marcadores moleculares.

La analogía más plausible para entender este fenómeno es verlo como un pequeño evento de saltacionismo contemporáneo (Gould & Eldredge, 1977). Hasta el momento es imposible saber qué tan rápido se originó la apomorfía presente en el linaje de las poblaciones de *L. schismatica* y *T. brevistylis*. Sin embargo, es válido suponer que 2 cambios genéticos muy concretos determinaron la forma de las Triuridaceas mexicanas. El primero, fue el cambio que dio lugar a la ocurrencia de la homeosis (una homeosis inestable) y el segundo, fue el cambio que logró estabilizar dicho fenotipo como una vía de desarrollo robusta (fijado solamente en *L. schismatica*).

La homeosis en los dos linajes más antiguos de monocotiledóneas.

En paralelo a la documentación de la homeosis presente en *L. schismatica*, un grupo de investigadores (Barabé y Lacroix, 1999; Barabé y Lacroix, 2000; Barabé *et al*, 2002) describieron la ocurrencia de fenómenos de homeosis en los órganos florales de cuatro especies de monocotiledóneas pertenecientes a la familia Araceae (género *Philodendron*). Sin embargo, el fenómeno de homeosis presente en *P. melinonii*, *P. acutatum*, *P. fragrantissimum* y *P. solimoesense* es diferente al que sucede en *L. schismatica*. Las flores del género *Philodendron* de manera general están dispuestas en inflorescencias en forma de

cono en las cuales las flores están altamente reducidas, son unisexuales y no poseen perianto. En las inflorescencias de este género, las flores pistiladas están ubicadas en la parte basal de la inflorescencia y las flores estaminadas se encuentran en el ápice de dicha estructura. En los 4 géneros anteriormente mencionados Barabé y Lacroix describieron zonas de transición o gradientes morfogenéticos entre las zonas de flores carpeladas y las de flores estaminadas de la inflorescencia. La homeosis consiste en que en una hilera ascendente de flores, entre la zona masculina y femenina, existen flores que poseen carpelos y órganos estaminóides en un mismo verticilo floral, incluso existen órganos quiméricos con células con identidad tanto de estambres como de carpelos.

En contraste con la homeosis de *L. schismatica*, en *Philodendron* nunca se observan estambres centrales rodeados por carpelos, ni tampoco es un fenómeno que esté presente en cada una de las flores de la planta. Sin embargo, sí existen sustituciones de un órgano floral por otro. Cabe mencionar que también la familia Araceae se ha registrado putativamente como la familia con el registro fósil más antiguo dentro de las monocotiledóneas, habiendo muestras de polen de miembros de esta familia en horizontes del Cretácico temprano de hace aprox. 110 a 100 millones de años (Friis, 2004). Coincidentemente, el segundo registro fósil más antiguo para las monocotiledóneas (Cretácico tardío de hace 90 millones de años) lo poseen 2 especímenes catalogados dentro de la familia Triuridaceae (*Mabelia* y *Nuhlianta*) y pertenecientes a la tribu Triuridae, a la cual también pertenece *L. schismatica* (Gandolfo *et al*, 2002). Los datos morfológicos y paleontológicos de ambos linajes sugieren una posible estructura ancestral de redes genéticas del desarrollo floral con estructuras tales que permitieran una plasticidad mayor en la llegada a las diversas cuencas de atracción fenotípica en las que convergen dinámicamente dichas redes. Por otro lado, también se puede hipotetizar que la antigüedad

de dichos linajes y su subsecuente evolución hasta sus formas contemporáneas (quizás asociadas a sus hábitos micoheterotróficos) ha permitido los cambios suficientes en las redes de regulación genética que han dado como resultado una flexibilización en los tiempos y espacios de aparición y disposición de los órganos florales, esto sin afectar la adecuación de las poblaciones en las que ocurrió dicho cambio. Lo curioso es que el fenómeno de la homeosis de órganos sexuales se ha registrado en linajes exclusivos de monocotiledóneas y no en linajes igualmente o más antiguos de angiospermas como el de *Amborella*, *nymphaeaceas*, *chloranthaceas* u otras mangoliales. La relación entre predisposición a la homeosis y antigüedad evolutiva de un linaje, dado un contexto genético particular está todavía por entenderse. En el Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la UNAM se usan enfoques teóricos para poner a prueba este tipo de hipótesis mediante modelos dinámicos de redes regulatorias teóricas y también empíricamente fundamentadas conforme se avanza en el entendimiento experimental de las redes florales (Alvarez-Buylla *et al.*, 2006).

Los ejes reproductivos de *Lacandonia schismatica*: ¿flores o inflorescencias?

La presente tesis se basa en la interpretación de las estructuras reproductivas de *L. schismatica* como flores verdaderas o euantios. Sin embargo, en 2003, Paula Rudall trató de explicar la peculiar forma de la estructura floral de *L. schismatica* no como un evento de heterotopía floral, si no como un evento de reducción de los ejes de una inflorescencia. En realidad, para las interpretaciones de Rudall, ninguna de las estructuras reproductivas presentes en las especies de la familia Triuridaceae son flores verdaderas sino pseudoantios. Este tipo de estructuras son el resultado de una excesiva reducción de los ejes

reproductivos, derivadas a su vez de inflorescencias ancestrales que poseían flores masculinas en los ápices seguidas de flores femeninas en la parte basal de la planta. En este contexto, *L. schismatica* sería una planta monóica pero con flores unisexuales y cada aparente “carpelo” o “estambre” sería en realidad un flor femenina o masculina altamente reducida y sin perianto.

La hipótesis pseudoantial establecida por Rudall se basa principalmente en datos morfológicos y anatómicos de flores maduras que se apoyan a su vez en interpretaciones de una filogenia molecular basada en comparaciones de la secuencia de nucleótidos de la subunidad 18S del ribosoma (Chase *et al*, 2000). En esta filogenia se posiciona al género *Sciaphila* de la familia Triuridaceae como especie hermana de *Freycinethia*, género perteneciente a la familia Pandanaceae. En esta última familia se ha corroborado la presencia de inflorescencias reducidas en las estructuras reproductivas de todas sus especies conocidas. Cabe mencionar que de esta filogenia molecular, que trató de resolver de manera general las relaciones entre todos los grupos de angiospermas, se interpretó la presencia de las familias Triuridaceae, Pandanaceae, Velloziaceae, Stemonaceae y Cyclanthaceae dentro de un mismo orden llamado Pandanales. Es importante mencionar que de estas familias, dos de ellas (Pandanaceae y Cyclanthaceae) poseen pseudoantios como estructuras reproductivas únicas y más aún, los estudios morfológicos de Paula Rudall se basaron exclusivamente en comparaciones entre la familia Triuridaceae con estos dos últimos grupos pseudoantiales. Las dos familias pseudoantiales poseen similitudes con respecto a las estructuras reproductivas de especies de la familia Triuridaceae en caracteres como la elongación de sus receptáculos y sus patrones de vascularidad (Rudall, 2003). La argumentación a favor del carácter euantial de las estructuras reproductivas de *L. schismatica* y demás miembros de la familia Triuridaceae reside también en datos

morfológicos y filogenéticos. Por el lado filogenético Davis y colaboradores (2004) proponen otra posición de Triuridaceae dentro de Pandanales, utilizando matrices filogenéticas con el gen *atpA* mitocondrial como marcador así como un mayor número de taxa de Pandanales (que incluyen a *Sciaphila*, *Triuris* y *Lacandonia*). Los resultados de estos estudios colocan a Triuridaceae en dos hipótesis posibles, primero como grupo hermano de un clado compuesto de Stemonaceae+Pandanaceae+Cyclanthaceae y segundo como grupo hermano de Velloziaceae (Figura 1; Davis *et al*, 2004; Rudall y Bateman, 2006).

En cuanto a los datos morfológicos, Ambrose y colaboradores (2006) lograron mediante microscopía electrónica de barrido y cortes histológicos, generar series de desarrollo floral de las dos especies de triuridaceas mexicanas para entender si se observaba, desde el origen de la forma, rasgos claros que mostraran la emergencia de los ejes reproductivos de dichas especies como inflorescencias o como flores verdaderas. Los datos a favor de una interpretación euantial se han basado en una clara distinción morfológica entre dos tipos de meristemas, un meristemo central indiferenciado y desnudo de inflorescencia de cual surgen diversos meristemas que flanquean a su vez al meristemo de inflorescencia y que además siempre están cubiertos por una bráctea, la cual se distingue claramente de los tépalos en estados posteriores de desarrollo. Otros datos morfológicos incluyen la corroboración de presencia de filamentos para cada antera, la presencia de una vascularización excesivamente reducida para las flores de ambas especies, al contrario de vascularizaciones ramificadas y alargadas reminiscentes de una inflorescencia. Además, los haces vasculares no se ramifican hacia los carpelos o estambres sino hacia los tépalos y por debajo de éstos.

Por otro lado, los andróforos presentes en flores de *T. brevistylis* son estructuras determinadas y no presentan la indeterminación característica de un meristemo de flor. De la

misma manera, los carpelos están estructurados en números variables no por la indeterminación de un meristemo de inflorescencia putativo, sino porque emergen de primordios tanto compuestos como comunes característicos de otras flores verdaderas. También los números de órganos del perianto y el androceo están en múltiplos de 3 tal y como sucede en el común de los euantios de monocotiledóneas. En general, el perianto de las flores de las dos especies presenta poca similitud con las brácteas petaloideas que rodean las inflorescencias de *Pandanus* (Pandanaceae) o *Carludovica* (Cyclanthaceae) tal como lo comparó Rudall en el 2003.

Otra evidencia a favor de la interpretación euantial recae en la forma en la que emergen los órganos florales putativos de *L. schismatica*, teniendo un orden espacio - temporal similar al del común de las angiospermas. Los tépalos emergen primero, presentando estivación profilada (el primer tépalo emerge opuesto a la bráctea), seguida de los estambres y finalmente los carpelos. Cabe destacar que ninguno de los órganos emerge de manera espiralada como sucedería en el caso de que los tépalos fueran brácteas o los carpelos o estambres flores de una inflorescencia. Además, a diferencia de lo que se esperaría si los ejes reproductivos fueran inflorescencias, los órganos centrales (o apicales) emergen después de los más externos (basales) que son los tépalos y al final se desarrollan los intermedios (carpelos). Por último, como se había constatado antes por Martínez y Ramos (1989), la posición central de los estambres se conserva desde su origen y no es resultado de un desplazamiento posterior.

Dadas la serie de evidencias mencionadas, la interpretación euantial así como la interpretación de una homeosis o heterotopía para *L. schismatica* esta ampliamente apoyada y validada, por lo que cualquier interpretación del presente trabajo se ubicará en dicho marco conceptual.

Recientemente Rudall y Bateman (2006) publicaron una filogenia basada en 39 caracteres morfológicos del orden Pandanales en el que matizan su interpretación. En este estudio incorporan 23 géneros de las cinco familias del orden Pandanales y proponen a Stemonaceae y Triuridaceae como grupos hermanos, este taxón se unen con otro formado por Cyclanthaceae y Pandanaceae. Finalmente, proponen a la familia Velloziaceae como el taxón hermano de todas los pandanales. Cabe destacar que tanto las familias Stemonaceae como Velloziaceae poseen estructuras reproductivas hasta ahora clasificadas como euanthios. De estas dos, la última posee un *bauplan* típico de una monocotiledónea con flores hermafroditas, clara distinción entre verticilos y nectarios septales (Figura 1).

La familia Stemonaceae fue considerada un taxón parafilético dado que Triuridaceae se anida dentro de él. En específico, en este estudio se resaltó el arreglo del gineceo de Triuridaceae en dos o más verticilos poco definidos que tienen un carácter apocárpico (con carpelos no fusionados). El estudio hipotetiza que las estructuras femeninas de Triuridaceae son inflorescencias originadas por una multiplicación de carpelos (indeterminación de flores), derivados de especies de Stemonaceae con flores que ya eran apocárpicas. Esto se apoya en los resultados que muestran como Triuridaceae se agrupa con los géneros de Stemonaceae que poseen flores con gineceos apocárpicos (*Croomia*, *Stichoneuron* y *Stemona*) y no con *Pentastemona* que posee un gineceo sincárpico y se posicionó como el género hermano de Stemonaceae.

En concreto, el estudio anterior argumenta que es posible una evolución de estructuras tipo inflorescencia a partir de flores verdaderas, probablemente por pérdidas de homeostasis en el desarrollo y yuxtaposiciones de actividad de genes de desarrollo que determinan inflorescencia con genes que determinan flores. Provocando una consecuente pérdida de la determinación de órganos florales y por lo tanto, formación de inflorescencias.

Sin embargo, Rudall y Bateman (2006) no muestran datos que corroboren la naturaleza de las estructuras masculinas de Triuridaceae como flores u órganos florales, por lo que Rudall y Bateman suponen una estructura reproductiva quimérica para Triuridaceae con mezclas de órganos florales (tépalos o estambres) y flores (los “carpelos”). Este fenómeno no ha sido documentado hasta el momento en poblaciones naturales de otros géneros de angiospermas.

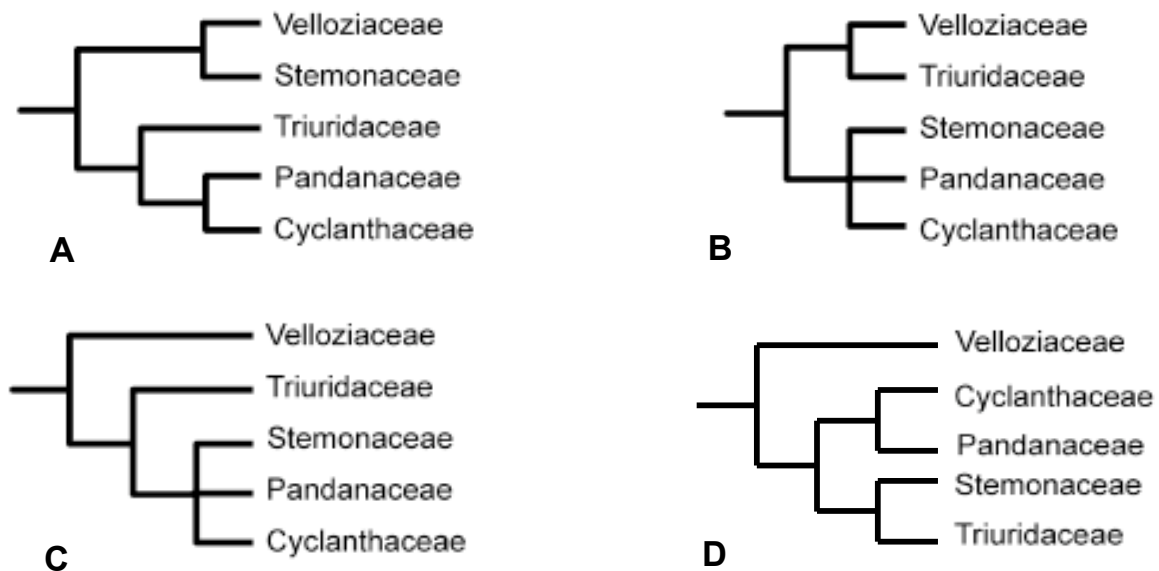


Figura 1. Hipótesis de ubicación de la familia Triuridaceae dentro del orden Pandanales reportadas hasta el momento (Modificado de Rudall y Bateman, 2006). Pandanaceae y Cyclanthaceae son familias con pseudoanthios, mientras que Stemonaceae y Velloziaceae poseen euanthios.

A. Hipótesis de Chase *et al* (2000) en la que Triuridaceae es grupo hermano de Pandanaceae y Cyclanthaceae, basada en 18S rDNA. **B.** y **C.** Hipótesis alternativas de Davis *et al* (2004) basadas en atpA mitocondrial en las que Triuridaceae es grupo hermano de Velloziaceae o grupo hermano de un grupo compuesto por Stemonaceae, Pandanaceae y Cyclanthaceae. **D.** Hipótesis de Rudall y Bateman (2006) basada en caracteres morfológicos en la que Triuridaceae es hermana de Stemonaceae y a su vez este clado es hermano de Cyclanthaceae y Pandanaceae.

Sistema modelo en angiospermas: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una pequeña eudicotiledónea que ha sido el sistema modelo por excelencia en el estudio de la genética, desarrollo, fisiología y bioquímica de las plantas. Pertenece a la familia Brassicaceae junto con plantas de gran importancia alimenticia como *Brassica oleracea* (brócoli, coliflor o rábano), *Brassica juncea* (mostaza), *Wasabia japonica* (wasabi) y *Brassica napus* (canola). Su carácter de especie modelo se debe en gran medida a la brevedad de su ciclo de vida, el cual toma aproximadamente 6 semanas de embrión a embrión. Produce una altísima cantidad de semillas y puede ser cultivada en espacios restringidos y en condiciones de temperatura y humedad fácilmente controlables. En el año 2000, el pequeño genoma de *Arabidopsis* (125 Mega bases) se secuenció por completo. Este se organiza en 5 cromosomas de los cuales existen mapas físicos y genéticos muy completos, teniendo aproximadamente 25,000 genes en todo su genoma (The *Arabidopsis* Initiative, 2000). El estudio de la primera línea mutante de *Arabidopsis* fue publicada en 1947 por E. Reinholz y a partir de esa fecha, y sobre todo durante la presente y anterior décadas, se han generado y mapeado genéticamente un sinnúmero de líneas mutantes, las cuales actualmente han permitido una explosión en la generación de conocimiento acerca de la biología de la especie y en general la biología de las plantas con flor. La posibilidad de transformar o modificar genéticamente a *Arabidopsis* mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, así como el hecho de conocer la secuencia completa de su genoma y el grado de entendimiento de las relaciones de los genes homeóticos ABC, dieron lugar a escoger a esta planta como el sistema de experimentación de esta tesis (Bowman, 1994; Weigel & Glazebrook 2000).

El modelo ABC de determinación de identidad de órganos florales.

El modelo ABC de desarrollo floral fue resumido por los grupos de trabajo de Elliot Meyerowitz, Enrico Coen y Zsuzsanna Schwarz-Sommer. Es un modelo combinatorio que predice la emergencia de órganos florales en un contexto espacio temporal, dada la interacción de una serie de genes homéóticos (en su mayoría pertenecientes a la familia MADS-box) en sitios y tiempos específicos de los tejidos florales. El modelo propone que la activación sucesiva en el desarrollo de la flor de genes tipo A (*APETALA1* y *APETALA2*), genes tipo B (*APETALA3* y *PISTILATA*) y genes tipo C (*AGAMOUS*), determinan la identidad de los cuatro diferentes órganos que existen en el común de las eudicotiledóneas (Figura 2). En particular, este modelo fue descrito independientemente en las especies modelo *A. thaliana* y *Antirrhinum majus* y los nombres de los genes anteriormente descritos pertenecen a *A. thaliana*, los cuales además son los nombres más utilizados para referirse a este modelo en la literatura. Es un modelo de actividades combinatorias de genes que son suficientes para la determinación de los órganos de la flor. La actividad aislada e inicial de los genes tipo A determinan la identidad de los sépalos; la actividad conjunta de los genes A y B determinan la identidad de pétalos; la actividad de los genes B y C determinan la identidad de estambres y la actividad exclusiva de los genes tipo C determina la identidad de los carpelos. El modelo ABC se infirió a partir de tres tipos evidencias experimentales.

La primera evidencia es que las mutaciones sobre cualquiera de los genes A, B o C producían fenotipos mutantes en parejas contiguas de los órganos florales. Por ejemplo, las líneas de plantas con mutaciones en los genes B producían flores sin pétalos y estambres (de ahí el nombres de *APETALA3* y *PISTILLATA*). Mutaciones en *AGAMOUS* producen flores sin estambres y carpelos y con crecimiento indeterminado de pétalos como sucede en

las rosas comerciales. Mutaciones en *AP2* generan flores con carpelos en el verticilo exterior, dos verticilos de estambres y carpelos (Bowman *et al*, 1989). La segunda evidencia experimental residió en conocer los tiempos y espacios de expresión de los diferentes genes involucrados en las mutaciones. Así pues, con hibridizaciones de RNA *in situ* se averiguó por ejemplo, que los genes A se expresan en el 1er y 2do verticilo floral, mientras que los genes C se expresan en el 3er y 4to verticilo floral. Además, en mutantes de *AP2*, la expresión de *AG* se extiende hasta el 1er y 2do verticilo floral y viceversa, sugiriendo que estos genes son antagonistas y se reprimen mutuamente. Por otro lado, *AP3* se expresa en los tres verticilos florales más externos y *PI* en los tres verticilos florales internos, traslapándose solamente en los verticilos 2 y 3 (Bowman *et al*, 1991; Jack *et al*, 1992; Goto y Meyerowitz, 1994).

