



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS  
EN EL DESARROLLO DE FLORES MASCULINAS  
DE *OPUNTIA STENOPETALA***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
PRESENTA:

**GREGORIO OROZCO ARROYO**



TUTOR: DR. FELIPE CRUZ GARCÍA

MÉXICO, D. F.

MARZO 2012



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.

## Reconocimientos

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del **Dr. Felipe Cruz García** en el Laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El **Comité Tutorial** que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Joseph G. Dubrovsky	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración de la **Dra. Sonia Vázquez Santana**, del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los cortes histológicos de los estilos de *Opuntia stenopetala* para su análisis a microscopio óptico, los experimentos de inmunolocalización del IAA, pruebas de TUNEL y para la observación al microscopio electrónico de barrido.

Se reconoce el apoyo de la **Q. Laurel Fabila** del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

Se reconoce el soporte técnico de la **Dra. Silvia Espinosa** de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Se reconoce el soporte técnico de **Berenit Mendoza** de la Unidad de Microscopía del Instituto de Biología, UNAM.

El proyecto fue apoyado parcialmente por **CONACYT** (101771, 81968) y **PAPIIT-UNAM** (IN216105, IN226808, IN205009). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por **CONACYT** para la realización de la presente tesis.

El **Jurado de Examen Doctoral** estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Joseph G. Dubrovsky	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Elena Alvarez Buylla	Instituto de Ecología, UNAM
Secretario	Dra. Alejandra Covarrubias Robles	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM

# Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	3
Introducción .....	5
Unisexualidad en angiospermas.....	5
Genes ligados a la determinación del sexo .....	8
Genes homeóticos .....	8
Genes ligados a cromosomas sexuales .....	12
Genes de determinación del sexo especie-específicos .....	14
Familia Cucurbitaceae .....	14
<i>Silene latifolia</i> .....	19
Genes involucrados en el desarrollo del carpelo .....	20
El papel de la muerte celular programada en la unisexualidad .....	24
Antecedentes inmediatos .....	26
Hipótesis .....	28
Objetivos .....	28
General .....	28
Particulares .....	28
Materiales y Métodos .....	29
Obtención del material vegetal de <i>Opuntia stenopetala</i> .....	29
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) .....	29
Cortes histológicos .....	30
Purificación de RNA total .....	30
Clonación de genes homólogos a <i>TSL</i> , <i>STY</i> y <i>CRC</i> en <i>O. stenopetala</i> .....	31
Análisis filogenético .....	32
Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .....	34
Extractos de proteína total de estilos de <i>O. stenopetala</i> .....	36
Cuantificación de la proteína total .....	36
Anticuerpos policlonales contra-OstTSL .....	36
Inmunodetección de OstTSL .....	36
Clonación y sobreexpresión del fragmento del cDNA OstTSL .....	37
Prueba de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) .....	39
Microaplicaciones de auxina .....	40
Inmunolocalización de Ácido Indol Acético (IAA) .....	41