Finalmente, la tercera evidencia radicaba en conocer las interacciones de activación o represión a nivel transcripcional y traduccional. Por ejemplo, *AP3* se expresa en los primeros 3 verticilos de la flor mientras que *PI* se expresa en los tres verticilos más centrales. Sin embargo, los mutantes sencillos de uno u otro gen, producen un fenotipo similar que afecta sólo el 2do y 3er verticilos. Esto indicó que hay un grado de interdependencia entre estos dos genes para autoactivarse (Jack *et al*, 1992; Goto y Meyerowitz, 1994). Más tarde se descubrió que *AP3* y *PI* solo funcionan como factores de transcripción cuando forman un heterodímero a nivel traduccional que también es imprescindible para la traslocación al núcleo de estas proteínas. (Riechmann *et al*, 1996; Riechmann *et al*, 1996; McGonigle, 1997)

Más tarde, se incorporaron a este modelo otra serie de genes MADS pertenecientes a linaje *SEPALLATA*, los cuales también determinan la identidad de órganos florales. Su papel es necesario y fundamental para la función de los tres tipos de genes (A, B y C) en el desarrollo floral. Así los genes ABC son necesarios pero no suficientes para recuperar

órganos florales a partir de hojas y solamente lo hacen en combinaciones adecuadas con los genes *SEPALLATA*, con los que posiblemente forman complejos multiméricos (Honma y Goto, 2001; Pelaz *et al*, 2000).

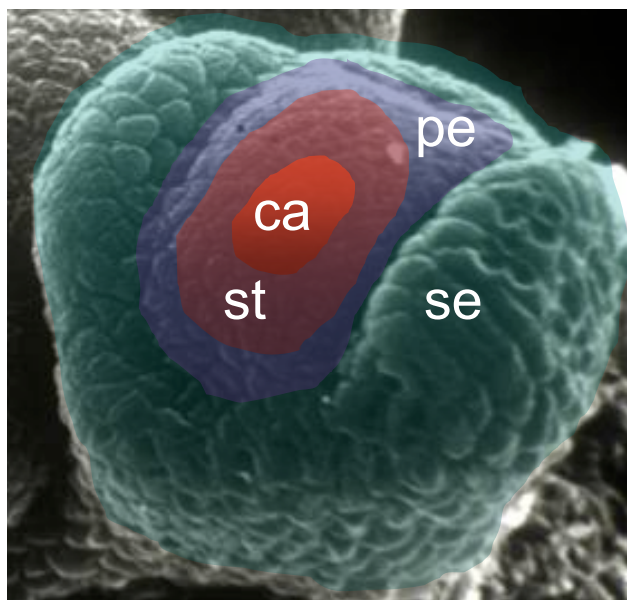
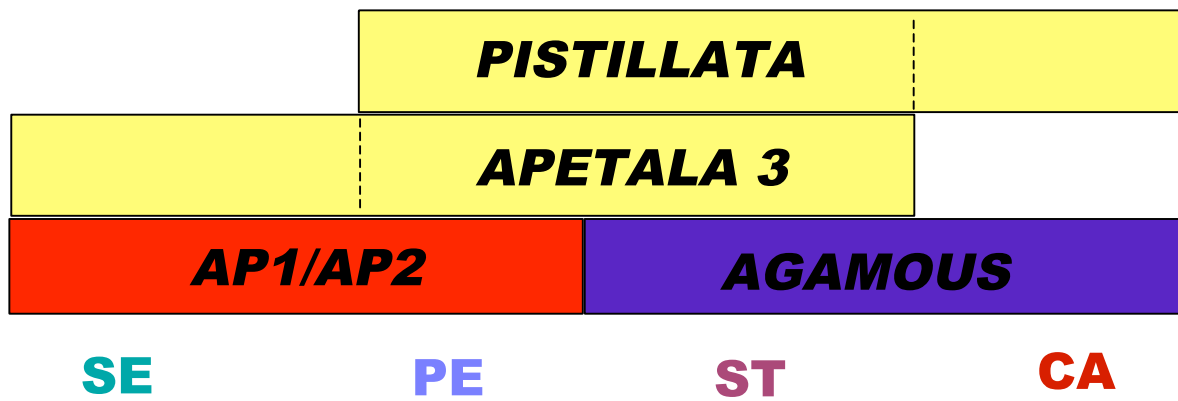


Figura 2. Modelo ABC de identidad de órganos florales. La actividad de los genes A (*AP1* y *AP2*) en el 1er verticilo floral determina sépalos, la actividad combinatoria de genes A y B (*AP3* y *PI*) en el 2do verticilo determina pétalos, la actividad de genes B y C (*AG*) en el 3er verticilo determina estambres y la actividad del gen C en el 4to verticilo floral determina la identidad de carpelos. *AP3* y *PI* solo funcionan como factores de transcripción al formar un heterodímero. Es por eso que no hay actividad B en los verticilos 1 y 4 a pesar de la respectiva expresión de *AP3* y *PI* en estos verticilos. (Bowman, Smyth y Meyerowitz, 1989; Coen y Meyerowitz, 1991). Fotografía de John Bowman.

La familia de genes MADS-box en Plantas.

Los genes MADS-box son miembros de una familia monofilética presente en casi todos los eucariontes que muy probablemente juega un papel clave en la regulación de las redes transcripcionales que subyacen la morfogénesis de plantas, hongos y animales (Shore y Sharrocks, 1995). El linaje que compone a esta familia se divide en dos grupos monofiléticos, el linaje de genes MADS tipo I y el de genes MADS tipo II, que están presentes en todos los eucariontes, por lo que se postula que en la familia de genes MADS ocurrió al menos una duplicación ancestral a la divergencia de los animales y las plantas (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a). El carácter que une filogenéticamente a esta familia es la presencia de una región de aminoácidos altamente conservada en la parte N-terminal de las proteínas que codifican éstos genes, conocida como “caja” MADS y codifica para el dominio de unión al DNA. Esto es, su función celular general es la de la regulación de la expresión genética al actuar como factores transcripcionales. Aparte de este carácter común, la estructura y funciones de los genes MADS tipo I y II varía considerablemente. En animales, hongos y plantas las funciones del linaje tipo II han sido más claramente caracterizadas. En animales y hongos, los genes pertenecientes al linaje II codifican para factores tipo MEF-2 y en plantas codifican para factores tipo MIKC con una estructura modular con cuatro dominios del extremo amino al carboxilo: MADS, I, K y COOH⁻. Siendo los dominios MADS y K los más conservados aunque curiosamente algunos de sus residuos pudieron haberse fijado por selección natural (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003).

Un estudio reciente de nuestro laboratorio, ha sugerido que la evolución adaptativa en los dominios K de los genes B, que son fundamentales para establecer interacciones entre las proteínas B, pudo haber sido la base de la diversificación funcional de estos linajes de

genes durante la evolución de las plantas (Hernández-Hernández *et al.*, 2007).

Las funciones de los genes MIKC son ampliamente diversas y van desde procesos tan distintos como la morfogénesis floral y de la raíz, la iniciación de la floración, la identidad de meristemo floral y aspectos generales en el desarrollo de óvulos, semillas y frutos.

(Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b; Burgeff *et al.*, 2001)

Genes B de la identidad de órganos florales en monocotiledóneas y variaciones en el modelo ABC.

Dado que el objetivo principal de ésta tesis es el entendimiento del grado de conservación de función que hay entre los genes B de una monocotiledónea (*L. schismatica*) y una eudicotiledónea (*A. thaliana*), es pertinente explorar los diversos estudios que han tratado de hacer comparaciones similares con otras monocotiledóneas.

Hasta el momento, la comprensión de la manera en la que los componentes genéticos de una monocotiledónea determinan su fenotipo floral, se basa en gran medida, en una comparación entre los patrones de expresión de los genes de la monocotiledónea en estudio, con respecto a las predicciones constatadas por el modelo ABC de identidad de órganos florales para las especies modelo. Al utilizar al modelo ABC como modelo de referencia para entender la genética del desarrollo de las monocotiledóneas, se han observado diferencias tanto en el número de genes homólogos participantes, como en las características de las secuencias codificantes de dichos genes (sobre todo en la región COOH⁻ terminal) y en los sitios y tiempos de expresión de dichos genes (Lamb & Irish, 2003).

Los trabajos hasta la fecha realizados han enriquecido la discusión acerca del grado de conservación del modelo ABC en angiospermas. Incluso algunos de ellos muestran un cambio espacio-temporal de la expresión génica de los genes tipo B en monocotiledóneas al

compararlos con las eudicotiledóneas (Tzeng y Yang, 2001; Hsu y Yang, 2002; Kanno *et al.*, 2003; Wen-Chien *et al.*, 2004). Los trabajos futuros en linajes de monocotiledóneas diferentes a las familias Poaceae, Liliaceae y Orchideace, con el tiempo dirán si la divergencia en función y sitios de expresión de los genes B es un fenómeno común.

Para explicar la estructura e interacciones del genotipo que dan lugar a la determinación de la identidad de los órganos florales de las triuridaceas quizás será necesario utilizar un modelo ABC modificado que tome en cuenta las restricciones históricas a la que cualquier monocotiledónea está sometida después de aproximadamente 140 millones de años de evolución independiente de las eudicotiledóneas (Chaw *et al.*, 2004). Los resultados hasta ahora sugieren una serie de diferencias importantes con respecto a lo encontrado en las eudicotiledóneas, excepto en las Gramineae que de manera general tienen conservada la función B.

Las gramíneas y la conservación de la función B.

Los patrones de expresión y la funciones de los genes tipo B de las gramíneas han mostrado una gran similitud con aquellos de las eudicotiledóneas y los análisis funcionales en general cumplen con las predicciones del modelo ABC. Una de las primeras evidencias surgió con el trabajo de Ambrose *et al.* (2000) al caracterizar al gen *SILKY1* del maíz como un homólogo del gen *AP3* de *A. thaliana*. La morfología floral del maíz y otras gramíneas no es idéntica a la de las eudicotiledóneas. En el tercer verticilo floral presentan estructuras conocidas como lodículos en lugar de pétalos y los órganos más externos equivalentes morfológicos a los sépalos son conocidos como paleas y lemmas, cuya forma semeja al de las brácteas de las eudicotiledóneas. A pesar de que hay evidencias genéticas que apoyan la homología de los mecanismos genéticos determinantes de lodículos y pétalos (Koyozuka *et al.*, 2002; Whipple

et al, 2004; Whipple *et al*, 2006), se desconoce si las paleas y lemmas son homólogas a los sépalos a nivel morfológico y genético.

La similitud entre las funciones de *SILKY1* y *AP3* se comprobó al determinar el fenotipo de los mutantes de *SILKY1*, los cuales muestran una conversión homeótica de los lodículos por órganos parecidos a una palea y de estambres convertidos en carpelos. Por otro lado, también se han clonado y caracterizado en maíz 3 genes parálogos pertenecientes al linaje GLO, al cual pertenece el gen *PI* de *Arabidopsis*. Estos genes (*ZMM16*, *ZMM18* y *ZMM29*) parecen ser duplicaciones que ocurrieron después de la divergencia de los pastos (Münster *et al*, 2001). Mediante hibridaciones tipo Northern e *in situ* se observó la expresión de estos genes en lodículos, estambres y carpelos en el inicio del desarrollo floral de flores masculinas y femeninas. La expresión de estos genes en carpelos es mucho menor que en los demás órganos mencionados, siendo la expresión en estambres la más intensa, incluso hasta etapas tardías del desarrollo floral. Esta expresión concuerda con la vista para *PI*, que se expresa en los verticilos 2,3 y 4 en *A. thaliana*.

El estudio más reciente que corrobora la conservación de la función B en maíz (Whipple *et al*, 2004), muestra como *SILKY1* y *ZMM16* tienen la capacidad de formar heterodímeros protéicos entre sí, tal como suceden entre sus ortólogos *PI* y *AP3*. Además, al transformar con los genes B del maíz a líneas de *Arabidopsis* mutantes para *AP3* y *PI*, en las progenies transformadas se recuperan pétalos pequeños en el tercer verticilo y órganos semejantes a estambres en el segundo verticilo. Esta es una prueba contundente de la conservación de la función B en los genes estudiados.

En el arroz, otra gramínea, también se han caracterizado homólogos de los genes tipo B de *A. thaliana*. *OsMADS4* es el gen homólogo de *PI* y está involucrado en la determinación de estambres y lodículos, expresándose en el segundo, tercero y cuarto verticilos, tal como

los genes tipo *GLO/PI* del maíz. Plantas transgénicas de arroz con insertos de antisentido de *OsMADS4* muestran modificaciones en el 2do y 3er verticilo similares a los mutantes de *SILKY1* (Kang *et al*, 1998). Sin embargo, *OsMADS4* no es el único gen ortólogo de *PI* en arroz, *OsMADS2* es otro gen muy similar a *PI* cuya función aún no ha sido estudiada (Chung *et al*, 1995). La diversidad de genes *GLO/PI* en pastos es probablemente resultado de la poliploidía y duplicaciones ocurridas después de la divergencia de éstas especies, e indica una posible fuente de divergencia de funciones y subfuncionalización que tal vez determine la morfología particular de este tipo de flores.

Recientemente, en el arroz se ha identificado y caracterizado al gen *SUPERWOMAN* (*SPW*), antes conocido como *OsMADS16* y homólogo de *AP3*. Tal como se esperaba, el sitio de expresión de *SPW* se restringe a los verticilos 2 y 3. Plantas con cualquiera de los dos alelos mutantes de este gen muestran nuevamente un fenotipo similar al de las plantas mutantes de *OsMADS4* o *SILKY1* (Nagasawa *et al*, 2003). Cabe destacar que en estudios en un sistema heterólogo se ha comprobado la interacción de las proteínas de *SPW* (*OsMADS16*) y *OsMADS4* por experimentos de doble híbrido en levadura, tal como lo hacen las proteínas de *AP3* y *PI* en *A. thaliana* (Moon *et al*, 1999).

Otro estudio más reciente en el cual se corrobora que la función B está conservada en pastos, es el de una variedad silvestre de trigo (*Aegilops crassa*). En este estudio desarrollado por Hama *et al* (2004), se identificó la presencia de dos genes parálogos *WPI1* y *WPI2* con función tipo B y a su vez ortólogos de *OsMADS4* y *OsMADS2* respectivamente. En variedades silvestres, el sitio de expresión de *WPI* se localiza en los primordios de lodículos y estambres, estando solo presente en lodículos en etapas más tempranas. En variedades mutantes de trigo con transformación de estambres a pistilos, se observa la ausencia de expresión de *WPI1* en los órganos transformados. Cabe destacar que los autores de este

estudio habían identificado antes la presencia de dos ortólogos de *AP3* denominados *WAP3/TaMADS#51* y *WAP3/TaMADS#82* (Murai *et al*, 1998) pero sus resultados no habían sido publicados. En este trabajo más reciente también se corroboró que ninguno de los genes *WAP3* se expresa en el tercer verticilo de trigo con transformaciones homeóticas.

Los casos en Liliaceae y pequeñas variantes del modelo ABC.

La primera identificación de genes MADS tipo B en una liliaceas fue en el 2001 con el trabajo de Tzeng y Yang. Ellos aislaron y caracterizaron al gen *LMADS1* en *Lilium longiflorum* como un homólogo de los genes del linaje *DEF/AP3* y presenta en su secuencia al motivo “paleo *AP3*”, también presente en *OsMADS16* y *SILKY1*.

Hibridaciones tipo *Northern* mostraron la expresión de este gen en botones en etapas tempranas del desarrollo floral y a pesar de que la expresión de este gen era más conspicua en el segundo y tercer verticilo de las flores, también se observó la acumulación de mRNA de *LMADS1* en el primer y cuarto verticilo de la flor. Sin embargo, sólo se observa la presencia de la proteína LMADS1 en el segundo y tercer verticilo, indicando una regulación postranscripcional que restringe la expresión del gen. La presencia del mRNA en los 4 órganos florales puede indicar que los genes B de liliaceas intervienen en más procesos que los de eudicotiledóneas, por ejemplo la determinación de los tépalos del cuarto verticilo. Por otro lado la transcripción de *LMADS1* en el cuarto verticilo floral es similar al gen *DEF* de *Antirrhinum majus* (Tzeng y Yang, 2001).

Una característica no esperada de la proteína LMADS1 es que es capaz de formar homodímeros al contrario de la proteína de AP3, la cual sólo se acopla estructuralmente con PI y proteínas SEPALLATA para lograr adquirir estabilidad física y funcional. A pesar de esto, LMADS1 no genera identidad de tipo B en todos los sitios en donde se expresa, por lo que

seguramente existen otros genes que son necesarios en la determinación de estambres y tépalos. La capacidad de formar homodímeros de los genes B de esta Liliaceae es probablemente reminiscente de las capacidades ancestrales de los genes B en angiospermas, dado que en gimnospermas existe solo una copia homóloga de los genes B de angiospermas (Mouradov *et al*, 1999).

Al transformar *A. thaliana* con *LMADS1* fusionado al promotor de sobreexpresión del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) no se observó una conversión de órganos florales similar a la de 35S::*AP3*, a pesar de que los productos protéicos del *LMADS1* interactuaban con PI en los experimentos de doble híbrido en levaduras. Esto indica que la estabilidad funcional de la proteína de *LMADS1* para determinar pétalos y estambres depende de factores diferentes a los codificados por los genes B, al menos para el caso de *A. thaliana*. Esta falta de rescate fenotípico también podría deberse a la construcción usada en las líneas transformadas, siendo necesario el acoplamiento del cDNA de *LMADS1* con el promotor nativo de *AP3* de *Arabidopsis* para lograr observar un rescate fenotípico. Sin embargo experimentos equivalentes a los hechos con los genes de Liliaceae pero usando los cDNAs de *A. thaliana* sí presentaron conversión de órganos florales de acuerdo a las expectativas del modelo ABC. Finalmente cuando se usó la secuencia interrumpida (35S::*LMADS-ΔMADS*), el fenotipo resultante era muy similar al de un mutante de *AP3* (Tzeng y Yang, 2001).

¿Qué pasa con los tépalos?

Lilium longiflorum, como todas las lilaceaeas presenta un perianto compuesto por tépalos (estructuras sin clara homología a pétalos o a sépalos) en los dos primeros verticilos de sus flores. Este fenómeno de similitud morfológica entre verticilos externos, además de las

peculiaridades en cuanto a los patrones de expresión de los genes MADS con respecto a lo observado en sistemas modelo, puede ocurrir en otras monocotiledóneas como orquideaceas y las triuridaceas mismas. Un estudio, realizado en tulipanes por Kanno y colaboradores (2003) estuvo dirigido a probar la teoría propuesta por van Tunen y colaboradores (1993) que propone la extensión del sitio de expresión de los genes B hasta el primer verticilo floral. Con este propósito se identificaron y caracterizaron en la especie *Tulipa gesneriana*, dos genes del linaje *DEF/AP3* y uno del linaje *GLO/PI* llamados *TGDEFA*, *TGDEFB* y *TGGLO* respectivamente. Mediante pruebas de hibridización tipo *Northern*, este trabajo mostró la expresión de los tres genes identificados en los primeros tres verticilos de la flor, corroborando así la hipótesis de van Tunen en la modificación del modelo ABC para tulipanes.

Aunado a esto, *TGGLO* inclusive se expresa, aunque de manera somera, también en carpelos y en tejido vegetativo como hojas, brácteas y estambres. Análisis más detallados de *TGGLO* también prueban que, como en el caso de otras proteínas tipo *GLO/PI* de Liliaceae, tienen la capacidad de formar homodímeros al contrario de *TGDEFA* y *TGDEFB* que solo pueden formar heterodímeros con *TGGLO*, tal como sucede en el caso de *AP3*. La expresión de *TGGLO* en tejido vegetativo muestra una probable expansión y divergencia funcional que puede ser importante de estudiar.

Otro estudio de genes B en monocotiledóneas es el realizado en el espárrago *Asparagus officinalis* (Park *et al*, 2003). *Asparagus officinalis* es una Liliaceaea dióica que presenta una estructura floral con tépalos idénticos en los dos primeros verticilos. En este estudio, se aisló y caracterizó el gen *AODEF*, altamente parecido a *LMADS1* (*Lilium*), *SILKY* (maíz), *OsMADS16* (arroz) y *WAP3* (trigo). Por lo tanto este gen pertenece al linaje de genes *DEF*. Mediante análisis de hibridización tipo *Northern* se observó que la expresión de este

gen está restringida específicamente al tejido reproductivo. El desarrollo de los dos tipos de flor de *Asparagus officinalis* inicia con un estadio hermafrodita. Una vez que han sido formados los carpelos y los estambres, se postula que se activa un mecanismo genético que propicia la degradación de los estambres, en el caso de las flores femeninas, y el bloqueo del crecimiento del ovario, sin degeneración, para el caso de las flores masculinas.

Durante las etapas tempranas hermafroditas del desarrollo, tanto en individuos masculinos como femeninos, se constató la expresión de *AODEF* exclusivamente en los verticilos 2 y 3. Al contrario del caso del tulipán, este gen no se expresa en el verticilo 1. De esta manera, es poco probable que *AODEF* esté involucrado en la determinación de tépalos, dado que la ausencia en la expresión de éste gen en el verticilo 1 recrea órganos con estructuras similares a los vistos en los verticilos 1 y 2.

En las etapas tardías del desarrollo, en las que la flor ya ha adquirido su morfología unisexual, la expresión de *AODEF* se sigue observando en estambres y tépalos del 2do verticilo en flores masculinas, pero la expresión se pierde en flores femeninas. El patrón de expresión de este gen concuerda con las predicciones del modelo ABC, tal como en el caso del gen *SILKY* del maíz (Ambrose *et al*, 2000), pero no con la teoría de van Tunen. El estudio también determinó con pruebas de hibridización tipo *Southern* que *AODEF* se encuentra en una sola copia en el genoma del espárrago, por lo que es poco probable la presencia de parálogos con diferentes sitios de expresión que puedan tener sitios extendidos hasta el primer verticilo.

Los genes B de las orquídeas muestran mayor divergencia funcional.

Las orquídeas comprenden estructuras derivadas del esquema clásico de la forma floral de las angiospermas. En estas plantas los verticilos 3 y 4 están fusionados formando una

estructura conocida como ginostenio o columna y en el verticilo 2 existe un pétalo altamente modificado llamado labio o labellum. Salvo en el caso del labio, el cual posee una estructura muy particular, no existe una distinción morfológica clara entre los órganos que forman parte de los verticilos más externos, y por lo tanto, estos órganos estériles del perianto se denominan tépalos.

En un estudio realizado por Wen-Chieh y colaboradores (2004), se identificaron y caracterizaron 4 genes MADS (*PeMADS2-PeMADS5*) de la orquídea *Phalaenopsis equestris*, pertenecientes al linaje *DEF/AP3*. Probablemente asociado al hecho de que son 4 genes, los patrones de expresión de estos genes son diferentes a los de los genes tipo B de las eudicotiledóneas. Mediante una hibridación tipo *Northern*, se observó que todos los genes están activos diferencialmente a lo largo del desarrollo floral, sin estar expresados en tejido vegetativo. Estos genes también muestran diferentes patrones de expresión espacial en diferentes órganos florales. De acuerdo a estas diferencias en sus patrones espacio-temporales, las funciones de los cuatro genes probablemente no son redundantes. Dentro de los diferentes mutantes florales que existen en esta especie de orquídeas, este trabajo analizó los patrones de expresión de los genes encontrados en una mutante somaclonal (generada *in vitro*), que posee tres sépalos, tres pétalos con forma de labios, una columna en forma de arco, anteras reducidas y un estigma plano. Al hacer análisis de comparación de expresión de los genes *PeMADS* entre el tipo silvestre y esta mutante, se llegó a la conclusión de que *PeMADS2*, *PeMADS4* y *PeMADS5* están involucrados en la determinación de sépalos (tépalos), labia y pétalos, respectivamente. Tanto *PeMADS2* como *PeMADS5* estaban expresados en los sépalos del tipo silvestre, sin embargo, el mutante con sépalos idénticos a la variedad silvestre, solo tenía la presencia de *PeMADS2*, lo cual indica que *PeMADS5* no es indispensable para la especificación de sépalos. Del mRNA de los

genes *PeMADS*, sólo *PeMADS4* no se expresaba en pétalos en el tipo silvestre. También la expresión de *PeMADS3* y *PeMADS4* fue significativamente mayor en los labios de la silvestre, mientras que los labios del mutante solo expresaban a *PeMADS4*, lo cual sugiere que *PeMADS3* no es indispensable para la determinación de labios.

Por último, se observó que un alelo variante de *PeMADS5* que tiene dos mutaciones en dos intrones de este gen, es el que probablemente genera el fenotipo mutante observado *in vitro*. El gran número de parálogos de los genes *DEF/AP3* de *Phalaenopsis equestris* y más aún, su potencial papel en generar la morfología floral característica de esta orquídea, pueden dar cuenta de la importancia de la duplicación génica de genes tipo MADS en la divergencia morfológica.

En otro trabajo en la orquídea *Oncidium* (Hsu y Yang, 2002), se identificó y caracterizó al gen *OMADS3*, un gen tipo B cuyo sitio de expresión fue poco común e inesperada. Al contrario de los genes *PeMADS2-PeMADS5*, el gen *OMADS3* se expresa tanto en tejido reproductivo como vegetativo (sépalos, pétalos, labios, estambres, carpelos, botones florales y hojas). Cabe destacar que al realizar una filogenia, este gen se encuentra dentro del linaje *TM6* y no en el paleo *AP3* al cual pertenecen la mayoría de los genes B de monocotiledóneas. Es decir, el linaje *TM6* es exclusivo de eudicotiledóneas y es resultado de la duplicación de un gen *paleoAP3* en el origen de las eudicotiledóneas. De esta manera, la mayoría de las eudicotiledóneas poseen dos copias tipo *AP3*, una perteneciente al linaje euAP3 (que tiene motivos en la región C-terminal totalmente nuevos) y otro que es el linaje *TM6*, que se parece más a los genes *paleoAP3* de los cuales vienen originalmente (Kramer *et al*, 1998).

Al transformar plantas de *A. thaliana* con este gen fusionado al promotor CaMV35S, las plantas tenían un desarrollo normal hasta el momento de la floración, en la que producían

flores terminales fértiles al final de la inflorescencia, fenotipo similar a los mutantes del gen *TFL* de *A. thaliana*. Estas mutaciones generan una pérdida en la indeterminación de las inflorescencias y una transición al meristemo floral prematura y terminal.

El experimento más desconcertante de este trabajo consistió en generar líneas transgénicas de *A. thaliana* con el inserto del gen *OMADS3* sobreexpresado, pero sin el segmento de la caja MADS o el C-terminal (líneas 35S::*OMADS3*-ΔC y 35S::*OMADS3*-ΔMADS). El resultado fue un fenotipo muy parecido al de mutantes de *ap2* de *A. thaliana*, en los cuales los sépalos se convierten en carpelos con óvulos y papilas estigmáticas y los pétalos se encuentran ya sea ausentes o son convertidos en estructuras parecidas a carpelos y estambres respectivamente. Con estos resultados se pudo concluir que éste gen tiene una probable función tipo A, como iniciadora de la floración y en determinar la formación de flores, a pesar de estar ubicado en el linaje *TM6*. Con experimentos de análisis de doble híbrido con levaduras, se comprobó que este gen forma homodímeros y no es capaz de formar heterodímeros ni con *AP3* o *PI*.

***LsAP3* y *LsPI* de *Lacandonia schismatica* se expresan conjuntamente en el centro de la flor.**

Esta introducción cierra citando datos preliminares obtenidos por Marie Englund y Francisco Vergara Silva a partir de hibridaciones *in situ* radioactivas de los dos genes B de *L.*

schismatica en los que se observa la expresión de *LsPI* en los verticilos en los que se forman los estambres y carpelos de la flor pero no en los tépalos (Vergara-Silva, 2002). Teniendo un perfil de expresión parcialmente conservado con respecto al de *A. thaliana*. Por otro lado, la expresión de *LsAP3* se observa exclusivamente en el verticilo central de la flor de *L.*

schismatica, esto es, en el sitio en el que se forman los estambres. Estos datos sugieren

fuertemente que la razón molecular proximal a la homeosis vista en *L. schismatica* es la expresión heterotópica de *LsAP3* y *LsPI* en el centro de la flor (Figura 3). Además se sugiere la posible formación de un heterodímero funcional entre los genes B de *L. schismatica*.

Los trabajos anteriormente descritos comprenden un cúmulo de información que pretende observar el grado de conservación del modelo ABC en linajes específicos de las monocotiledóneas. La aparente conservación de la función B en monocotiledóneas, da lugar a una consecuente búsqueda de divergencia en aquellos mecanismos genéticos que activan o regulan una expresión determinada de los genes B y también en los mecanismos que son activados y desencadenados por los genes B. Desafortunadamente, la información no es tan extensa filogenéticamente para probar si las predicciones del modelo ABC correspondientes a la función B son válidas para todas las monocotiledóneas. Cualquier estudio similar tendrá que tomar en cuenta la importancia de la paralogía tanto en los linajes *GLO/PI* (e.g. *OsMADS4* y *OsMADS2*, *ZMM16*, *ZMM18* y *ZMM29*) como en los linajes *DEF/AP3* (e.g. *PeMADS2-PeMADS5* y *TGDEFA* y *TGDEFB*). Esto es debido a que un aumento en el número de genes participantes en las redes de interacción genética involucra un aumento en la complejidad de interacciones posibles entre las proteínas B, A, C y *SEPALLATA* y una posible evolución por procesos de subfuncionalización o neofuncionalización (Álvarez-Buylla *et al* 2006).

Por lo tanto la conservación de la función B en monocotiledóneas dependerá de estudios de la influencia de las secuencias reguladoras en *cis* y de los factores que actúan en *trans* en determinar el lugar y tiempo de expresión de los genes B así como las potenciales interacciones que tengan las proteínas B con otras proteínas MADS.

OBJETIVO E HIPÓTESIS: ¿Conservación funcional de los genes B en *A. thaliana* y *L. schismatica*?

El presente trabajo tuvo como objetivo general establecer el grado de conservación funcional de los genes B, *DEF/AP3* y *GLO/PI* de *L. schismatica* (*LsAP3* y *LsPI*) y de las proteínas codificadas por ellos con respecto a sus ortólogos de *Arabidopsis thaliana*. Nuestra hipótesis general de trabajo es que las proteínas del linaje B de *L. schismatica* tendrán funciones conservadas con respecto a las de *A. thaliana*. Para ello se plantearon una serie de experimentos *in vivo* para establecer la funcionalidad de las proteínas B de *L. schismatica* en la determinación de estambres y pétalos en *A. thaliana* y para recuperar las funciones B en mutantes de la segunda especie. Estos experimentos ponen a prueba la interacción de parejas heterólogas de genes B de *L. schismatica* y *A. thaliana*, así como la formación de heterodímeros funcionales entre los genes B de *L. schismatica*.

Para abordar este objetivo general se establecieron los siguientes objetivos particulares:

1. Analizar la morfología floral de líneas de *A. thaliana* que sobreexpresan los genes B de *L. schismatica* en fondo silvestre bajo el promotor fuerte 35S y compararla con líneas que sobreexpresan los genes B endógenos de *A. thaliana*.
2. Analizar la morfología floral de líneas de *A. thaliana* mutantes para los genes B que sobreexpresan los genes B de *L. schismatica* al hacer cruces entre líneas mutantes y líneas de sobreexpresión.
3. Analizar la morfología floral de líneas “quiméricas” de *A. thaliana* que

expresan un gen B de *L. schismatica* bajo el promotor del gen B correspondiente de *A. thaliana* (*AP3* y *PI*) en fondo mutante sencillo (*ap3-3* y *pi-1*).

4. Generar y analizar la morfología floral de líneas que expresen las dos construcciones “quiméricas” de *L. schismatica* en fondo doble mutante.
5. Correlacionar los fenotipos de dichas líneas con la expresión de los genes B de *L. schismatica* por hibridación tipo Northern y RT-PCR.
6. Analizar si cambios clave en la secuencias codificantes de los genes y proteínas B pueden estar relacionadas con los fenotipos de sobreexpresión y complementación observado en las línea analizadas. En cuyo caso se podría plantear la hipótesis que cambios a estos niveles podrían explicar al menos parcialmente el fenotipo homeótico de *L. schismatica*, tal como sucede en otros casos de animales y plantas (Galant & Carroll, 2002; Lamb & Irish, 2003).

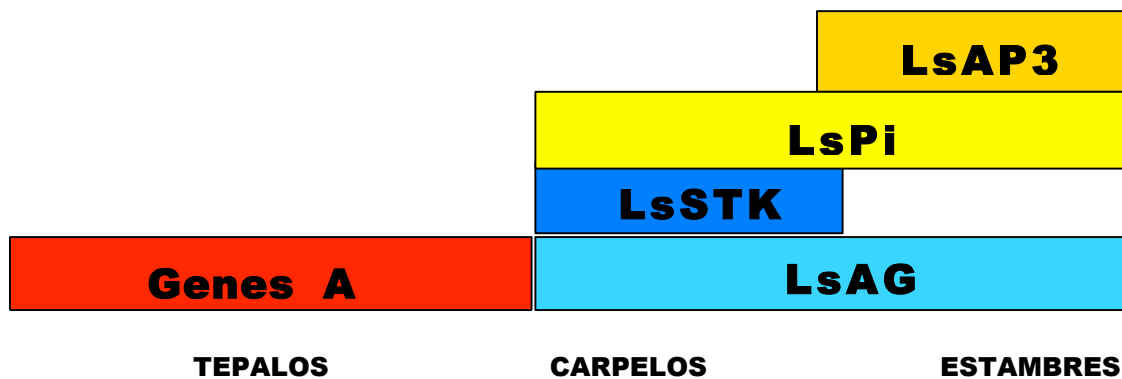
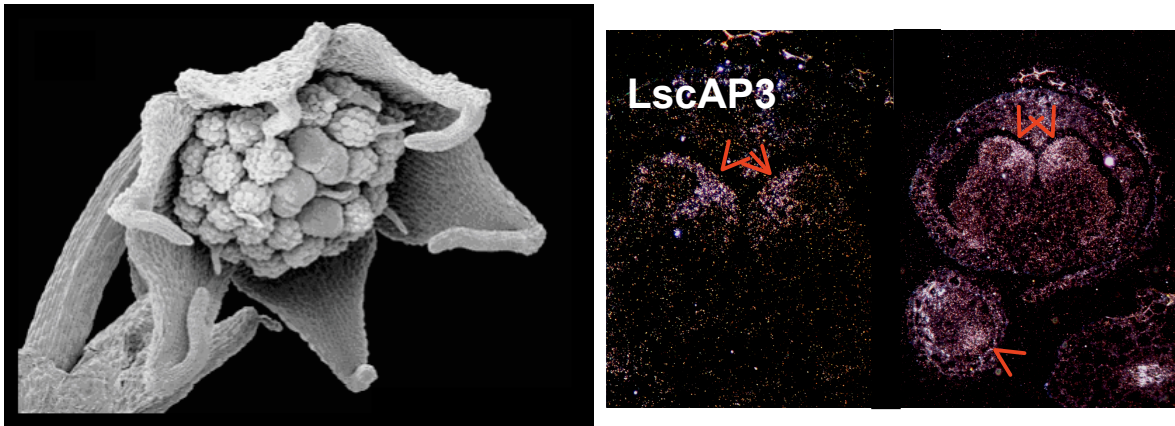


Figura 3. ¿Genes B de *Lacandonia schismatica* y *Arabidopsis thaliana* funcionalmente conservados? Se observa como *LsAP3* se expresa en los primordios centrales de la flor de *L. schismatica* y que dan lugar a estambres. Esta heterotopía puede ser la explicación proximal molecular al fenotipo homeótico de *L. schismatica* si y solo si *LsAP3* determina estambres como *AP3*. En el diagrama de abajo se representan los patrones de expresión de *LsPi*, y las copias putativas de *LsAG* y *LsSTK*. Los tres últimos genes tienen patrones de expresión similares a los encontrados en especies modelo (Vergara-Silva *et al* no publicado y Vergara-Silva, 2002).

METODOLOGÍA

Para lograr entender el grado de conservación de la función que tienen los genes pertenecientes al linaje B de *L. schismatica* fue necesario utilizar a la planta modelo *A. thaliana* dadas las absolutas restricciones experimentales que hay para generar líneas mutantes de *L. schismatica* o para transformarla genéticamente (ver Introducción). El presente trabajo es una continuación del trabajo experimental que realizaron la Dra. Barbara Ambrose, la Dra. Elena Álvarez-Buylla y el Dr. Francisco Vergara Silva.

En el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas se transformaron con dos tipos de construcciones diferentes líneas silvestres (*wt*) de *A. thaliana* mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*. El primer tipo consiste en plásmidos con una de las secuencias del cDNA de los genes B de *L. schismatica* acoplados al promotor 35SCamV, el cual dirige la expresión de un gen en todas las células y tiempos en el desarrollo de la planta (Figuras 4 y 5). El segundo tipo de construcciones tiene acoplado el cDNA de un gen B de *L. schismatica* al promotor heterólogo respectivo de *A. thaliana*, de tal manera que la expresión de *LsAP3* y *LsPI* está en el 1er, 2do y 3er verticilo floral y en el 2do, 3er y 4to verticilo, respectivamente. A éste último tipo de construcciones, se les denominó construcciones quiméricas (Figuras 9 y 10).

Para el siguiente trabajo se utilizaron nomenclaturas generacionales similares a las usadas en estudios hechos para maíz (ver libro de cruza del laboratorio GeMoDe-y-Ev de Plantas). Cada generación de plantas lleva las iniciales de la persona que las sembró y lleva asociada un número arbitrario, seguido por un guión y otro número que determinan la identidad de cada individuo. Una X encerrada por un círculo significa autofecundación y una x significa una cruce con otro individuo. A continuación se muestra la historia de una línea

35S::*LsPI* que se llevó a homocigosis, se cruzó con una línea homocigota para el alelo *pi-1* y se vio la segregación de los cuatro fenotipo posibles en la F2:

BA 007 → Líneas *wt* transformadas con la construcción 35S::*LsPI* (To)

BA 015 → 007 (X) (T1) Población hemicigota para la construcción.

EFS 330 → 15-1 (X) (T2) Población segregante para la construcción.

BA 029 → 15-1 (X) x 62-3(X) (Cruza entre la planta 35S::*LsPI* homocigota y la planta *pi-1/pi-1*)

BA 62 → F1 de 15-1 (X) x 62-3(X) Colecta de semillas de 5 Plantas.

EFS 300 → 62-3 (X) F2 que segrega un locus transgénico, uno mutante y uno *wt*.

Análisis genotípico de líneas de sobreexpresión en fondo *wt* y mutante.

Líneas de sobreexpresión. Para el caso de construcciones 35S::*LsPI*, se sembraron semillas T1 (EFS 330-1 a EFS 330-10) que segregaban dicha construcción. Se extrajo RNA total de hojas con un método convencional de Trizol (Vergara-Silva, 2002) de las plantas con un fenotipo homeótico. Se corrieron 5_μg de RNA total en un gel de agarosa y formaldehído al 3%. Se transfirió el RNA a una membrana de nylon que se hibridó con una sonda específica para *LsPI* con lavados a 60°C (Sambrook, MacCallum y Rusell, 2001).

La sonda comprende una secuencia de la región 3' del transgen y fue amplificada con los primers *LsPIspF* (5'GATCTTAAGTCGCTAGGAGC) y *LsPIspR* (5'TGGGAAGCGTAATTGCGGTC). La sonda fue marcada con ³²P siguiendo el protocolo de "DNA labelling beads" (Amersham Biosciences). Se usó como control de carga el RNA ribosomal y como control negativo RNA total de plantas *wt*.