Resultados .....	43
Las flores masculinas y femeninas de <i>O. stenopetala</i> inician su desarrollo siendo hermafroditas .....	43
Existen diferentes tipos de flores en las poblaciones de <i>O. stenopetala</i> .....	45
Las diferencias morfológicas del gineceo también se presentan a nivel histológico .....	47
Los cDNAs de <i>O. stenopetala</i> tienen homología con los genes <i>TSL</i> y <i>STY</i> de <i>A. thaliana</i> .....	48
<i>OstTSL</i> y <i>OstSTY</i> se expresan diferencialmente en los estilos masculinos y femeninos de <i>O. stenopetala</i> .....	53
Los niveles proteicos de <i>OstTSL</i> no difieren entre los estilos de flores femeninas y masculinas de <i>O. stenopetala</i> .....	56
No hay señales de muerte celular programada en los estilos de flores masculinas de <i>O. stenopetala</i> .....	58
Los estilos de las flores masculinas presentan niveles menores de IAA en etapas tempranas de desarrollo .....	62
La aplicación de NAA exógeno restaura parcialmente los defectos morfológicos externos e internos del gineceo de las flores masculinas .....	64
Discusión .....	68
El dimorfismo sexual en <i>O. stenopetala</i> es un proceso tardío .....	68
Posible papel de <i>OstCRC</i> , <i>OstTSL</i> y <i>OstSTY</i> en el proceso de unisexualidad en las flores masculinas de <i>O. stenopetala</i> .....	69
<i>OstCRC</i> – <i>CRABS CLAW</i> .....	69
<i>OstTSL</i> – <i>TOUSLED</i> .....	71
<i>OstSTY</i> – <i>STYLISH</i> .....	72
No hay indicios de degradación del DNA en el gineceo de las flores masculinas de <i>O. stenopetala</i> .....	73
La auxina está involucrada en el desarrollo del gineceo y juega un papel importante en el proceso de masculinización de <i>O. stenopetala</i> .....	76
Modelo del proceso de masculinización en <i>O. stenopetala</i> .....	80
Conclusiones .....	83
Referencias .....	84
Artículo .....	92

## Resumen

La mayoría de las angiospermas poseen flores hermafroditas que contienen estructuras reproductoras masculinas (estambres) y estructuras reproductoras femeninas (carpelos). Para fomentar la reproducción cruzada, las plantas han desarrollado varias estrategias entre las que se encuentra la formación de flores unisexuales. Algunas flores sólo presentan estambres (flores masculinas) mientras que otras sólo presentan carpelos (flores femeninas), estas flores unisexuales pueden formarse en el mismo individuo (plantas monoicas) o en individuos diferentes (plantas dioicas).

*Opuntia stenopetala* es una cactácea dioica con flores funcionalmente unisexuales que presentan rudimentos de uno de los dos órganos sexuales. En el caso específico de las flores masculinas, existen tres morfos en los cuales el gineceo inicia el desarrollo, aunque después, su crecimiento y diferenciación son interrumpidos. Como resultado, el gineceo está formado por un estilo carente de estigma. Los defectos en el ovario son diversos. La mayoría de los individuos masculinos presenta un ovario reducido con pocos óvulos no funcionales en la base. En otros individuos el ovario se encuentra vacío ya que no se desarrollan óvulos. Por último, la menor proporción de los individuos ni siquiera presenta ovario. Para profundizar en el conocimiento del proceso de masculinización de esta especie, se decidió investigar la ausencia de estigma en las flores masculinas. Un análisis histológico comparativo entre los estilos funcionales de las flores femeninas y los no funcionales de las flores masculinas, reveló que la diferenciación de los haces vasculares, el canal estilar y del tejido de transmisión, no es completa en el gineceo de las flores masculinas.

Para dilucidar el mecanismo molecular y fisiológico que provoca el fenotipo del gineceo de las flores masculinas, se identificaron mutantes de la planta modelo hermafrodita *Arabidopsis thaliana*, cuyos fenotipos se caracterizaron por la disminución del tejido estigmático. Estas anomalías son producto de mutaciones en los genes *TOUSLED (TSL)*, *STYLISH (STY)* y *CRABS CLAW (CRC)*. En congruencia con esto, se clonaron homólogos de estos genes en *O. stenopetala* y se determinó su patrón de expresión por RT-PCR. Los transcritos de *OstTSL* y *OstSTY*, homólogos de *TSL* y *STY* respectivamente, fueron más abundantes en el gineceo de las flores femeninas, sugiriendo un papel importante en el desarrollo del gineceo. La disminución del transcrito *OstSTY* sugirió que la disminución de la síntesis de auxina podría estar involucrada en el desarrollo incompleto del gineceo de las flores masculinas.