Líneas de complementación. Generaciones T2 tanto de plantas con las construcciones de sobreexpresión fueron cruzadas con plantas *ap3-3/-3* y *pi-1/pi-1*. Para cada cruza, las

segregaciones de las F2's fueron analizadas por ensayos de RT-PCR a partir de 1 µg de RNA total de tejidos de cada fenotipo encontrado usando los primers LsPlspF (5'GATCTTAAGCTCGCTAGGAGC) y LsPispR (5'TGGGAAGCGTAATTGCGGTC) para las construcciones de 35S::LsPI y los primers LsAP3SpF (5' CCACACAGACAGATACCTAC) y LsAP3SpR (5'TGAACATGTGGGGGCTCCC) para las construcciones 35S::LsAP3. Se amplificó tubulina como control de carga, RNA de líneas T1 como control positivo y RNA total de plantas *wt* como control negativo. Las condiciones para los dos primers son 1 ciclo de 94°C por 1', 30 ciclos de (94°C por 1', 55°C por 30" y 72° por 1') seguido de un ciclo de 72°C por 5'.

Análisis fenotípico de líneas de complementación y sobreexpresión.

Se hicieron pruebas de χ^2 para comprobar la segregación mendeliana de las diferentes cruzas hechas con los alelos mutantes. Se clasificaron los fenotipos observados de acuerdo al grado de complementación y siguiendo únicamente la formación de cualesquiera de los 4 órganos florales de *A. thaliana*. Se utilizaron poblaciones de alrededor de 30 plantas hermanas para cada segregación.

Los fenotipos de cada línea fueron analizados con microscopia óptica usando una cámara OLYMPUS C-5060. Se prepararon para MEB fijándolas en FAA y deshidratándolas con series de etanol a distintas concentraciones, se secaron a punto crítico con CO2 y se recubrieron con oro (Weigel, 2002). Se utilizó un microscopio electrónico JEOL Modelo JSM-5310LV del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Cada verticilo floral fue analizado por separado con disecciones previamente hechas en la desecación y comparando cada muestra con una flor *wt*.

Obtención de líneas de complementación quiméricas en fondos mutantes.

Las líneas de complementación quimérica en fondos mutante fueron realizadas previamente en el laboratorio por B. Ambrose utilizando el plásmido pAP3 short, el cual tiene el promotor mínimo de *AP3* y que fue fusionado al cDNA de *LsAP3* (plásmido donado por J. L. Bowman). Por otro lado, se insertó en el plásmido BJ36 el promotor completo de *PI* unido al cDNA de *LsPI* y finalmente movió esta construcción al vector binario part27 para transformar con *Agrobacterium tumefaciens*.

En esta tesis se sembraron líneas T1 para cada construcción y se realizaron PCR's con los primers LsPIchim (5'GAGAAAGATGGGAAGGGGAAGATC) y 02LPi (5'GGATCCCTATTT ATTCTCTTGCAAATTTGGCTGG) para corroborar la inserción PI::LsPI y los primers LsAP3bgl5 (5'AGATCTATGGGCAGGGGAAAGATCGAGATCAAG) y LsAP3bgl3 (5' AGATCTCTAGGCAAGACGAAGGTCATGGAAG) para corroborar la inserción AP3::LsAP3.

Las líneas que presentaban una inserción (hemicigotas) se dejaron autocruzar y se sembraron semillas de las hijas. Nuevamente se hicieron ensayos de corroboración de la inserción y se dejaron autocruzar plantas que tuvieran presente la inserción. Alrededor de 100 semillas en la T3 fueron sembradas en placas de medio MS 0.2X con Kan (50 mg/ml) para corroborar la homocigosis de las construcciones. Se escogieron 2 líneas homocigotas para las construcciones y fueron cruzadas entre sí para obtener líneas con las 2 construcciones transgénicas. Se corroboró la presencia de las dos inserciones por PCR en la F1 de la crua. Dicha generación fue cruzada con plantas *ap3-3/ap3-3* y con plantas *pi-1/pi-1*. La descendencia de dicha crua fue analizada por PCR y se escogieron las plantas segregando las dos construcciones quiméricas para cruzarlas a su vez entre sí y dejarlas autocruzar. De tal manera que por un lado se viera en la F2 segregaciones de plantas con una o dos construcciones en fondo mutante sencillo y por el otro lado se hiciera una crua

entre dos plantas con las dos construcciones quiméricas presentes en homocigosis y los dos alelos mutantes presentes en heterocigosis. El diseño de las cruzas anteriores responde al hecho de que los mutantes *ap3-3/ap3-3* y *pi-1/pi-1* son infértiles masculinos. Y que datos preliminares de B. Ambrose mostraban que cruzas sencillas *AP3::LsAP3* x *ap3-3/ap3-3* no tenían ningún grado de rescate.

La F1 de la última craza *AP3::LsAP3; PI::LsPI; ap3-3/+* x *AP3::LsAP3; PI::LsPI; pi-1/+* se analizó nuevamente por PCR y se escogieron las plantas que tuvieran las dos construcciones transgénicas. Dichas plantas se dejaron autocruzar y actualmente se está analizando la segregación en la F2 analizando por PCR y fenotípicamente las plantas segregando un fenotipo mutante.

La homocigosis del alelo *ap3-3* fue corroborada al amplificar el locus *AP3* con los primers APR-ClaF (5'AGAGGATAGAGAACCAGACAAATCGA) y RTLAP3R (5'GGTTTTAGCAACACCATGCCTGAT) que amplifican un sitio de digestión de la enzima *ClaI* en el alelo mutante pero no en el *wt*. Las amplificaciones digeridas fueron corridas por electroforesis en geles de agarosa al 2%. La homocigosis del alelo *pi-1* fue corroborada al secuenciar el locus con los primers EFS-Pi-138F (5'TGACGTTCTCAAAGAGGAG) y RTL-PI-R (5'CTTACAACTGGAGCTCAGGCA)

A continuación se muestra un diagrama que ilustra las cruzas hechas para obtener las diferentes líneas de complementación con construcciones quiméricas:

A = *AP3::LsAP3*

B = *PI::LsPI*

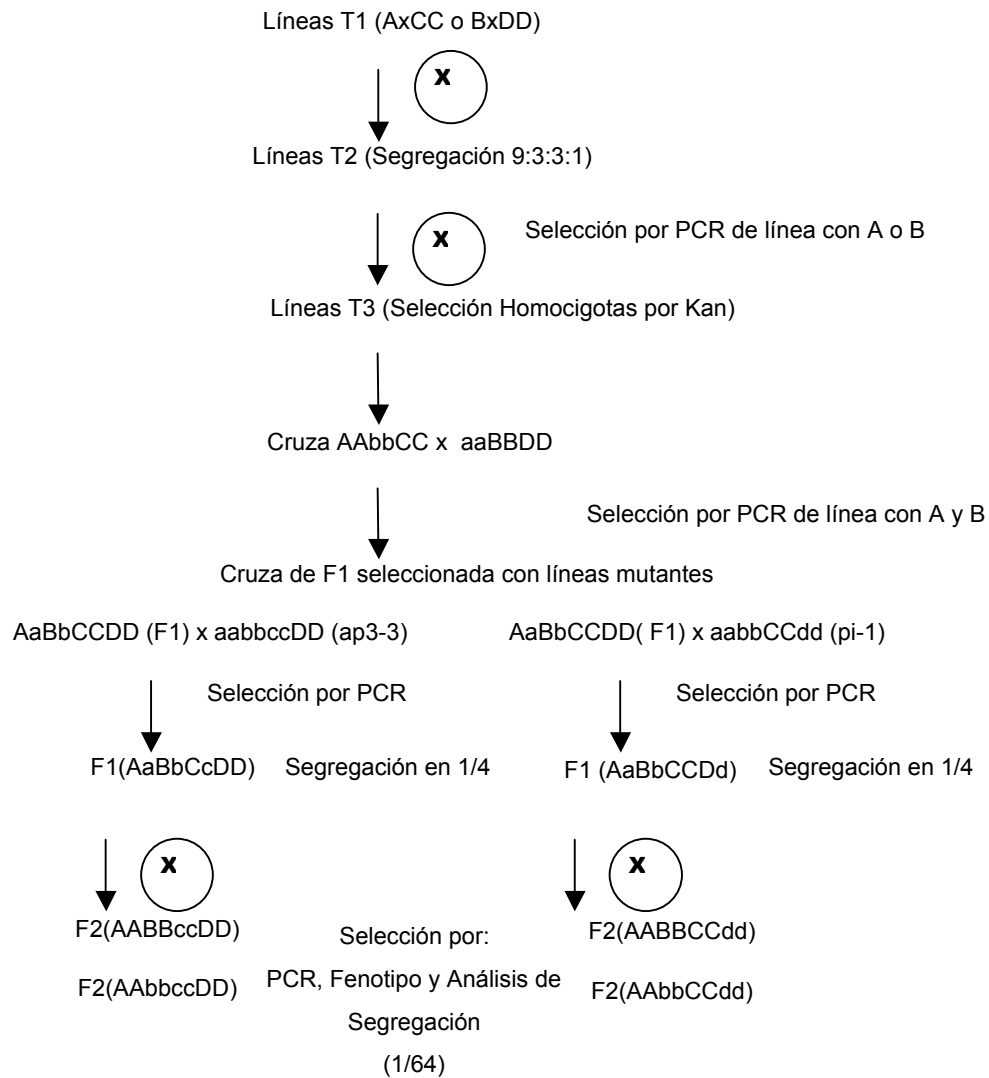
C = *AP3 (wt)*

c = *ap3-3*

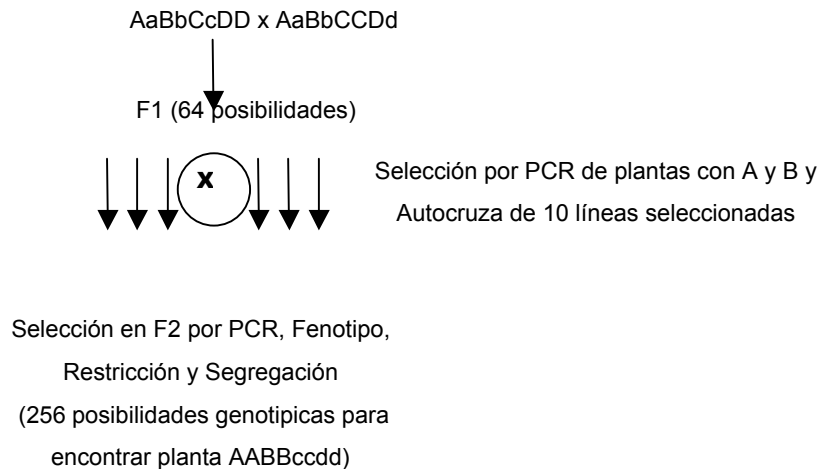
D = *PI (wt)*

d = *pi-1*

(X) = Autocruza



Cruza Final para obtener 4 loci de interés



RESULTADOS

Conservación funcional de *LsPI* al sobreexpresarse en *Arabidopsis thaliana*

Cuando se sobreexpresa el gen *LsPI* en fondo silvestre (*wt*), las flores de las plantas F1 tienen una conversión parcial de sépalos a pétalos. Es decir, los órganos del 1er verticilo floral son órganos quiméricos con células mayoritariamente de tipo petaloide que se transforman gradualmente en células sepaloideas, conforme se avanza a la base de los órganos (Figuras 4C, 6E). Este tipo de órganos también presenta tricomas tal como sucede en sépalos *wt*. La fase de transición entre un tipo celular y otro se observa claramente con microscopia electrónica de barrido (Figura 7G). Este fenotipo se debe probablemente a la interacción de los genes tipo A de *A. thaliana* con un heterodímero quimérico entre *AP3* y *LsPI* en el 1er verticilo floral. Este fenotipo es similar al encontrado por Krizek & Meyerowitz (1996) en el que también observan órganos quiméricos cuando se sobreexpresa el gen endógeno de *PI* en fondo *wt* (Figuras 4A, 6D).

Experimentos de hibridación tipo *Northern* realizados para 5 F1's independientes muestran que el fenotipo homeótico de estas líneas está correlacionado con la expresión del gen y más aún, diferencias en las cantidades de transcrito no modifican el fenotipo observado. Sugiriendo que el fenotipo no es dosis- dependiente una vez pasado el umbral de sobreexpresión conferido por el promotor 35S (Figura 8A).

Cuando las líneas homocigotas 35S::*LsPI* fueron cruzadas con plantas homocigotas para el alelo mutante *pi-1*, la F2 reveló fenotipos denominados de “rescate” parcial que segregan de acuerdo a proporciones mendelianas (Tabla 1). Plantas con éste fenotipo mostraban morfologías florales con quimeras pétalo/sépalo en los dos primeros verticilos

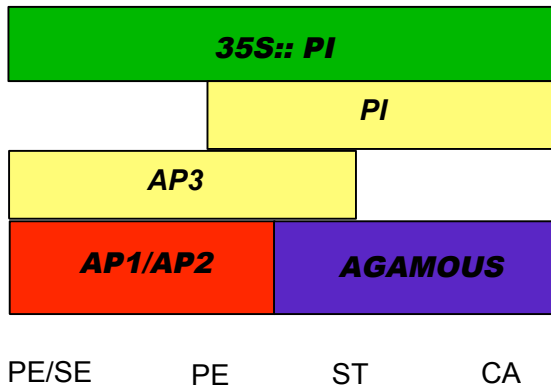
florales y quimeras estambres/carpelo en el 3er verticilo floral (Figuras 4D, 6F y 7H-I).

Aproximadamente la mitad de los 6 estambres encontrados en ese verticilo tienen identidad *wt* y la otra mitad tiene órganos con la forma de un estambre pero compuesto mayoritariamente por células carpeloides y papilas estigmáticas en el ápice (Figura 7J-K). Estas flores son capaces de producir polen y autofecundarse aunque en frecuencias bajas dado que solo la mitad de sus estambres son funcionales (Figura 6F).

A pesar de la formación de órganos quiméricos, los efectos fenotípicos que tiene la sobreexpresión de *PI* y *LsPI* son muy parecidos. La similitud entre aminoácidos de *PI* y *LsPI* en términos totales y por dominio particular puede verse en la Tabla 2. Por ejemplo, se observa un 55% de similitud entre la secuencia total de aminoácidos de *LsPI* y *PI*, porcentaje superior al 49% de similitud entre *Zmm16* y *PI*. En la tabla 2 se hace notar que la similitud total de aminoácidos entre las proteínas decrece hacia el extremo C-terminal, siendo la caja MADS la más conservada y el dominio C-terminal el menos conservado.

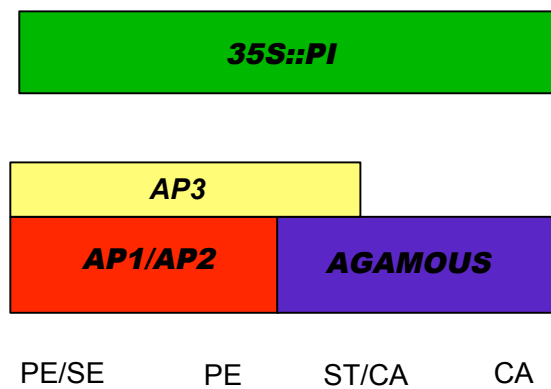
Fenotipos Esperados

Fondo wt



A

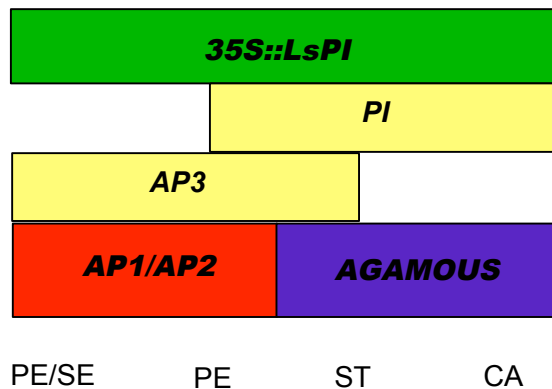
Fondo Mutante



B

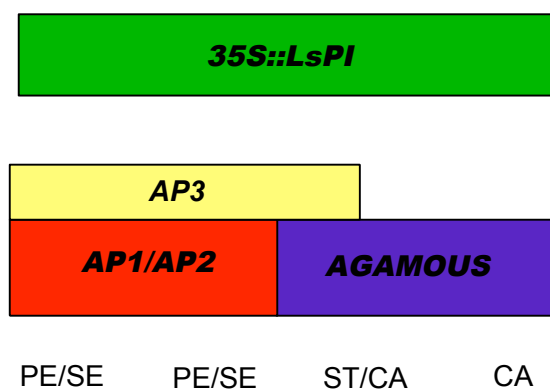
Fenotipos Encontrados

Fondo wt



C

Fondo Mutante



D

Figura 4. Experimentos de sobreexpresión de *LsPI* en fondo *wt* y *pi-1* de *A. thaliana*. Se comparan los fenotipos encontrados en esta tesis con controles hechos en *A. thaliana*. De haber un 100% de conservación entre los genes ortólogos el fenotipo floral de los dos tipos de líneas sería el mismo. **A.** Sobreexpresión de *PI* en fondo silvestre, en donde la conversión de sépalos a pétalos no es completa. **B.** Sobreexpresión de *PI* en fondo mutante, en donde la complementación de estambres en el 3er verticilo no es completa (Krizek y Meyerowitz, 1996). **C.** Sobreexpresión de *LsPI* en fondo silvestre produce un fenotipo igual al de A. **D.** Sobreexpresión de *LsPI* en fondo mutante, con fenotipo floral igual al de B. salvo que la recuperación de pétalos el 2do verticilo no es completa

Conservación funcional parcial de *LsAP3* al sobreexpresarse en *Arabidopsis thaliana*

Al hacer los experimentos anteriormente mencionados con *LsAP3*, el resultado fue sorprendente. En las líneas de sobreexpresión de *AP3* en fondo *wt*, ocurre una conversión homeótica total de carpelos en estambres en las flores de *A. thaliana* (Figura 5A, 6G), esto se debe a la interacción de las proteínas B y C en el cuarto verticilo floral (Jack *et al*, 1994). Curiosamente, cuando se sobre expresan las proteínas de *LsAP3* bajo el mismo promotor en *A. thaliana*, las flores tienen un fenotipo *wt* (Figura 6H). Esto no se debe a un efecto de cosupresión puesto que experimentos de hibridación tipo Northern realizados corroboraron la expresión de *LsAP3* (Figura 8B).

Es muy interesante que, cuando estas líneas fueron cruzadas con plantas homocigotas para el alelo *ap3-3*; la F2 mostró que las plantas que segregaban tanto la construcción de sobreexpresión como el alelo mutante (Tabla 1), recuperaban órganos quiméricos con forma de estambres y con células mayoritariamente de carpelos en el 3er verticilo floral (Figura 6I). Este fenotipo es distinto al del mutante *ap3-3* en el que se ven ocasionalmente filamentos tipo estambres (Figura 7M-N). Al contrario del caso de *LsPI*, en este caso no existe ninguna recuperación de sépalos a pétalos en los órganos del 2do verticilo floral para este tipo de plantas (Figura 7H-J). Por último, este tipo de plantas producen muy poco polen y semillas.

En resumen, la función de *LsAP3* parece mucho menos conservada entre las dos especies en comparación a *LsPI*, ya que la primera es menos capaz de llevar a cabo la determinación de la identidad de órganos florales en *A. thaliana*. Esto indica que si bien se forman heterodímeros quiméricos con PI, estos se forman de manera muy esporádica y que la interacción con los genes A debe de ser nula, aún a pesar de estar expresado el mRNA de

AP3 de *L. schismatica* de manera constitutiva. La Tabla 2 muestra los porcentajes de identidad de secuencias de aminoácidos entre *AP3* y *LsAP3* divididos en los diferentes dominios de la proteína.