Para investigar si existían diferencias en la cantidad de auxina entre los distintos gineceos, se analizaron los patrones de acumulación mediante inmunodetecciones de la principal auxina, el ácido indolacético (IAA). Este análisis reveló que la acumulación de IAA fue menor en los primordios carpelares de las flores masculinas, aunque en etapas posteriores no se observaron diferencias. Para averiguar si esta acumulación disminuida era relevante en el proceso de masculinización, se realizaron aplicaciones exógenas de auxina a gineceos en desarrollo de flores masculinas y femeninas. Estas aplicaciones revirtieron algunos de los defectos de los estilos de los gineceos de flores masculinas, los cuales mostraron aumento en la diferenciación de los haces vasculares, mayor cantidad de tejido de transmisión,

ampliación del canal estilar y, de forma muy interesante, desarrollo de pequeños parches de papilas estigmáticas. Los gineceos de las flores femeninas no mostraron cambios significativos.

Los resultados obtenidos sugieren un papel preponderante del gen *OstSTY* y de la auxina durante el desarrollo de las flores unisexuales en esta especie. Un modelo en el cual se discute la posible participación del gen *OstSTY* en la homeostasis de la auxina en el gineceo de *O. stenopetala* es presentado.

## Abstract

Most of the angiosperms bear hermaphrodite flowers with male and female reproductive structures (stamens and carpels, respectively). Physical proximity of the sex organs in the same flower increases the self-pollination probability, which would lead the loss of genetic variability in subsequent generations. To promote cross-pollination, plants developed several strategies including unisexual flower formation. Some of these flowers only develop stamens (male flowers) while others only develop carpels (female flowers). Unisexual flowers occur in the same individual (monoecious plant) or on separate ones (dioecious plants).

*Opuntia stenopetala* is a dioecious cactus, which develops unisexual flowers with one of the sex whorls nonfunctional. There are three floral morphs which gynoecium starts a normal development, but later its growth and differentiation was ceased. This results in a gynoecium that lacks stigmatic tissue. However, ovary defects are very variable, displaying three different types: (1) a reduced ovary with few non-functional basal ovules, which was the one displayed by most of the male flowers; (2) an empty ovary; and (3) the least frequent morph was the one with no ovary at all. To get deeper insight into the masculinization process of this species, we investigated the absence of the stigma in male flowers. Histological analysis revealed that male flower style vascular bundles, stylar canal and transmitting tissue were incompletely differentiated when compared with female flower style.

To elucidate the molecular and physiological mechanisms that generate the male flower gynoecia phenotype, we performed a search to identify *Arabidopsis thaliana* mutant plants which gynoecia-lacking stigma phenotype resembles that of *O. stenopetala* male flower gynoecia. Identified phenotypes included mutations in genes *TOUSLED (TSL)*, *STYLISH (STY)* y *CRABS CLAW (CRC)*. Accordingly, we cloned the homologous genes from *O. stenopetala* and its expression pattern was determined by RT-PCR. *OstTSL* and *OstSTY* mRNAs were more abundant in female flower gynoecia than in male flower gynoecia, suggesting a key role in gynoecium development. Since *A. thaliana STY* is involved in auxin biosynthesis, diminished expression level of *OstSTY* suggested that reduced auxin levels were correlated with the incomplete gynoecium development and differentiation in the male flowers.

To determine if there are differences in auxin levels between male and female flower gynoecia, indolacetic acid (IAA) accumulation pattern was investigated by immunodetection. Male flower carpel primordia accumulated less IAA than female flower carpel primordia. In subsequent stages of development, no differences in IAA accumulation were observed. To clarify if this diminished IAA accumulation was relevant in *O. stenopetala* floral masculinization process, exogenous auxin application was performed to developing gynoecia of male and female flowers. Those applications partially reverted some of the male flower stylar defects, such as showing a better differentiation in vascular bundles, more transmitting tissue, a wider stylar canal and interestingly, also the development of stigmatic papilla in

small patches was observed. Female flower gynoecia did not present relevant changes.

Outcomes indicate an essential role of *OstSTY* and auxin during the unisexual flower development in *O. stenopetala*. We present a model where the possible participation of *OstSTY* in auxin homeostasis is discussed.