Se hicieron análisis de expresión para los genes B de *L. schismatica* por RT-PCR en las F2's de las dos cruzas de las líneas de sobreexpresión para estudiar la correlación entre los fenotipos florales de “rescate” y la expresión de *LsAP3* o *LsPI* (Figura 8C-D). Estos experimentos muestran que se puede detectar el mRNA tanto de *LsAP3* y *LsPI* en todas las plantas con fenotipos de sobreexpresión sencilla, fenotipos de complementación, pero no en aquellas con fenotipos mutantes o *wt* (en los casos en los que se puede distinguir entre fenotipos de sobreexpresión y fenotipos *wt*)

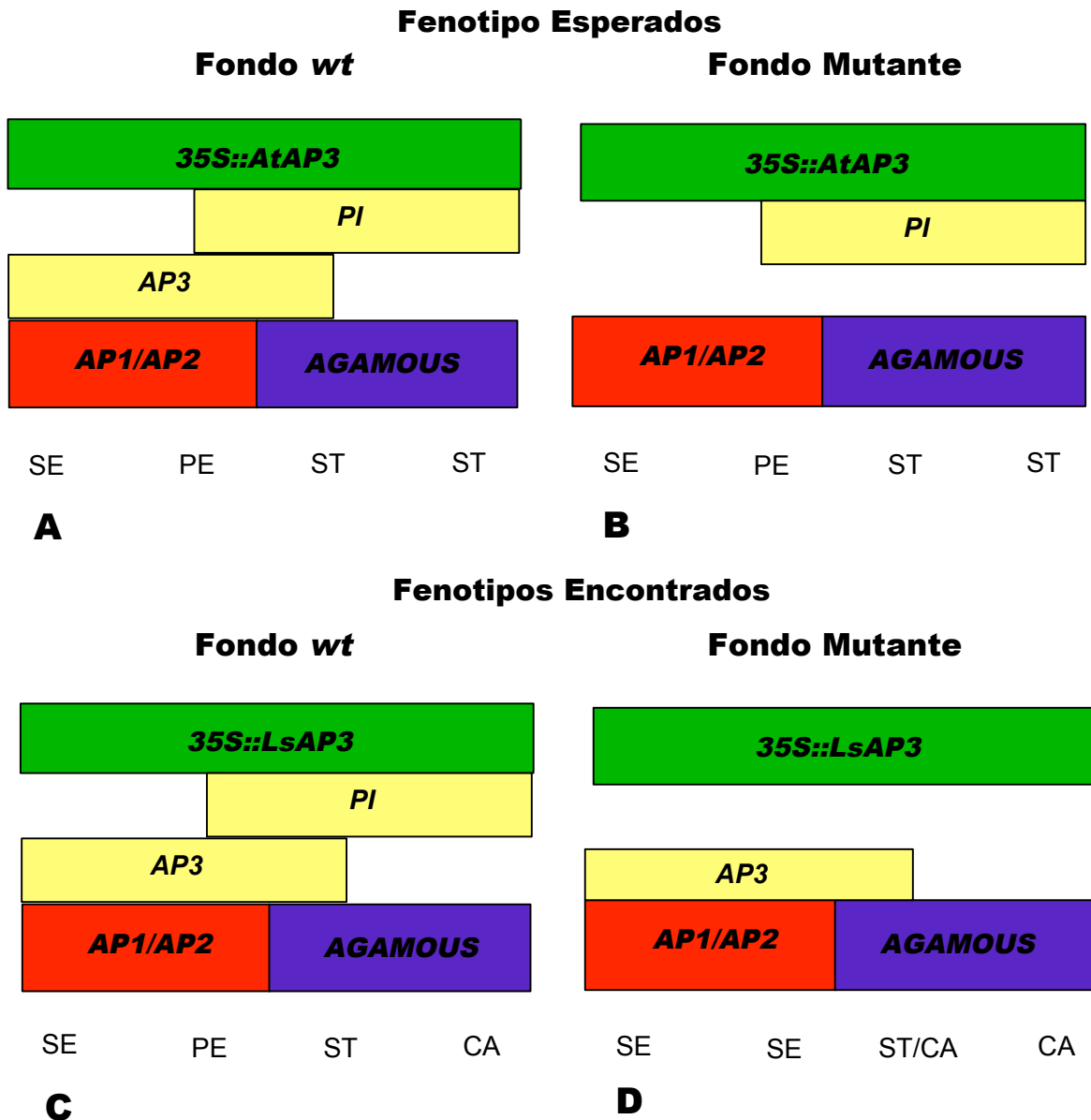


Figura 5. Experimentos de sobreexpresión de *LsAP3* en fondo *wt* y *ap3-3* de *A. thaliana*. Se comparan los fenotipos encontrados en esta tesis con controles hechos en *A. thaliana*. De haber un 100% de conservación entre los genes ortólogos el fenotipo floral de los dos tipos de líneas sería el mismo. **A.** Sobreexpresión de *AP3* en fondo silvestre, en donde la conversión de carpelos a estambres es completa. **B.** Sobreexpresión de *AP3* en fondo mutante, en donde la complementación de estambres en el 3er verticilo es completa (Jack *et al*, 1994). **C.** Sobreexpresión de *LsAP3* en fondo silvestre produce un fenotipo igual al *wt*. **D.** Sobreexpresión de *LsAP3* en fondo mutante en donde se complementan parcialmente estambres en el 3er verticilo y no se complementan pétalos.

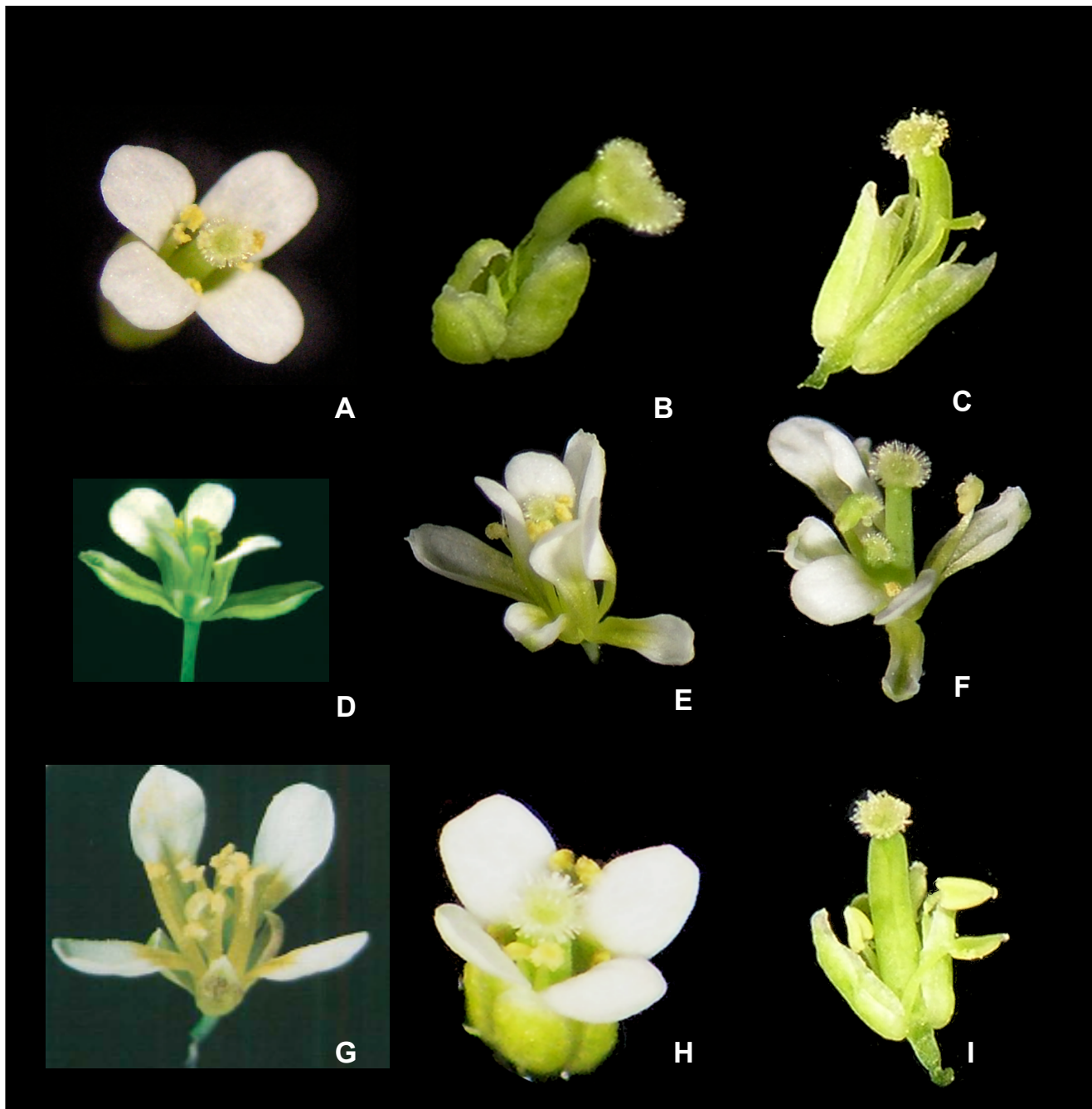


Figura 6. Fenotipos florales de líneas de sobreexpresión en fondo silvestre y mutante

- A. Flor de *Arabidopsis* con genotipo y fenotipo silvestre.
- B. Mutante *ap3-3/-3*
- C. Mutante *pi-1/-1*
- D. 35S::PISTILLATA (Tomada de Krizek & Meyerowitz, 1996). Con conversión parcial de sépalos a pétalos en 1er verticilo floral.
- E. 35S::LsPI. Con conversión parcial de sépalos a pétalos en 1er verticilo floral.
- F. 35S::LsPI x *pi-1/-1*. Con rescate parcial de órganos del 3er verticilo (Aprox. 50% son quiméricos entre carpelos y estambres). El rescate es parcial también en órganos Del 2do verticilo.
- G. 35S::APETALA3 (Tomada de Jack *et al*, 1994). Con conversión total de carpelos a estambres en el 4to verticilo floral.
- H. 35S::LsAP3 con fenotipo Silvestre.
- I. 35S::LsAP3 x *ap3-3/ap3-3*. Con de órganos del 3er verticilo (100% son quiméricos entre carpelos y estambres). El rescate es nulo en órganos del 2do verticilo.

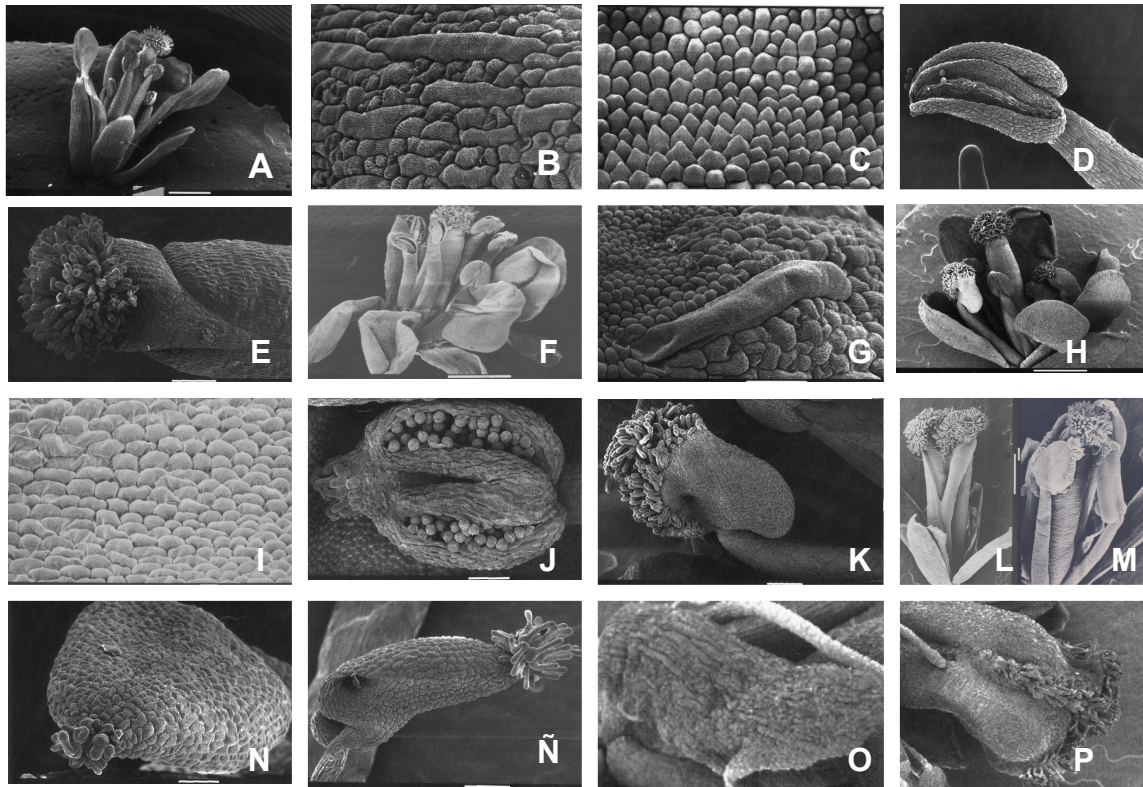


Figura 7. Fenotipos florales de líneas de sobreexpresión en fondo silvestre y mutante usando Microscopia Electrónica de Barrido:

- A. Flor Silvestre mostrando los cuatro verticilos
- B. Tejido abaxial de sépalos de flor silvestre
- C. Tejido abaxial de pétalos de flor silvestre
- D. Estambre de flor silvestre
- E. Carpelo silvestre
- F. Vista general de flor con genotipo 35S::LsPI, se observan transformaciones de sépalos por estambres.
- G. Tejido abaxial de órgano de primer verticilo de flores 35S::LsPI; se observan órganos quiméricos entre pétalos (izquierda) y sépalos (derecha)
- H. Vista general de flor con genotipo 35S::LsPi x pi-1, se observan órganos quiméricos en los primeros tres verticilos florales.
- I. Tejido abaxial de órganos de segundo verticilo de flores de 35S::LsPi x pi-1 en el que se ven células de pétalos y células alargadas sepaloideas.
- J. Órganos del 3er verticilo floral en los que se pueden distinguir órganos tipo estambres pero con papilas estigmáticas en el ápice.
- K. Órganos del 3er verticilo floral en los que se pueden distinguir filamentos estaminoides sosteniendo tejido con células estambres y mayoritariamente de carpelos.
- L. Vista general de flor con genotipo de ap3-3
- M. Vista general de flor con genotipo 35S::LsAP3 x ap3-3
- N. Órganos del 3er verticilo de plantas con genotipo 35S::LsAP3 x ap3-3
- O. Ver L. La mayoría de los órganos carecen de polen.
- P. Órganos del 2do verticilo de 35S::LsAP3 x ap3-3 que mantienen identidad de sépalos tal como en el mutante.
- Q. Órganos del 4to verticilo de 35S::LsAP3 x ap3-3 que mantienen identidad de carpelos.

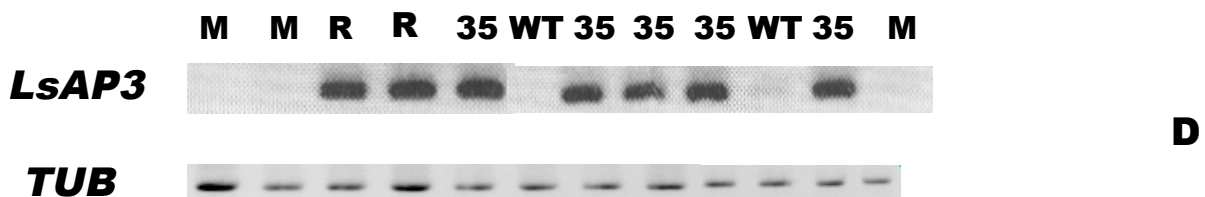
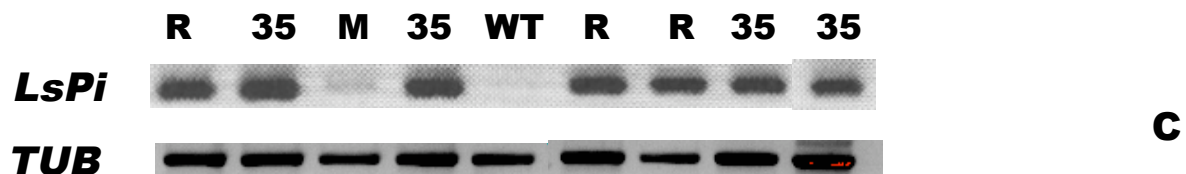
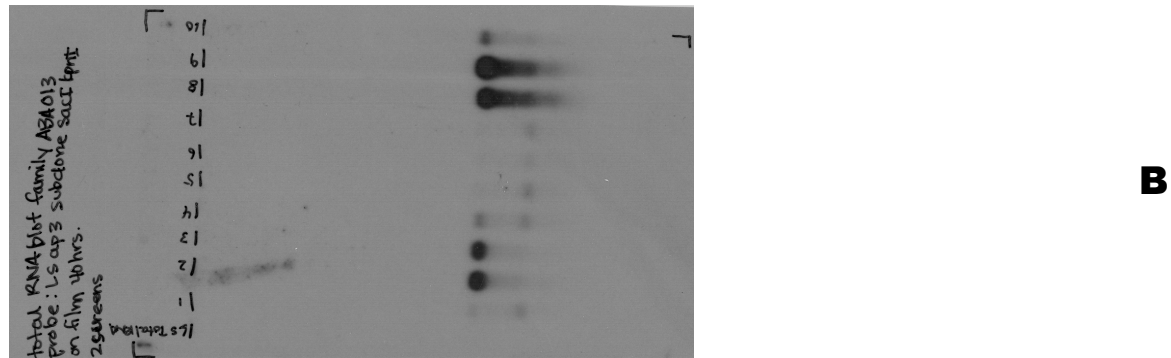
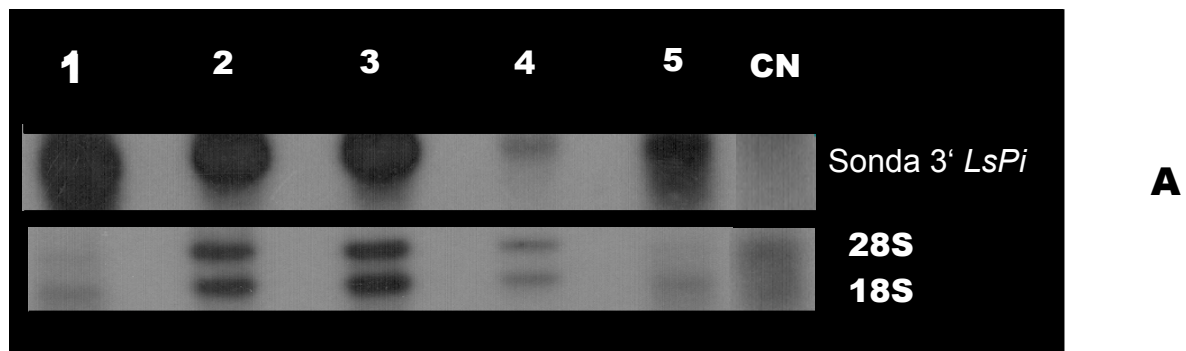


Figura 8. Corroboración de expresión de genes B de *L. schismatica* en líneas de sobreexpresión. **A.** Northern Blot de líneas T1 transformadas con 35S::*LsPi*. **B.** Northern Blot de líneas T1 transformadas con 35S::*LsAP3* (B. Ambrose). **C.** RT-PCR para detectar *LsPi* en una serie de plantas hermanas hijas de una cruce entre 35S::*LsPi* y *pi-1/pi-1* (generación F2). **D.** RT-PCR para detectar *LsAP3* en una serie de plantas hermanas hijas de una cruce entre 35S::*LsAP3* y *ap3-3/ap3-3* (generación F2). R = Líneas de rescate o complementación (e.g. Figura 7H o 7M). M = Líneas mutantes (Figura 6C o 7L). 35 = Líneas de sobreexpresión (Figura 6B o 6E). WT = Líneas silvestres (Figura 6A).

Sobreexpresión simultánea de *LsAP3* y *LsPI* en *Arabidopsis thaliana*

En esta tesis también se analizaron cruzas hechas por B. Ambrose entre líneas 35S::LsPI y 35S::LsAP3 que en la F1 no tenían ningún fenotipo distinto al de la simple sobreexpresión de 35S::LsPI (Figura 6E). Y que difiere al fenotipo del control hecho por Krizek & Meyerowitz (1996) que al sobreexpresar los dos genes endógenos de *A. thaliana* obtienen flores con 2 verticilos externos de pétalos y dos verticilos internos de estambres. Estos experimentos sugieren que la interacción de las 2 proteínas sobreexpresadas *per se* no puede determinar la identidad de estambres o que existen otras proteínas como PI que pueden estar compitiendo con los sitios interacción proteína-proteína entre LsPI y LsAP3, evitando la formación de un heterodímero funcional entre LsPI y LsAP3.

Tabla 1. Frecuencias fenotípicas en la F2 de cruzas entre líneas de sobreexpresión y líneas mutantes.	
Fenotipo	Frecuencia
35SLsPI x <i>pi-1/pi-1</i>	
35SLsPI	0.53
<i>Wt</i>	0.21
35SLsPI x <i>pi-1</i>	0.14
<i>pi-1</i>	0.1
$\chi^2_{0.95} = 1.3324, (N = 28).$	
35SLsAP3 x <i>ap3-3/ap3-3</i>	
<i>Wt</i>	0.615
35SLsAP3 x <i>ap3-3</i>	0.34
<i>ap3-3</i>	0.38
$\chi^2_{0.95} = 4.3588, (N = 26).$	

Tabla 2. Identidad entre genes B de monocotiledoneas y <i>Arabidopsis thaliana</i> a partir de alineaciones a “ojo” entre aminoácidos				
Región	LsAP3 vs AP3	SILKY vs AP3	LsPI vs PI	Zmm16 vs LsPI
MADS	77%	77%	75%	71%
Region I	50%	43%	61%	48%
Región K	48%	48%	54%	50%
C-terminal	20%	22%	35%	31%
Gen completo	42%	44%	55%	49%

Construcciones químéricas sin complementación en mutantes sencillos y conservación putativa de un heterodímero homólogo funcional.

Con el objetivo de tener análisis más finos de conservación de la función B de las proteínas B de *L. schismatica*, en la presente tesis se analizaron líneas de *A. thaliana* con construcciones químéricas en las que los promotores endógenos de los genes B de *A. thaliana* dirigen la expresión de los cDNA's de sus respectivos homólogos de *L. schismatica*. Estos son experimentos similares a los hechos para el maíz por Whipple y colaboradores en el 2004 (Figura 9A-E). El uso de los promotores endógenos de *A. thaliana* garantiza que las proteínas exógenas se expresen en el sitio y tiempo precisos para determinar estambres y pétalos y así las proteínas correspondientes interactúan solo con aquellos péptidos que normalmente se coexpresan con las proteínas B en *A. thaliana*. Por ello, a diferencia de las líneas de sobreexpresión que se analizaron tanto en fondo mutante como silvestre, en este caso se analizaron las líneas de complementación hechas en fondos mutantes. Esto se logró mediante cruzas con los mutantes respectivos de los genes B endógenos.

Los resultados para este tipo de experimentos son sorprendentes ya que no se encontró rescate del fenotipo mutante para las cruzas sencillas entre *AtAP3::LsAP3* x *ap3-3* y *AtPI::LsPI* x *pi-1*, aún a pesar de detectar la presencia de los transgenes por PCR de DNA

genómico en plantas segregando los alelos mutantes de manera homocigota (Figura 10A-B).

Pensando que el resultado anterior se debe a que los heterodímeros heterólogos (LsgenB-AtgenB) no son funcionales, se decidió obtener plantas con presencia de las dos construcciones (*AtAP3::LsAP3* y *AtPI::LsPi*) en fondo mutante sencillo para cada gen B y en el fondo doble mutante para ambos genes B. Los fenotipos vistos en las segregaciones de la F2 para el primer caso tampoco son capaces de recuperar ni estambres ni pétalos (Figura 10B)

Finalmente, se analizaron las transgénicas dobles en fondos mutantes dobles con el fin de evitar la competencia de interacciones entre las proteínas endógenas de *A. thaliana* y las de *L. schismatica* con los diversos multímeros que forman las proteínas MADS (formados con genes A, genes C o genes SEPs). Para lograr esto, se diseñaron cruza que segregaran plantas mutadas para los dos genes B de *A. thaliana* y que tuvieran presentes las dos construcciones quiméricas con los genes B de *L. schismatica*. De esta manera, se realizó una cruce entre las líneas con la doble construcción transgénica en fondo mutante sencillo (*AtAP3::LsAP3; AtPI::LsPi; pi-1/+* x *AtAP3::LsAP3; AtPI::LsPi; ap3-3/+*). El uso de plantas heterocigotas para los mutantes B es indispensable puesto que ambos mutante son estériles masculinos en homocigosis. Datos preliminares de análisis de las F2's de 12 autocruzas de este tipo en la 1era generación muestran que en una de estas líneas se segrega con frecuencias de 1/70 plantas con un fenotipo floral de aparente “rescate” del fenotipo mutante. En estas plantas se observan órganos del 2do verticilo floral con identidad quimérica de sépalos y pétalos, así como órganos quiméricos en el 3er verticilo floral con identidad de estambres y carpelos, muy parecidos a los encontrados en los casos de complementación en las líneas de sobreexpresión cruzadas por mutantes sencillos (Figura 10C). Finalmente, cabe mencionar que la simple inserción de uno u ambos genes B de *L. schismatica* no producen

una homeosis con estambres centrales rodeados por carpelos indicando que este fenotipo no depende únicamente de alteraciones en la región codificante de los genes B de *L.*

schismatica.

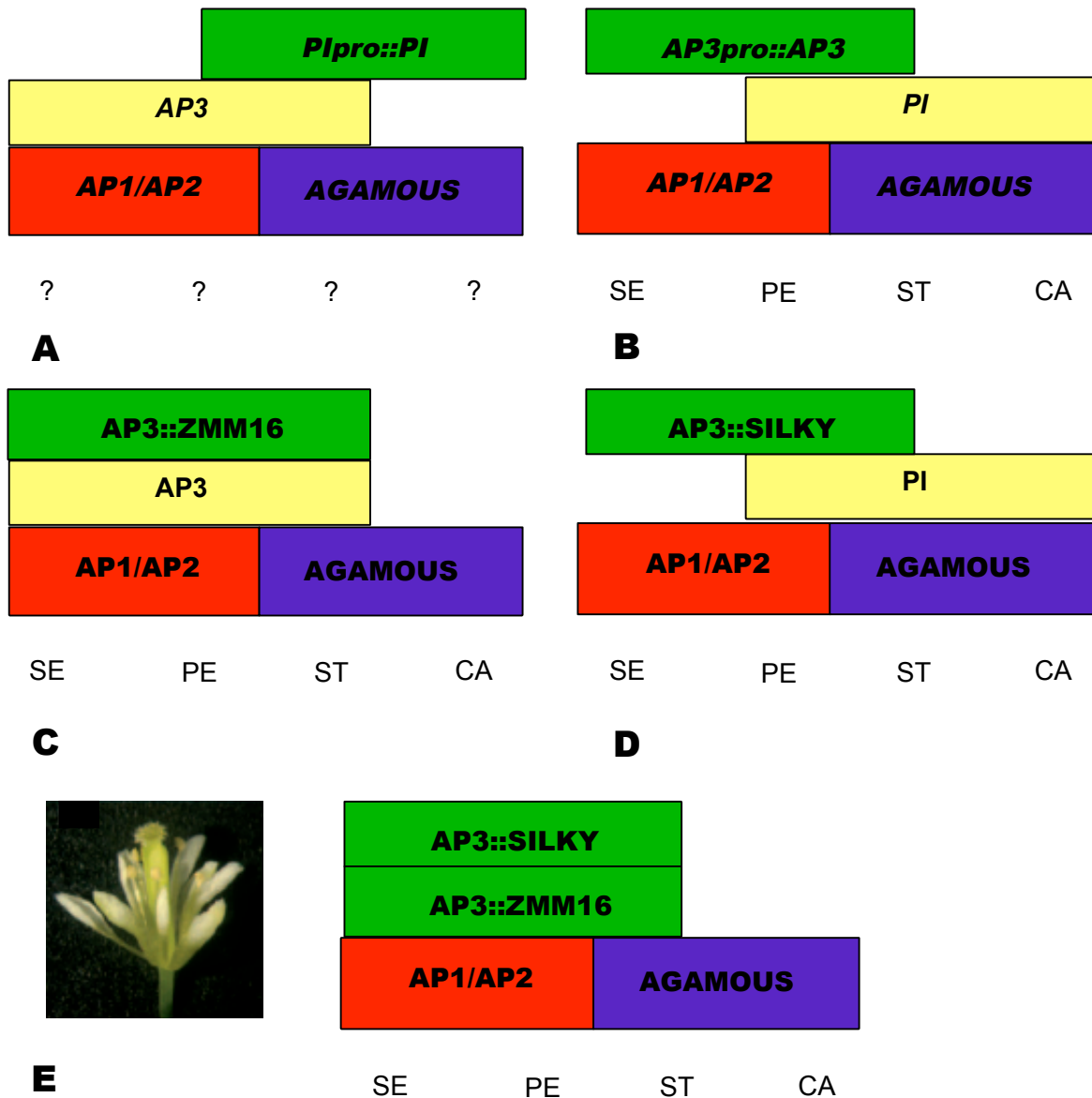


Figura 9. Controles de complementación usando construcciones quiméricas en *A. thaliana* (Modificado de Whipple *et al*, 2004). **A.** El fenotipo floral de líneas expresando el cDNA de *PI* guiado por el promotor de *PI* en fondo *pi-1* no ha sido reportado en la literatura. **B.** Líneas expresando el cDNA de *AP3* guiado por el promotor de *AP3* en fondo *ap3-3* pueden complementar al 100% órganos del 2do y 3er verticilo floral. **C.** Líneas expresando el cDNA de *ZMM16* (maíz) guiado por el promotor de *AP3* en fondo *pi-1* pueden complementar al 100% órganos del 2do y 3er verticilo floral. **D.** Líneas expresando el cDNA de *SILKY* (maíz) guiado por el promotor de *AP3* en fondo *ap3-3* pueden complementar al 100% órganos del 2do y 3er verticilo floral. **E.** Líneas expresando expresando dos construcciones quiméricas del maíz en doble fondo mutante pueden complementar al 100% órganos del 2do y 3er verticilo floral.

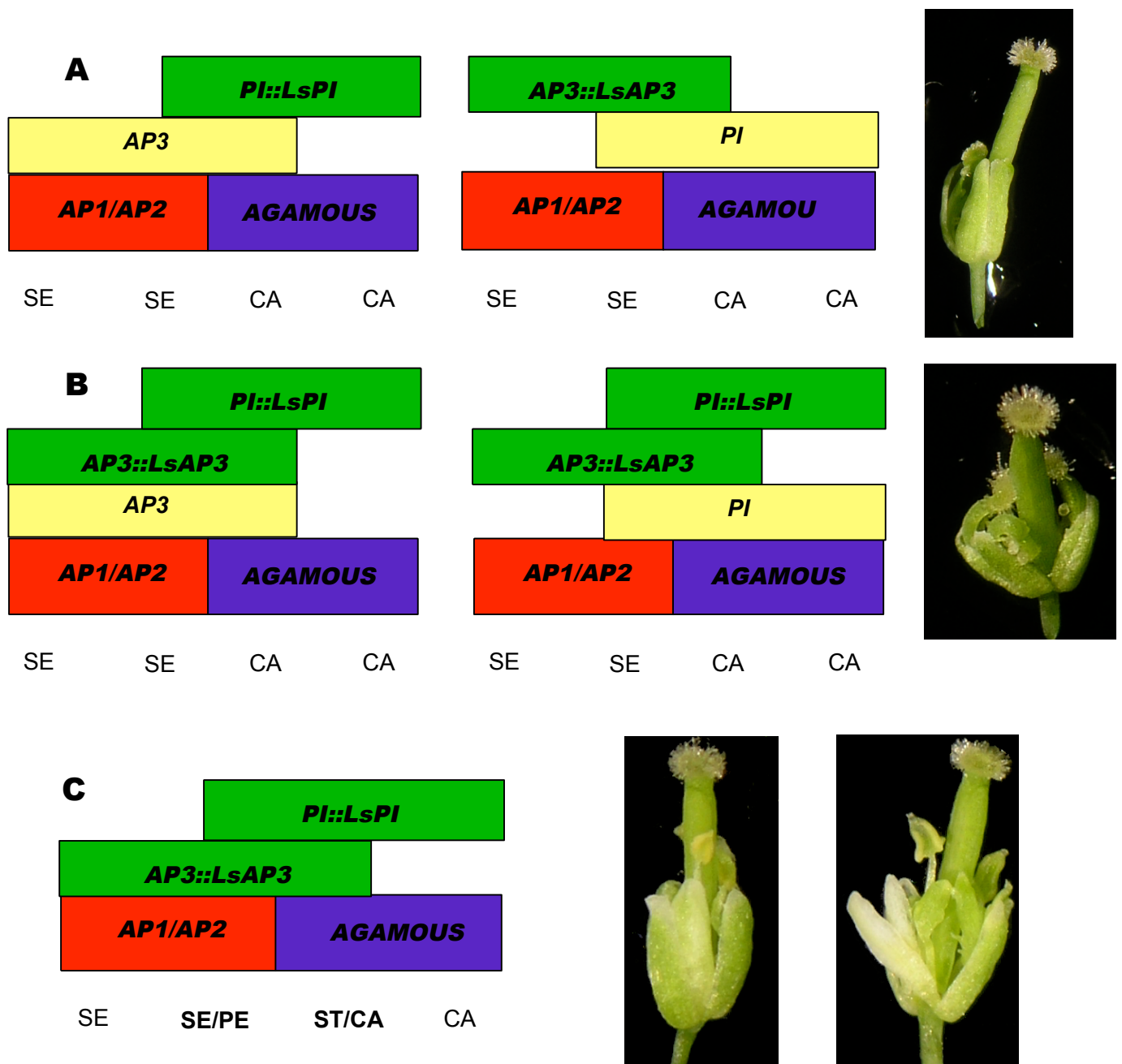


Figura 10. Fenotipos florales de construcciones quiméricas con genes B de *L. schismatica*. **A.** Líneas expresando *AP3::LsAP3* en fondo *ap3-3* o *PI::LsPI* en fondo *pi-1* tienen fenotipos florales indistinguibles a los de los mutantes B. **B.** Líneas expresando conjuntamente *AP3::LsAP3* y *PI::LsPI* en fondo mutante sencillo (ya sea *ap3-3* o *pi-1*) tienen fenotipos iguales al de un mutante B. **C.** Líneas segregantes en f2 de cruce *AP3::LsAP3;PI::LsPI; ap3-3/+* x *AP3::LsAP3; PI::LsPI; pi-1/+*. La identidad putativa de estas líneas es de una planta expresando las 2 construcciones quiméricas en fondo doble mutante (segregación 1/70). El rescate del verticilo 2 y 3 es parcial (Fotos de microscopía óptica a la derecha de cada diagrama).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que las copias homólogas tipo B de *L. schismatica* muestran una conservación parcial en la determinación de estambres y pétalos en *A. thaliana*. Los datos hasta ahora obtenidos apuntan a suponer que durante el desarrollo floral de *L. schismatica*, la expresión conjunta de sus dos genes B solamente determina la identidad de estambres. Esto se debe específicamente a que la proteína de LsAP3 no funciona bien en *A. thaliana*: la sobreexpresión de la proteína mantiene un fenotipo *wt* y en un fondo mutante no produce pétalos y recupera órganos estaminoides que rara vez producen polen (Figuras 5D y 7N, Ñ). Esto podría estar relacionado con una poca similitud en el motivo C-terminal y de la secuencia total de la proteína LsAP3 con respecto a AP3 (Tabla 2). Otro dato interesante es que la secuencia de aminoácidos de LsAP3 se parece 42% a AP3, mientras que LsPI se parece un 55% a PI. Esto es, LsAP3 se parecen menos a AP3 de lo que LsPi se parece a PI. Estas diferencias se notan sobre todo al comparar la región I, K y C. Por ejemplo, la comparación de la región I entre LsAP3/AP3 se parece 11% menos que la comparación entre la región I de LsPi/PI. Para la región K, LsAP3/AP3 se parece un 6% menos al caso de LsPi/PI y la comparación de la región C de LsAP3/AP3 se parece un 13% menos que la comparación LsPi/PI. Esta similitud en la caja K sugiere que ambas proteínas tienen la misma posibilidad de interactuar con otras proteínas MADS y que motivos en las regiones I y C son los responsables de la baja conservación de función de LsAP3 con respecto a LsPI en el contexto genético de *A. thaliana*.

Por un lado, estos resultados son contrastantes con lo que había sido previamente reportado en estudios similares para especies de monocotiledóneas como el maíz; en las que SILKY y Zmm16 pueden rescatar de manera significativa el fenotipo mutante de *A.*

thaliana en construcciones quiméricas similares a las de estos experimentos (Whipple *et al* 2004; Figura 9C-D). Por otro lado, los resultados coinciden con lo encontrado por estudios realizados por Xu y colaboradores (2006) en una orquídea del género *Dendrobium* en donde la sobreexpresión en fondo silvestre de un ortólogo de AP3 tiene fenotipo *wt* y la sobreexpresión en un fondo mutante no recupera en lo absoluto estambres o pétalos. Al compararse cualquiera de las proteínas ortólogas de angiospermas estudiadas hasta el momento, LsAP3 es la que posee una menor similitud con AP3. Las divergencias más claras se encuentran en el dominio C-Terminal, que es un dominio cuya función aún no es del todo conocida, aunque se cree que puede estar involucrado en la estabilización de complejos multiméricos que determinan identidad de estambres y pétalos (Lamb & Irish, 2003; Egea-Cortines, M. *et al*, 1999)

Cabe destacar que el rescate parcial del fenotipo mutante de *A. thaliana* por la construcción 35S::LsAP3 se da con un motivo paleoAP3 altamente conservado, el cual había sido clasificado como un determinante parcial de identidad de estambres pero no de pétalos (Lamb & Irish, 2003).

Consecuentemente, esta evidencia genética sugiere que los tépalos de *L. schismatica* y los pétalos de *A. thaliana* no son equivalentes (homólogos) a nivel molecular, aún cuando la función de LsPI sea muy conservada, especialmente si se asume la conservación de la funcionalidad de heterodímeros de los genes B de *L. schismatica*.

Sin embargo, siendo cautelosos, cabe aún la posibilidad de que otras copias parálogas de *LsPi* y *LsAP3* sean capaces de determinar la identidad de pétalos si por un lado se expresasen en el verticilo externo de la flor *L. schismatica* y por el otro, pudieran complementar la función B en *A. thaliana*. De esta manera, es necesario realizar experimentos de hibridación tipo *Southern* para precisar el número total de copias de este

tipo de genes en *L. schismatica*.

Para cerrar la discusión de la interpretación de la homología de mecanismos que subyacen la determinación de la identidad de los tépalos de *L. schismatica* y monocotiledóneas en general, se proponen tres hipótesis a probarse posteriormente:

A) Los tépalos de *L. schismatica* no se determinan por mecanismos homólogos a los que determinan pétalos en eudicotiledóneas (*i.e.* los genes B de monocotiledóneas no determinan identidad de órganos de perianto), **B)** Otras copias parálogas de genes tipo B de *L. schismatica* determinan la identidad de los tépalos pero no se han detectado y **C)** Los órganos tipo pétalo (del 2do verticilo floral) de *L. schismatica* se han perdido secundariamente y de igual manera los genes tipo B de Triuridaceae han perdido la capacidad de determinar órganos de perianto. Las dos últimas hipótesis no se contraponen a un trabajo publicado por Whipple y colaboradores (2007) en el que se detecta expresión de genes tipo B en los órganos del perianto (adyacentes a estambres) de los taxa basales de pastos y el grupo hermano de los pastos. Este último grupo con una morfología floral clásica de monocotiledónea, con dos verticilos de tépalos, estambres y carpelos.