# Introducción

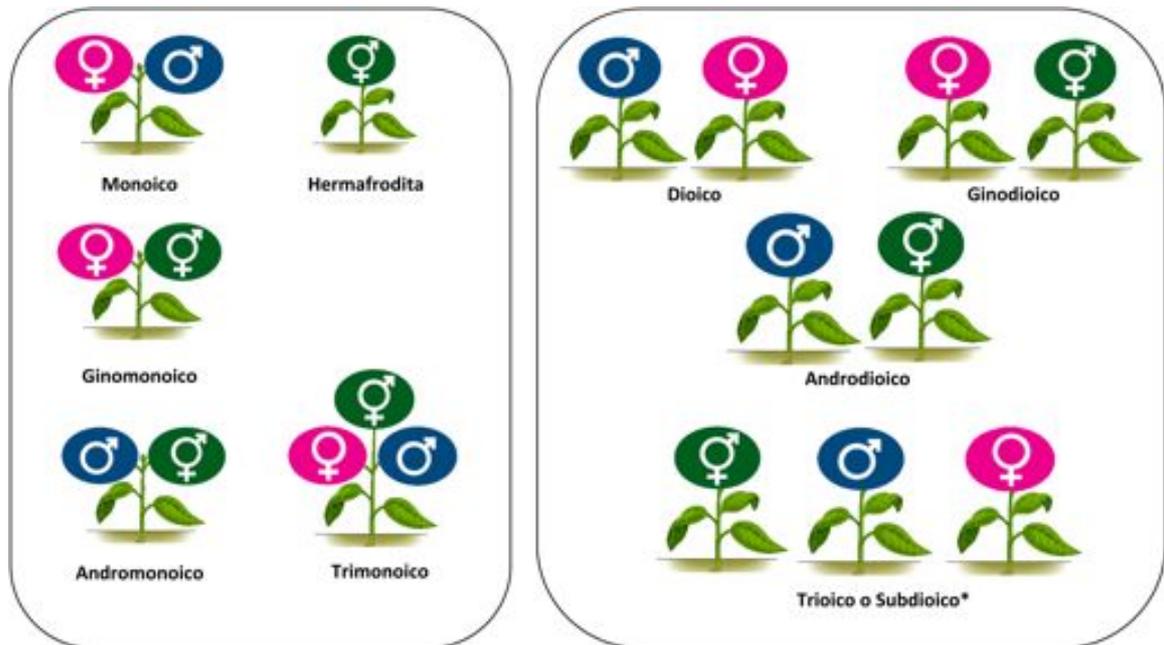
## Unisexualidad en angiospermas

La flor es la estructura reproductora de las angiospermas. Típicamente cuenta con cuatro verticilos, de los cuales el cáliz (conjunto de sépalos) y la corola (conjunto de pétalos) son los verticilos vegetativos, mientras que los verticilos reproductivos están representados por el androceo (conjunto de estambres) y el gineceo (conjunto de carpelos). Los estambres están formados por el filamento y la antera, ésta última encargada de la producción del grano de polen, portador de los gametos masculinos. Por otro lado, los gametos femeninos se producen en los óvulos dentro del ovario, que junto con el estilo y el estigma constituyen el gineceo (Bhojwani y Bhatnagar, 1999).

La coexistencia de estructuras reproductivas masculinas y femeninas dentro de la misma flor o hermafroditismo, es una característica atractiva para los polinizadores, y probablemente ha contribuido de manera significativa a la rápida diversificación de las angiospermas. De cualquier manera, la proximidad de los órganos sexuales incrementa las probabilidades de autopolinización, comprometiendo así la variabilidad genética de las especies. Aproximadamente, 90% de las angiospermas producen flores hermafroditas, en las cuales se producen las estructuras reproductoras masculinas (estambres) y estructuras reproductoras femeninas (carpelos – Renner y Ricklefs, 1995). El 10% restante producen flores unisexuales en las cuales se desarrolla o es funcional en la madurez, sólo uno de los dos órganos reproductivos (Barrett, 2002). La mayoría de las angiospermas desarrollan mecanismos capaces de prevenir los efectos deletéreos de la depresión endogámica, promoviendo la heterocigosis y variabilidad genética a través del intercambio genético, lo cual conlleva efectos ventajosos en la supervivencia a largo término y en la adaptación. Entre los mecanismos que promueven la polinización cruzada en las especies con flores hermafroditas, podemos encontrar: la dicogamia o separación temporal en la maduración de los órganos reproductivos; hercogamia o separación espacial entre estambres y carpelos dentro de la misma flor; la incompatibilidad sexual que implica la incapacidad de una planta hermafrodita fértil