A pesar de que la carencia de efecto fenotípico ha sido observada incluso en trabajos que pretendían sobreexpresar *AP3* como control (Lamb & Irish, 2003), en nuestro trabajo dudamos que factores implicados en mecanismos de silenciamiento de DNA's exógenos estén impidiendo la sobreexpresión de *LsAP3* dado que se analizó la expresión del transgen a nivel de RNA en 3 líneas independientes.

Para el caso de los experimentos de sobreexpresión de la proteína *LsPI*, los resultados obtenidos muestran una alta conservación de la función de este gen en comparación con el gen endógeno de *A. thaliana*. Las líneas de complementación de función con la construcción

35S::LsPI muestran la capacidad de determinación de identidad de estambres y de pétalos dada la formación de un heterodímero quimérico entre *AP3* y *LsPi*. Este fenotipo es similar al encontrado por Krizek & Meyerowitz (1996) en el que también observan órganos quiméricos cuando se sobreexpresa el gen endógeno de *PI* en fondo *wt* (Figuras 4A y 6D). Además, las plantas *35S::LsPi; pi-1* tienen una morfología de rescate similar a la reportada en el mismo trabajo, presentando órganos quiméricos entre estambres y carpelos en el 3er verticilo floral. La única diferencia radica en que el rescate de pétalos es total con la sobreexpresión del gen endógeno de *A. thaliana*, mientras que con la sobreexpresión de *LsPi* en fondo mutante, los órganos del 2do verticilo son quimeras entre pétalo y sépalo (Figuras 7I).

Estos datos coinciden con lo reportado en estudios con experimentos similares con otras monocotiledóneas (Xu *et al*, 2006) y es apoyado por el hecho que la secuencia de aminoácidos de *LsPI* es más similar a *PI* de lo que es *LsAP3* con respecto a *AP3* (Tabla 2).

Los fenotipos observados para los experimentos de complementación de *35S::LsAP3* y *35S::PI* también sugieren que hay una formación azarosa de heterodímeros multiméricos a través del desarrollo floral de las líneas transgénicas de *A. thaliana*. Dicha relación de agrupaciones posibles puede verse complicada por la actividad del pequeño polipéptido codificado por los alelos mutantes *pi-1* y *ap3-3*, que al estar presentes en los mismos verticilos y al tener una caja MADS parcial que podría interferir con agrupaciones que darían fenotipos totales de rescate. Esto se nota sobre todo en el caso del control de *35S::PI x pi-1* realizado por Krizek & Meyerowitz (1996) en el que ni siquiera la sobreexpresión del gen endógeno puede rescatar del todo el fenotipo mutante (Figura 4A).

A partir de estas observaciones podemos proponer que la falta de complementación vista en las líneas quiméricas expresando genes B de *L. schismatica* en fondo mutante sencillo se debe en parte a la complejidad en las relaciones de competencia por multímeros

debida la acción de los polipéptidos codificados por los alelos *pi-1* o *ap3-3*, así como cualquiera de los genes B de *A. thaliana* que sí están presentes en el fondo mutante sencillo. Esto se corrobora con el hecho de que en los controles hechos por Whipple y colaboradores (2004), en los que expresan construcciones *AP3pro::AP3cDNA* en fondo *ap3-3* en *A. thaliana*, hay líneas que pueden recuperar al 100% estambres y carpelos, pero también hay algunas líneas en la que la recuperación no es completa (Figura 9B).

Otra razón por la cual estas líneas con una o las dos construcciones quiméricas en fondo mutante sencillo no recuperan en absoluto estambres o pétalos, se debería a la mayor divergencia en secuencias de aminoácidos en especial de *LsAP3* (datos que se han discutido anteriormente).

De estos datos podemos concluir que *LsAP3* ha sufrido el mayor grado de divergencia funcional de entre los dos genes B en *L. schismatica*. Curiosamente, *LsAP3* también tiene un patrón de expresión divergente con respecto a lo encontrado para sus ortólogos en otras angiospermas (Vergara-Silva *et al*, no publicado; Vergara-Silva, 2002). Sería interesante analizar si ambos tipos de divergencias subyacen el fenotipo homeótico de *L. schismatica*. Es probable que la acumulación de mutaciones tanto en secuencias codificantes como reguladoras pudo haberse fijado por alteraciones y reducciones genómicas propias de los hábitos de reproducción cleistogámica y micoheterotrofia de esta especie, respectivamente.

La expresión espacio-temporal observada para *LsPI* y *LsAP3* por hibridizaciones *in situ* (Vergara-Silva *et al*, no publicado; Figura 3) muestra que estos genes se expresan conjuntamente solamente en el verticilo central de la flor de *L. schismatica*. Mientras que *LsPI* se expresa en un patrón muy similar al observado para su ortólogo en *A. thaliana*, *LsAP3* se expresa solo en el centro de la flor. Esta información, sugiere fuertemente que la

determinación de identidad de estambres depende de la formación de un heterodímero entre LsPI y LsAP3, tal como ocurre en *A. thaliana*. Consecuentemente, se diseñaron experimentos para obtener líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresaran las dos proteínas B de *L. schismatica* de manera fina y restringida a los verticilos 2 y 3 de la flor de *Arabidopsis* y en un fondo genotípico doble mutante usando los alelos *ap3-3* y *pi-1* (Figura 10A-C).

Los resultados hasta ahora obtenidos para una serie de líneas en las que se esperan segregaciones de plantas con las dos construcciones quiméricas, así como un doble genotipo mutante en homocigosis, muestran plantas que segregan en frecuencias de 1/70 fenotipos con grados de recuperación sorprendentes. Sin embargo, la presente tesis se finaliza en el proceso de esclarecer realmente el genotipo de estas líneas, en las que hasta ahora ha sido difícil amplificar la construcción quimérica para *LsPI* (Figura 10C).

Entre otras cosas, se han colectado semillas de esta planta para observar los fenotipos florales que segregan en su progenie producto de la autocruza y realizar su posterior genotipificación. Si es una planta homocigota para los diferentes alelos transgénicos y mutantes en cuestión todos sus descendientes deberían tener el mismo fenotipo. También se han sembrado 256 hermanas de esta planta que debería segregar este fenotipo siguiendo las proporciones esperadas.

Si estos resultados son ciertos, su interpretación consecuente es que hay un alto grado de conservación en la formación de heterodímeros funcionales entre las dos proteínas B de *L. schismatica* y que éste heterodímero a su vez puede interactuar con otras proteínas MADS para formar multímeros funcionales y formar parte de las redes de interacción de proteínas de *A. thaliana* que regulan los genes que generan la forma de los órganos florales.

La presencia de fenotipo de “rescate” en la ausencia de proteínas B endógenas completas sugiere que existe una competencia por sitios de interacción entre proteínas homeóticas que impiden ver fenotipos de rescate en fondos mutantes sencillos.

Aún a pesar de la aparente baja conservación de función en la determinación de estambres, los resultados expuestos en esta tesis apoyan la hipótesis (Vergara-Silva *et al*, 2000) que sugiere que el desplazamiento del sitio de expresión de la función B hacia el centro de la flor de *L. schismatica* es la causa del fenotipo homeótico encontrado en esta especie.

La información obtenida de estudios de evolución del desarrollo de animales (Granier & Carroll, 2000; Galant & Carroll, 2002) mostraron inicialmente la importancia de cambios en secuencias codificantes (cDNA's) en la generación de mutaciones homeóticas responsables de generar importantes cambios macroevolutivos. Por ejemplo, la divergencia morfológica entre onicóforos e insectos (artrópodos) está relacionada con la presencia de motivos clave en la proteína del factor de transcripción homeo-box *Ultrabithorax* (Ubx) (Granier & Carroll, 2000). La presencia de dicho motivo confiere a las secuencias de artrópodos la capacidad de regular negativamente diversos genes blancos, que por ejemplo determinan la identidad de extremidades. De la misma manera, los experimentos realizados en esta tesis estuvieron dirigidos a encontrar si sustituciones clave en las secuencias que codifican las proteínas B de *Lacandonia schismatica* también estaban relacionadas con el fenotipo heterotópico de dicha especie. A diferencia de los estudios con animales, ninguna de las líneas que expresan los genes B de *L. schismatica* ya sea por separado o en conjunto muestra un fenotipo homeótico con estambres centrales. Esto sugiere que los genes blanco conservados entre los genes B de *L. schismatica* y *A. thaliana* no están involucrados en determinar la flor homeótica de *L.*

schismatica.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Nuestros datos indican que la conservación de la función B en *Lacandonia schismatica* solamente se restringe a la determinación de estambres dada las características de líneas sobreexpresando *LsAP3* y dados los patrones de expresión espacio-temporal que tienen los genes B de *L. schismatica*. Por otro lado, se sugiere que el linaje de *LsPi* está más conservado que el de *LsAP3* con respecto a las eudicotiledóneas, dado que su proteína tiene la capacidad de formar heterodímeros quiméricos con proteínas B de *A. thaliana* y dado su potencial en determinar pétalos.

Los datos de las construcciones quiméricas indican preliminarmente que se forma un heterodímero funcional entre las dos proteínas B de *L. schismatica* que tiene capacidad de complementar de manera sorprendente los fenotipos mutantes de *A. thaliana* en comparación con lo observado en líneas quiméricas sencillas. Los resultados sugieren que la evolución de un heterodímero funcional entre dos genes B de angiospermas precedió a la divergencia de monocotiledóneas y eudicotiledóneas.

Aunque los datos expuestos en esta tesis asuman las interpretaciones euaniales de los ejes reproductivos *L. schismatica* como ciertas, vale la pena hacer notar que al menos las proteínas B de *L. schismatica* no producen efectos de pérdida de determinación en los órganos florales a los cuales dan identidad. Esto se contrapone a la hipótesis planteada por Rudall y Bateman (2006) en la que interpretan al gineceo de Triuridaceae como inflorescencias derivadas de flores tipo Stemonaceae, resultado de una pérdida de determinación de los órganos florales y una consecuente multiplicación de carpelos por la actividad de un grupo de genes homeóticos.

Finalmente, esta tesis plantea como hipótesis a probarse en estudios posteriores, que elementos regulatorios en *cis* o factores activadores o represores en *trans* son los responsables de que los genes B se expresen en el centro de la flor. De esta manera, es necesaria la clonación de los promotores de los genes B de *Lacandonia* y especies hermanas para entender más acerca de las causas próximas detrás de la morfología floral de esta especie mexicana.

Apéndice 1. Clonación e identificación de genes homólogos a AGAMOUS a partir de experimentos de 3'RACE

A partir de clonas parciales resultado de experimentos de 3'RACE hechos con oligos diseñados para amplificar genes tipo C (proveídas por Francisco Vergara Silva). Se realizó un mapeo y secuenciación de amplificadores distintos de los cuales se caracterizaron 2 secuencias homólogas que putativamente eran 2 genes tipo C en *Lacandonia schismatica*. Una vez obtenidas las secuencias se hicieron alineaciones de aminoácidos “a ojo” con los diversos genes homólogos de *AGAMOUS* descritos en las bases de datos internacionales. Y se obtuvo el alineamiento de nucleótidos a partir de las regiones más conservadas del archivo de alineamiento de aminoácidos.

Para dicho análisis se incluyeron secuencias del grupo monofilético al cual pertenece *AGL11/SEEDSTICK* que es el grupo hermano de los diversos genes *AGAMOUS*.

A continuación se muestran las dos secuencias de los genes tipo C de *Lacandonia schismatica* así como los árboles filogenéticos obtenidos por Métodos Bayesianos para identificar la identidad de cada uno de ellos. Se utilizó MrBAYES 3.1.2 el cual lleva a cabo dos análisis independientes simultáneamente. Se asumieron diferentes tasas de sustitución para primera, segunda y terceras posiciones (prset ratepr=variable). Cada análisis se corrió el tiempo suficiente para permitir que la desviación estándar de la frecuencias separadas bajara por debajo de 0.01 (aprox. 1500 000 generaciones).

Lo que se aprecia de estos resultados es que *LsAG1* (que se expresa en carpelos solamente) pertenece al linaje *STK* y que *LsAG2* (expresado en CA y ST) pertenece al linaje *AGAMOUS*. Como esta duplicación ocurrió antes de la divergencia de las Monocotiledóneas, todas las angiospermas tienen este grupo de ortólogos. Esto es, no hay ninguna paralogía genes tipo *AGAMOUS* en *Lacandonia schismatica* como ocurre por ejemplo en el maíz y

Apéndice 2. Obtención de secuencias de 18S gDNA y ATPA mitocondrial para *Soridium spruceanum* (Triuridaceae), *Pentastemona egregia* y *Pentastemona sumatrana* (Stemonaceae)

Se realizaron extracciones de gDNA de tejido total de *Soridium spruceanum* a partir de colectas hechas en Guatemala por Maria Saharieva y Esteban Martínez. Para el caso de las especies de *Pentastemona* el gDNA fue recibido de Laszlo Csiba de los Jardines Botánicos Reales de Kew (Reino Unido). Se llevaron a cabo PCR's con los oligos ATPAF (5') y ATPAB (5') para amplificar un fragmento de aproximadamente 1600 pb cuyo diseño fue hecho por Jerry Davis. Las reacciones de secuenciación se hicieron con fluroforos incluidos en el reactivo Big Dye Terminator 3.1 (Applied Byosistems) usando una temperatura de alineamiento a 50°C y los primers universales M13F y M13R. La secuenciación se hizo con un secuenciador ABI Prism 3000 en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM.

Se muestran las secuencias completas con polimorfismos encontrados de 6 secuencias obtenidas para una especie guatemalteca de la familia Triuridaceae (*Soridium spruceanum*) y dos especies pertenecientes al género *Pentastemona* que pertenece al orden Pandanales. Se tratan de los marcadores moleculares ATPA mitocondrial y el gDNA de la subunidad 18S ribosomal de las 3 especies. Estas secuencias son una contribución para un análisis filogenético que trata de entender la posición de la familia Triuridaceae dentro del orden Pandanales. La información obtenida de este estudio puede ayudar a esclarecer la parsimonia de las dos hipótesis contrastantes acerca de la identidad de los ejes reproductivos de las especies de la familia Triuridaceae.

>atpA *Soridium spruceanum* (Triuridaceae)

TGGAGATGGGATTGCACGTGTTTATGGATTGAACGAGATAAGAGCTGGA
GAAATGGTTGAATTTGCCAGCGGTGTGAAAGGAATAGCCTTGAATCTTG
AGAATGAGAATGTAGGTATTGTTGTCTTTGGTAGTGATACCGCTATTAA
AGAAGGAGATCTTGTCAAGCGCACTGGATCTATTGTGGATGTTCTTGGC
GGAAAGGCCATGTTAGGCCGTGTGGTCGACGCGTTGGGAGTACCTATTG
ATGGAAGAGGGGCTCTAAGCGATCACGAACGAAGACGTGTCGAGGTGAA
AGCCCCCTGGGATTATTGAACGGAAATCCGTGCACGAACCCATGCAAACA
GGCTTAAAGCAGTGAGATAGCCTGGTTCCCATAGGCCGTGGTCAACGAG
AACTTCTAATCGGGGACAGACAAACTGGAAAAACAGCTATTGCTATCGA
TACTATATTAACCAAAAGCAAATGAACTCAAGGGGCACCTCTGAAACA
TTGTATTGTGTCTATGTAGCGATTGGACAGAAACGCTCGACTGTGGCAC
AATTAGTGCAAATTTCTTTCATTTGCGAATGCTTTGGAATATTCAATTCT
TGTAGCAGCCACCGCTTCGGATCCTGCTCCTCTGCAATTTCTGGCCCCA
TATTCAGGGTGTGCCATGGGGGAATATTTCCGCGATAATGGAATGCACG
CATTAATAATATATGATGATCTTAGTAAACAGGCGGTGGCATATCGACA
AATGTCATTATTGTTACGCCGACCACCAGGCCGTGAGGCCTTCCCAGGG
GATGTTTTCTATTTGCATTCCCGTCTTTTAGAAAGAGCCGCTAAACGAT
CAGACCAGACAGGTGCAGGTAGCTTGACTGCCTTACCCGTCATTGAAAC
ACAAGCAGGAGACGTCTCGGCCTATATCCCTACCAATGTGATCTCCATT
ACAGATGGACAAATCTGTTTGGAAACTGAGCTCTTTTATCGCGGAATTA
GACCAGCTATTAACGTTGGCTTATCTGTTCAGTCGCGTCGGGTCTGCTGC
TCAGTTGAGAGCTATGAAACAAGTCTGCGGTAGTTTCAAAC TAGAATTG
GCACAATATCGCGAAGTGGCCGCCTTCGCTCAATTTGGGTGAGACCTTG
ATGCTGCGACTCAGGCATTACTCAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGT
GCTCAAAACAACCAATATGAACCACTTCCAATTGAAAAACAATTGTA
GTGATTT

>atpA *Pentastemona egregia* (Stemonaceae)

AAGTGGATGAGATCGGTGAGTAGTCTCAGTTGGAGATGGGATTGCACG
TGTTTATGGATTGAACAAGATTCAAGCTGGAGAAATGGTGGAATTTGCC
AGCGGTGTGAAAGGAATAGCGTTGAATCTAGAGAATGAGAATGTAGGTA
TTGTTGTCTTTGGTAGTGATACCGCTATTAAAGAAGGGGATCTTGTCAA
GCGCACTGGATCTATTGTGGATGTTCTTGC GGGAAGGCCATGTTAGGB
CGTGTGGTTCGACGCGTTGGGAGTACCTATTGATGGAAGAGGGGCTCTAA
GCGATCACGAACGAAGACGTGTGGAAGTGAAGCCCCAGGGATTATTGA
ACGTAAATCTGTGCACGAACCCATGCAAACAGGATTAAAAGCAGTGGAT
AGCCTGGTTCTATAGGCCGTGGTCAACGAGAACTTATAATCGGGGACA
GACAAACTGGAAAAACAGCTATAGCTATCGATACTATATTAAACCAAAA
GCAAAATGAACTCCTTAGGCACCTCTAAGACATTGTATTGTGTCTATGTA
GCGATTGGACAGAAACGCTCGACTATGGCACAATTAGTTCAAATCTTT
CAGAATCAGAAGTTTTGGAATATTCCATTCTTGTAGCAGCCACCGCTTC
GGATCCTGCTCCTCTATAATTTCTAGCCCCATATTCTGGGTGTGCCATG
GGGAATATTTCCGCAATAATGGAATGCACGCATTAATAATATATGATG
ATCTTAGTAAATAGGCGGTGGCATATCGACAAATGTCATTATTGTTACG
CCGACCACCAGGCCGTGAAGCCTTCCCAGGGGATGTTTTCTATTTACAT
TCCCGTCTCTTAGAAAGAGCCGCTAAACGATCAGACCAGACAGGTGCAG
GTAGCTTGACTGCGTTACVCGTCATTGAAACACAAGCTGGAGACGWATC
GGCCTATATYCCCACCAATGTGATCTCCATTACWGATGGACAAATCTGT
TTGGAAACAGAACTCTTTTATCGCGGAATTAGACCAGCTATTAACGTTG
GCTTATCTGTTCAGTCGCGTCGGGTCTGCTGCTCAGTTAAGAGCTATGAA
ACAAGTCTGCGGGAGTTTAAAACTGGAATTGGCACAATATCGCGAAGTG
GCCGCCTTCGCTCAATTTGGGTGAGACCTTGATGCTGCGACTGAGGCAT
TACCAAAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTGCCCAACAACCAATA
TGCACCACTTCAATTTGAAAAACAATATAGTGATTTATGCAGCTGTC
AATGGCTTCTGTGATCGAATGCC

>atpA *Pentastemona sumatrana* (Stemonaceae)