de producir cigotos producto de la autopolinización (Bawa, 1980; Baker, 1984; de Nettancourt, 2001; Vogler y Kalisz, 2001; Khryanin, 2007). Otra de las estrategias utilizadas para prevenir la endogamia consiste en la producción de flores unisexuales masculinas (estaminadas) o femeninas (pistiladas) en la misma planta o en diferentes individuos (Barret, 2002; Geber, 1999).

Varios sistemas sexuales se originan con la presencia de flores unisexuales, y dependiendo de la distribución de estas entre los individuos en una población, se pueden describir diferentes sistemas reproductivos (Figura 1). Las poblaciones monoicas están formadas por individuos que desarrollan flores masculinas y femeninas en la misma planta, es decir, los órganos reproductores masculinos y femeninos coexisten en el mismo individuo pero en diferentes flores. Si uno de los individuos desarrolla exclusivamente flores masculinas o sólo flores femeninas, se constituye una población dioica. Es posible encontrar un gran número de sistemas reproductivos que constituyen formas intermedias en la transición en la formación de flores totalmente unisexuales. Estas formas transitorias pueden en muchos casos establecerse como formas estables. Las poblaciones donde coexisten individuos con flores masculinas, femeninas y hermafroditas, son llamadas trioicas, o subdioicas. Las diferentes combinaciones de flores unisexuales y hermafroditas en uno o diferentes individuos puede dar origen a los sistemas reproductivos ginodioicos (individuos con flores hermafroditas e individuos con flores femeninas), androdioicos (individuos con flores hermafroditas e individuos con flores masculinas), ginomoicos (el mismo individuo presenta flores hermafroditas y femeninas), andromonoicos (el mismo individuo presenta flores hermafroditas y flores masculinas) y trimonoicos o poligamomonoico (el mismo individuo desarrolla flores hermafroditas, masculinas y femeninas). De cualquier forma, no siempre es posible encontrar un patrón para la proporción de cada morfo floral. Los sistemas reproductivos ginodioico y ginomonoico son relativamente comunes, mientras que los sistemas reproductivos androdioico, trioico y trimonoico son raros de encontrar (revisado en Ainsworth, 2000).



**Figura 1. Sistemas sexuales en angiospermas.** La combinación de flores hermafroditas, y unisexuales masculinas ( $\sigma^7$ ) y femeninas ( $\varphi$ ), en un mismo o diferentes individuos, origina múltiples sistemas sexuales en angiospermas.

La reproducción sexual fundamentalmente involucra contribuciones equitativas de los gametos masculino y femenino a la progenie. La teoría que discute la evolución del polimorfismo de género ha integrado a un gran número de fuerzas evolutivas, incluyendo: selección dependiente de la frecuencia, evasión de la endogamia y especialización de género debido a la limitación de recursos (Bawa, 1980; Khryanin, 2007). La evolución del polimorfismo de género ocurre cuando las condiciones son favorables para la inversión individual a cualquier función sexual, pero no a la opuesta al mismo tiempo, es decir, un cambio en la inversión de recursos que genere un incremento en la adecuación de cierto género puede resultar en una reducción en la adecuación del otro. De esta forma, en las plantas que presentan una inversión de recursos significativa para el éxito reproductivo femenino, se espera que tengan un descenso en la inversión de recursos para el éxito reproductivo masculino, y viceversa (Costich y Meagher, 2001).

En las flores unisexuales se pueden distinguir dos patrones morfológicos claramente diferenciables. En el primer patrón, el predominante entre las

angiospermas unisexuales, las flores unisexuales presentan vestigios o rudimentos del órgano sexual opuesto. Es decir, las flores masculinas poseen vestigios no funcionales de carpelos, mientras que las flores femeninas poseen rudimentos no funcionales de estambres. Este tipo de flores son unisexuales debido a una serie de eventos abortivos que ocurren después de que la identidad de los verticilos florales se ha establecido dentro del meristemo floral. El segundo patrón floral no muestra vestigios del verticilo sexual opuesto, es decir, durante el proceso de desarrollo no existe una etapa hermafrodita potencial, por lo que la flor se considera unisexual desde el inicio (Mitchell y Diggle, 2005). El tiempo en el cual ocurre el aborto selectivo del gineceo o del androceo en un primordio floral potencialmente hermafrodita, es conocido como la etapa donde ocurre la determinación del sexo.

En ambos tipos de flores, la determinación del sexo floral, es un proceso regulado durante el desarrollo (Knopf y Trebitsh, 2006). Debido a que las flores unisexuales presentan la alteración del desarrollo en uno solo de los verticilos sexuales, es posible plantear que el androceo y el gineceo tienen controles genéticos separados. Los procesos de regulación del desarrollo del gineceo o androceo, son estudiados particularmente en especies dioicas y monoicas para dilucidar los aspectos morfológicos, fisiológicos y moleculares de la unisexualidad.

La determinación sexual está relacionada no solo con cambios en la maquinaria genética, es decir, la expresión sexual está determinada no sólo por el genotipo, sino también por los procesos regulatorios asociados con los efectos de las condiciones ambientales y los cambios metabólicos internos.

## **Genes ligados a la determinación del sexo**

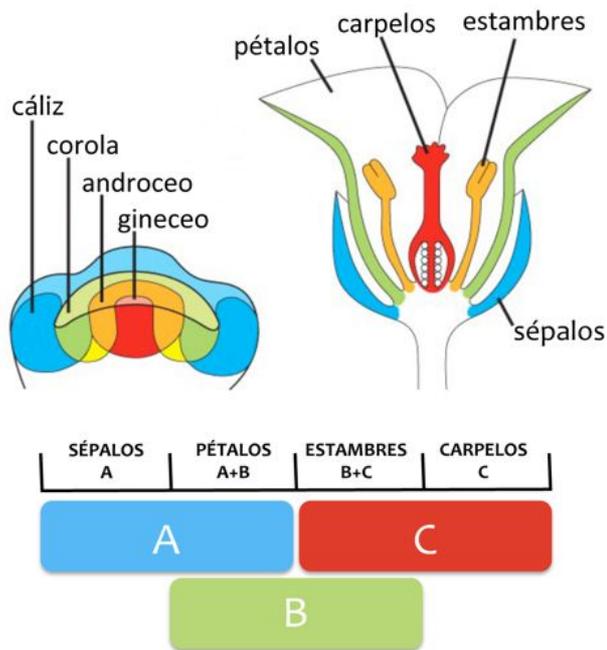
### **Genes homeóticos**

Dado que el desarrollo de estambres y carpelos involucra a un gran número de genes durante las distintas etapas de desarrollo (Wellmer *et al.*, 2004), cambios en la secuencia o en la regulación de la expresión de estos genes, o en los genes encargados de su regulación, pueden potencialmente promover el aborto de los órganos masculinos o femeninos. En las flores hermafroditas, mutaciones que

provocan esterilidad masculina o femenina pueden ocurrir desde el inicio del desarrollo del primordio reproductivo hasta las últimas etapas de desarrollo en la formación del órgano reproductivo (Matsunaga y Kawano, 2001).