TGCTCGTTGGAGATGGGATTGCACGTGTTTATGGATTGAACGAGATTCAA
GCTGGAGAAATGGTGGAATTTGCCAGCGGTGTGAAAGGAATAGCCTTGAA
TCTAGAGAATGAGAATGTAGGTATTGTTGTCTTTGGTAGTGATACCGCTA
TTAAAGAAGGGGATCTTGTCAAGCGCACTGGATCTATTGTGGATGTTCCCT
GCGGGAAGGCCATGTTAGGCCGTGTGGTCGACGCGTTGGGAGTACCTAT
TGATGGAAGAGGGGCTCTAAGCGATCACGAACGAAGACGTGTCGAAGTGA
AAGCCCCAGGGATTATTGAACGTAAATCTGTGCACGAACCCATGCAAACA
GGATTA AAAAGCAGTGGATAGCCTGGTTCCCATAGGCCGTGGTCAACGAGA
ACTTATAATCGGGGACAGACAAACTGGAAAACTGCTATAGCTATCGATA
CTATATTA AAACCAAAAGCAAATGAACTCCTTAGGCACCTCTGAGACATTG
TATTGTGTCTATGTAGCGATTGGACAGAAACGCTCGACTGTGGCACAATT
AGTTCAAATTCTTTCAGAATCAGAAGTTTTGGAATATTCCATTCTTGTAG
CAGCCACCGCTTCGGATCCTGCTCCTCTGCAATTTCTGGCCCCATATTCT
GGATGTGCCATGGGGGAATATTTCCGCGATAATGGAATGCACGCATTAAT
AATATATGATGATCTTAGTAAACAGGCGGTGGCATATCGACAAATGTCAT
TATTGTTACGCCGACCACCAGGCCGTGAAGCCTTCCCAGGGGATGTTTTTC
TATTTACATTCCCGTCTCTTAGAAAGAGCCGCTAAACGATCAGACCAGAC
AGGTGCAGGTAGCTTGACTGCGTTACCCGTCATTGAAACACAAGCTGGAG
ACGTATCGGCCTATATCCCCACCAATGTGATCTCCATTACAGATGGACAA
ATCTGTTTGGAAACAGAACTCTTTTATCGCGGAATTAGACCAGCTATTAA
CGTTGGCTTATCTGTCTAGTCGCGTCGGGTCTGCTGCTCAGTTAAGAGCTA
TGAAACAAGTCTGCGGGAGTTTAAAACTGGAATTGGCACAATATCGCGAA
GTGGCCGCTTCGCTCAATTTGGGTCTCAGACCTTGATGCTGCGACTCAGGC
ATTACCAAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTGCCCAACAACCACAAT
ATTCACCACTTCAAATTGAAAAACAAATTGTAGTGATTATGCAGC

>18S *Soridium spruceanum* (Triuridaceae)

GTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAA
CTAATTCAGACTGTGAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTT
GTTTGATGGTACGTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATA
CGTGCAACAAGCCCCGACTTCCGGAAGGGATGCATTTATTAGATAAAAGG
CCGACGCGGGCTCCGCCCCGTAGCCCCGATGATTCATGATAACTCGACGGA
TCGCACGGCCTCGTGCCGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCAA
CTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTGATGACGGGTGACGGAGA
ATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA
AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGT
GACAATAAAATAACAATACCGGGCTCATCGAGTCTGGTAATTGGAATGAGT
ACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGT
TAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTTGGGCTGGGCCGGCCGGTCCGCCACTGG
TGTGCACCGGCCCTCCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCCTGGACTTA
ACTGGCCGGGTCTGCTCCGCGCCGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGC
TCAAAGCAAGCCCACGCCCCGATACATTAGCATGGGATAACATCACAGGA
TCTCGATCCTATTGTGTTGGCCTTCGGGATCGG**R**GTAATGATTAACAGGG
ACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCTTGATTT
ATGAAAGACGAACCACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCATTAAT
CAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTCTC
AACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCGGATGTTGCTCTTAGGACTC
CGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATG
GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGT
GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGGTCCAG
ACATAGCAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGG
TGGTGATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATCCG
TTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGCTATGCGGAGGGCCTCCTC
CGTGGGCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCCGTTTAGGCCACGGAAGTTTG
AGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCG

CTACACTGATGTATTCAACGAGTATATAGCCTTGGCCGACAGGTCCGGGT
AATCTTTCGGAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGGT
CTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGACTA
CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATGGT
CCGGTGAAGTGTTTCGGATCGCGGCGACGCGGGCGGTCCGCCGCC

>18S *Pentastemoma sumatrana* (Stemonaceae)

GTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAA
CAAATTCGGACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTT
GTTGATGGTATTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATAC
GTGCAACAAACCCGACTTCTGGAAGGGATGCATTTATTAGATAAAAGGC
TGACGCGGGCTCTGCCCGTAGCTCTGATGATTCATGATAACTCGACGGAT
CGCACAGCCCTTGTGCTGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCAA
CTTTCGATGGTAGGATAGGGCCCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGGAGA
ATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCA
AGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAACCAATCCTGACACGGGGAGGTAGT
GACAATAAATAACAATACCGGGCTCCTAGAGTCTGGTAATTGGAATGAGT
ACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT
TAAAAAGCTCGTAGTTGGACCTAGGGTTGGGCCGGTCGGTCCGCCTCATG
GTGTGCACCGGCCGTCTCGTCCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCCTGGCCTT
AACTGGCCGGGTCTGTGCCTCCGGCGCTGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTG
CTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAGCATGGGATAACATCATAG
GATTTTCGGTCCATTCTGTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAACAG
GGACAGTCGGGGGCATTTCGTATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCCTGGAT
TTATGAAAGACGAACCACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTA
ATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTC
TCAACCATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCGGATGTTGCTTTCAGGAC
TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTA
TGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGA
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCC
AGACATAGCAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGT
GGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTC
CGTTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGCTATGCGGAGGCATCCC
TCCGTGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCCGTTTAGGCCACGGAAGTT
TGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCG
CGCTACACTGATGTATTCAACGAGTCTATAGCCTTGGCCGACAGGCCCGG
GTAATCTTTGAAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTG
GTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGAC
TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG
GTCCGGTGAAGTGTTTCGGATCGCGGCGACGGGGCGGTTCCGCCCCAGCG
ACGTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGGGAAGTCG
TAACAAGGTTTTCCGTAGGTG

>18S *Pentastemoma egregia* (Stemonaceae)

CATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTATGAACAAAT
TCGGACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATAGTTTGTGTTG
ATGGTATTGCTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCA
ACAAACCCCGACTTCCGGAAGGGATGCATTTATTAGATAAAAGGCTGACG
CGGGCTCTGCCCGTAGCTCTGATGATTCATGATAACTCGACGGATCGCAC
AGCCCTTGTGCTGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTC
GATGGTAGGATAGGGGCTACCATGGTGGTGACGGGTGACGGAGAATTAG
GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAA
GGCAGCAGGCGCGCAAATTAACCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAA
TAAATAACAATACCGGGCTCCTAGAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAAT
CTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGC
CGCGGTAAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAA
AGCTCGTAGTTGGACCTAGGGTTGGGCCGGTCGGTCCGCCTCATGGTGTG

CACCGGCCGTCTCGTCCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCCTGGCCTTAACTG
GCCGGGTCTGTGCCTCCGGCGCTGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAA
AGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAGCATGGGATAACATCATAGGATTT
CGGTCTTATTCTGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAACAGGGACA
GTCGGGGGCATTTCGTATTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATG
AAAGACGAACCACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCATTAATCAA
GAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCCTAGTCTCAAC
CATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCGGATGTTGCTTTCAGGACTCCGC
CGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCGGGGGGGAGTATGGTC
GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAGACA
TAGCAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGG
TGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGCTAACTAGCTATGCGGA
GGCATCCCTCCGTGGCCAGCTTCTTAGAGGGACTATGGCCGTTTAGGCCA
CGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGC
CGCACGCGCGCTACACTGATGTATTCAACGAGTCTATAGCCTTGGCCGAC
AGGCCCCGGGTAATCTTTGAAAATTTTCATCGTGATGGGGATAGGTCATTGC
AATTGTTGGTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTC
GCGTTGACTACGTCCCTACCCTTTGTACACACTGCCCGTCGCTCCTACCG
ATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTTCGGATCGCGGCGACGGGGGCGATTTCGC
CGCCAGCGACGTCGCGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGG
AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT

Referencias

- Alvarez-Buylla E. R., Pelaz, S., Liljegren, S. J., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Ribas de Pouplana, L., Martínez-Castilla, L. y Yanofsky, M. F. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 5328–5333.
- Alvarez-Buylla E. R., Liljegren S.J., Pelaz S., Gold S.J., Burgeff C., Ditta G.S., Vergara-Silva F. y Yanofsky M. (2000). MADS box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal*. 24:1-11
- Alvarez-Buylla E. R., García-Ponce B. y Garay-Arroyo A. (2006). Unique and redundant functional domains of APETALA1 and CAULIFLOWER, two recently duplicated *Arabidopsis thaliana* floral MADS-box genes. *Journal of Experimental Botany*. 57: 3099-3017
- Alvarez-Buylla E.R, Benítez M., Balleza-Dávila E., Chaos A., Espinosa-Soto C. y Padilla-Longoria P. (2007). *Current Opinion in Plant Biology*. 10:1–9
- Ambrose, B. A., Lerner, D. R., Ciceri, P., Padilla, C. M., Yanofsky, M. F. y Schmidt, R. J. (2000). Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Molecular Cell*. 5: 569-579.
- Ambrose, B. A., Espinosa-Matias S., Vazquez-Santana S., Vergara-Silva F., Martinez E., Marquez-Guzman J. y Alvarez-Buylla, E.R. (2006) Comparative developmental series of the Mexican triurids support a euanthial interpretation for the unusual reproductive axes of *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae). *American Journal of Botany*. 93: 15–35
- Barabe D. y Lacroix C. (1999). Homeosis, morphogenetic gradient and the determination of floral identity in the inflorescences of *Philodendron solimoesense* (Araceae). *Plant Systematics and Evolution*. 219: 243-261
- Barabé D. y Lacroix C. (2000). Homeosis in Araceae flowers: The case of *Philodendron melinonii*. *Annals of Botany*. 86: 479-491
- Barabé D., Lacroix C. y Jeune B. (2002). Study of Homeosis in the Flower of *Philodendron* (Araceae): A Qualitative and Quantitative Approach. *Annals of Botany*. 90:579-592
- Bowman, J. (Ed.) (1994). *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. Springer-Verlag. New York, 450 pp.
- Bowman, J.L., D.R. Smyth y E.M. Meyerowitz. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*. 112: 1-20
- Bowman, J.L., Smyth, D.R. y Meyerowitz, E.M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1: 37-52
- Burgeff C., Liljegren S.J., Tapia R., Yanofsky M. y Alvarez-Buylla E.R. 2001. MADS-box gene

expression in lateral primordia, apical meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214:365-372.

Chase M.W., Soltis D. S., Soltis P. S., Rudall P. J., Fay M. F., Hahn W. H., Sullivan S., Joseph J., Molvray M., Kores P. J., Givinish T.J., Sytsma K. J., y J. C. PIREs. (2000). Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. Pp. 3–16 in *Monocots: systematics and evolution*, eds. Wilson K. L. and Morrison D. A.. Melbourne: CSIRO.

Chaw SM, Chang CC, Chen HL y Li WH. (2004). Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes. *Journal of Molecular Evolution*. 58: 424-41

Chung,Y.-Y., Kim,S.-R., Kang,H.-G., Noh,Y.-S., Park,M.C. y An,G. (1995). Characterization of two rice MADS box genes homologous to GLOBOSA. *Plant Science*. 109, 45-56

Coen, E. S. y Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls – genetic interactions controlling flower development. *Nature*. 353: 31-37

Davis J. I., Stevenson D. W., Petersen G. P., Seberg O., Campbell L. M., Freudenstein J. V., Goldman D. H., Hardy C. R., Michelangeli F. A., Simmons M.P., Specht C.D., Vergara-Silva F. y Gandolfo M. A. 2004. A phylogeny of the monocots, as inferred from *rbcl* and *atpA* sequence variation, and a comparison of methods for calculating jackknife and bootstrap values. *Systematic Botany*. 29: 467–510.

Ditta G., Pinyopich A., Robles P., Pelaz S. y Yanofsky M. F. (2004). The *SEP4* Gene of *Arabidopsis thaliana* Functions in Floral Organ and Meristem Identity. *Current Biology*. 14: 1935–1940

Egea-Cortines, M., Saedler, H. y Sommer, H. (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO Journal*. 18: 5370–5379

Friis E.M., Pedersen K.R. y Crane P.R. (2004). Araceae from the Early Cretaceous of Portugal: Evidence on the emergence of monocotyledons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 16565-16570

Gandolfo M. A., Nixon K. C. y Crepet W.L. (2002). Triuridaceae Fossil Flowers from the upper Cretaceous of New Jersey. *American Journal of Botany*. 89: 1940–1957.

Galant R. & Carroll S.B. (2002). Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature*. 415: 910–913

Grenier J.K. & Carroll S.B. (2000). Functional evolution of the Ultrabithorax protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:704-709

Gould, S. J. y Eldredge, N. (1977). Punctuated equilibria: the tempo and mode of evolution reconsidered. *Paleobiology*. 3: 115-151

Goto K. y Meyerowitz E.M. (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes and Development*. 8:1548–1560

Hama E., Takumi S., Ogihara Y. y Murai K. (2004). Pistillody is caused by alterations to the class-B MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats. *Planta*. 218: 712–720

Hernández-Hernández T., Martínez-Castilla L.P. y Alvarez-Buylla E. R. (2007) Functional Diversification of B MADS-Box Homeotic Regulators of Flower Development: Adaptive Evolution in Protein–Protein Interaction Domains after Major Gene Duplication Events. *Molecular Biology Evolution*. 24:465–481

Honma T. y Goto K. (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525–529

Hsu, H.-F. y Yang, C.-H. (2002) An orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AP3*-like MADS gene regulates floral formation and initiation. *Plant Cell Physiology*. 43: 1198–1209

Jack T., Brockman, L.L y Meyerowitz E.M. (1992). The homeotic gene *APETALA 3* OF *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*. 68:683-697

Jack T., Fox G. L. y Meyerowitz E. M. (1994) *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA 3* Ectopic Expression: Transcriptional and Posttranscriptional Regulation Determine Floral Organ Identity. *Cell*. 76: 703-716

Kanno, A., Saeki H., Kameya T., Saedler H. y Theissen, G. (2003) Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Molecular Biology*. 52: 831–841

Kang, H. G., Jeon, J. S., Lee, S. & An, G. (1998). Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice plants. *Plant Molecular Biology*. 38: 1021-1029

Kramer, E.M., Dorit, R.L. y Irish, V.F. (1998) Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineage. *Genetics*. 149: 765–783

Krizek B. A y Meyerowitz E. M. (1996). The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*. 122: 11-22

Kyozuka, J. y Shimamoto, K. (2002). Ectopic expression of OsMADS3, a rice ortholog of AGAMOUS, caused a homeotic transformation of lodicules to stamens in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology*. 43: 130-135

Lamb R.S y Irish V.F. (2003) Functional divergence within the *APETALA3*/*PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 6558–6563

- McGonigle B., Bouhidel K., y Irish V.F. (1996). Nuclear localization of the *Arabidopsis* APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes and Development*. 10:1812-1821
- Malcomber, S. y Kellogg E. (2004). Heterogeneous expression Patterns and Separate roles of the SEPALLATA gene LEAFY HULL STERILE1 in grasses. *Plant Cell*. Vol. 16, 1692-1702
- Martínez S. E. y Ramos C. (1989). Lacandoniaceae (Triuridales): una nueva familia de México. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 76:128-135
- Martínez-Castilla L. P. y Alvarez-Buylla E. R. (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:13407–13412
- Moon Y.H., Jung J.Y., Kang H.G. y An G. (1999) Identification of a rice APETALA3 homologue by yeast two-hybrid screening. *Plant Molecular Biology*. 40:167–177
- Mouradov A, Hamdorf B, Teasdale RD, Kim JT, Winter KU y Theissen G. (1999) A DEF/GLO-like MADS-box gene from a gymnosperm: *Pinus radiata* contains an ortholog of angiosperm B class floral homeotic genes. *Developmental Genetics*. 25:245-52.
- Münster T., Wingen L. U., Faigl W., Werth S., Saedler H. y Theissen G. (2001). Characterization of three GLOBOSA-like MADS-box genes from maize: evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. *Gene*. 262: 1-13
- Murai K, Murai R, Takumi S y Ogihara Y. (1998). Cloning and characterization of cDNAs corresponding to the wheat MADS box genes. *Proceedings 9th International Wheat Genetic Symposium*. 1:89–94
- Nagasawa, N., Miyoshi, M., Sano, Y., Satoh, H., Hirano, H., Sakai, H., y Nagato, Y. (2003). *SUPERWOMAN1* and *DROOPING LEAF* genes control floral organ identity in rice. *Development*. 130: 705–718
- Park, J.H., Ishikawa, Y., Yoshida, R., Kanno, A. y Kameya, T. (2003). Expression of AODEF, a B-functional MADS-box gene, in stamens and inner tepals of the dioecious species *Asparagus officinalis* L. *Plant Molecular Biology*. 51: 867–875
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E y Yanofsky M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*. 405: 200–203
- Riechmann J.L., Wang M. y Meyerowitz E.M. (1996). DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Research*. 24: 3134–3141
- Riechmann J.L., Krizek B. A. y Meyerowitz E.M. (1996). Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:4793-4798.

Rudall P. J. (2003). Monocot pseudanthia revisited: floral structure of the mycoheterotrophic family Triuridaceae. *International Journal Plant Sciences*. 164: S307–S320

Rudall P.J. y Bateman R. (2006). Morphological Phylogenetic Analyses of Pandanales: Testing contrasting hypotheses of floral evolution. *Systematic Botany* 31: 223-238

Sambrook J., MacCallum P. y Russell D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2344 pp.

Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. y Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development: homeotic genes of *Antirrhinum majus*. *Science*. 250: 931-936

Shore, P. & Sharrocks, A. D. (1995) The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry*. 229: 1–13.

Tzeng TY & Yang CH. (2001) A MADS box gene from lily (*Lilium longiflorum*) is sufficient to generate dominant negative mutation by interacting with PISTILLATA (PI) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 42: 1156–1168

The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408: 796-815

Tsai-Yu Tzeng, Chih-Chi Hsiao, Pei-Ju Chi, & Chang-Hsien Yang. (2003). Two lily SEPALLATA-like genes cause different effects on floral formation and floral transition in *Arabidopsis*. *Planta Physiology*. 133: 1091-1101

Vergara-Silva F., Martínez-Castilla L. y Alvarez-Buylla E. R. (2000). MADS-box genes: development and evolution of plant body plans. *Journal of Phycology*. 36: 803–812

Vergara-Silva F. (2002). Evolución de los mecanismos del desarrollo ontogenético de los fenotipos florales homeóticos/heterotópicos en las triuridales mexicanas *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis* (Triuridales: Liliopsida). Tesis Doctoral. UNAM. México D.F.

Vergara-Silva F., Espinosa-Matías S., Ambrose B.A., Vázquez-Santana S., Martínez-Mena A., Márquez-Guzmán J., Martínez E., Meyerowitz, E. M. y Alvarez-Buylla E. R. (2003). Inside-out flowers characteristic of *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales) evolved at least before the divergence from its sister taxon, *Triuris brevistylis*. *International Journal of Plant Sciences*. 164: 345–357

Van Tunen, A.J., Eikelboom, W. y Angenent, G.C. (1993). Floral organogenesis in *Tulipa*. *Flower Newsletter*. 16: 33–38

Wen-Chieh Tsai, Chang-Sheng Kuoh, Ming-Hsiang Chuang, Wen-Huei Chen y Hong-Hwa Chen. (2004). Four *DEF*-Like MADS Box Genes Displayed Distinct Floral Morphogenetic Roles in *Phalaenopsis* Orchid. *Plant Cell Physiology*. 45: 831–844

Whipple C. J., Ciceri P., Padilla C. M., Ambrose B. A., Bandong S. L. y Schmidt R.J. (2004). Conservation of B-class floral homeotic gene function between maize and *Arabidopsis*.

Development 131: 6083-6091

Whipple C. J., Zanis M. J., Kellogg E. A. y Schmidt R.J. (2007). Conservation of B class gene expression in the second whorl of a basal grass and outgroups links the origin of lodicules and petals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:1081–1086

Weigel D. y Glazebrook J. (2002). *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 354 pp.

Xu Y., Teo L.L., Zhou J., Kumar P.P. & Yu H. (2006) Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum*. *The Plant Journal*. 46: 54–68