El control de la determinación del sexo frecuentemente está vinculado al control del desarrollo de los órganos, debido a que el sexo puede definirse al detener la culminación de las rutas involucradas en el desarrollo del verticilo sexual, o bien, puede iniciarse un programa preexistente de desarrollo que se contrapone a la vía normal de desarrollo.

La búsqueda de genes involucrados en la determinación del sexo se enfocó en un inicio a un grupo de genes altamente estudiados en el desarrollo de las flores hermafroditas, conocidos como genes homeóticos de la familia MADS-box. Una mutación homeótica es definida por la producción de un órgano en el lugar inapropiado; por ejemplo, en *A. thaliana*, una mutación nula en el gen homeótico *AGAMOUS* (*AG*), provoca el reemplazo de estambres y carpelos por sépalos y pétalos, formando una flor estéril (Yanofsky *et al.*, 1990). El modelo ABC de formación floral propuesto por Coen y Meyerowitz (1991) establece que la identidad de los órganos florales depende de la combinación de genes homeóticos expresados en los primordios de los órganos. Tres conjuntos de genes homeóticos están involucrados en la formación de los cuatro verticilos florales en *A. thaliana*, los genes con función A, los que tienen función B y los que tienen función C. Cada verticilo expresa un subconjunto de estos genes, dando la especificación de los cuatro diferentes verticilos, los sépalos expresan los genes de función A. Los pétalos expresan tanto los genes de función A como los genes de función B. Los estambres expresan los genes de función B y C, y los carpelos los genes de función C (Figura 2). Los genes homeóticos MADS-box tienden a conservarse ampliamente entre las angiospermas (Weigel y Meyerowitz, 1994), lo cual ha llevado a muchos investigadores a buscar genes homeóticos MADS-box en especies monoicas y dioicas, para comparar sus patrones de expresión en flores unisexuales masculinas y femeninas y relacionarlos con las diferencias existentes en el desarrollo que llevan al dimorfismo sexual.



**Figura 2. Diagrama del modelo ABC de identidad de los órganos florales.** Estudios en las plantas hermafroditas *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* mostraron que hay tres genes responsables de la identidad de los órganos florales, designados A, B y C. Los sépalos se desarrollan de la región meristemática donde sólo los genes A son expresados, los pétalos se desarrollan donde los genes A y B son expresados, los estambres se originan cuando se expresan los genes B y C, los carpelos se originan donde sólo los genes C se expresan. (Modificado de Alberts et al., 2008).

*Asparagus officinalis* es una especie dioica cuyas flores femeninas presentan estambres degenerados y las flores masculinas presentan un estigma sin desarrollar pero un ovario completamente desarrollado (Caporali et al., 1994). La participación del gen MADS-box *AOM1* (*A. officinalis* MADS-box 1) en el proceso de determinación del sexo fue evaluada. *AOM1* es expresado con el mismo patrón en las flores masculinas y femeninas durante las etapas tempranas del desarrollo floral, cuando el botón floral es potencialmente hermafrodita. Durante las siguientes etapas, cuando la unisexualidad se manifiesta, *AOM1* se expresa en las anteras y óvulos de las flores masculinas, y sólo en los óvulos de las flores femeninas (y no en las anteras, las cuales pronto empiezan a degenerar). Consecuentemente, estos resultados descartan a *AOM1* en el proceso de determinación sexual en *A. officinalis* (Caporali et al., 2000). Un estudio similar se realizó en *Silene latifolia*, en la cual se identificaron cinco genes MADS-box. Estos genes denominados *SLM1-5* son homólogos a genes MADS-box de *Antirrhinum majus*. Las flores masculinas de *S. latifolia* presentan un pequeño verticilo femenino en comparación con el verticilo femenino de las flores femeninas. De forma interesante, *SLM1*, *SLM4* y *SLM5* son expresados en los mismos verticilos en etapas similares en las flores de ambos sexos; sin embargo, *SLM2* y *SLM3* muestran diferentes patrones de expresión

durante el desarrollo. A pesar de ello, las alteraciones en el desarrollo de las flores masculinas comienzan antes de que los transcritos *SLM2* y *SLM3* puedan ser detectados. Así, se concluye que las diferencias en la expresión son una consecuencia del cambio en el desarrollo y no son la causa del cese del desarrollo del carpelo (Lebel-Hardenack *et al.*, 2002; Hardenack *et al.*, 1994). Las observaciones anteriores sirvieron para descartar a estos genes como parte esencial en los programas de determinación del sexo en estas especies.

La espinaca cultivada (*Spinacia oleracea*) es una especie dioica cuyas flores unisexuales se distinguen por carecer de órganos reproductores vestigiales del sexo opuesto en las flores masculinas y femeninas. Durante el desarrollo floral, la diferenciación sexual ocurre antes de la formación de los primordios de los órganos reproductivos. Sather *et al.* (2005) compararon los patrones de expresión espacial y temporal de SpAG, un homólogo de AG de *A. thaliana*, debido a la completa ausencia del verticilo femenino en la flor masculina de *S. oleracea*. SpAG se expresa de forma similar en meristemas florales masculinos y femeninos; de cualquier forma, posteriormente en el desarrollo de las flores masculinas, el transcrito de SpAG se detecta en la parte central de los primordios estaminales, mientras que en la parte central de las flores, donde los carpelos nunca se desarrollan y la región correspondiente permanece plana, el mensajero no es detectado. En contraste, en las flores femeninas, el mRNA de SpAG se detecta en la región central del meristemo floral, es decir, la región donde se desarrollará el carpelo, y la expresión continua hasta la madurez aunque para entonces se restringe a los tegumentos de los óvulos. Este patrón de expresión, sugiere la participación de SpAG en la identidad de los órganos florales de esta especie y al menos correlaciona (aunque una participación directa no puede asegurarse) con el dimorfismo sexual de las flores de espinaca (Sather *et al.*, 2005).

La especie dioica *Thalictrum dioicum* produce flores masculinas y femeninas que carecen de órganos abortados del sexo opuesto, por esta razón, es posible que los mecanismos de determinación del sexo actúen río arriba de los genes que confieren la identidad de los órganos florales y que estos genes y/o sus reguladores estén

directamente involucrados. Para probar la posibilidad de que la determinación del sexo en esta especie pueda ocurrir a través de un mecanismo tipo homeótico, se han clonado y analizado genes homólogos a los genes que confieren identidad a los órganos florales. Uno de estos genes, un homólogo de AG llamado *ThdAG2*, parece ser un buen candidato a participar en la identidad carpelar y en consecuencia en la identidad sexual, debido a su expresión limitada a las flores femeninas. Sin embargo, su participación se descartó ya que se observó que el transcrito estaba localizado exclusivamente en los óvulos en desarrollo, lo cual sugiere que este gen no está involucrado en la identidad carpelar en esta especie (Di Stilio *et al.*, 2005).

### **Genes ligados a cromosomas sexuales**

Otra parte de la investigación relacionada con la identificación de los genes ligados a la determinación sexual, se ha enfocado a aquellas especies de plantas que presentan cromosomas sexuales. Aproximadamente 70 especies dioicas presentan cromosomas sexuales diferentes; sin embargo, a diferencia de los heterocromosomas de animales, los de las plantas no suelen presentar diferencias tan pronunciadas (Khryanin, 2007). Una característica distintiva de los cromosomas sexuales es la supresión del proceso de recombinación, el cual resulta esencial para la evolución de la separación de géneros a partir de organismos hermafroditas cuando múltiples loci están involucrados en la determinación del sexo.

La supresión de la recombinación viene seguida por tres posibles procesos: el primero es la rápida acumulación y fijación de mutaciones en las regiones no recombinantes, otra posibilidad es que en algunos alelos surjan mutaciones favorables dentro del proto-cromosoma-Y, fijándose en la población junto con las mutaciones deletéreas en el resto de los alelos del cromosoma. Una tercera opción es que la selección contra los alelos deletéreos en el cromosoma no recombinante, reduzca el tamaño de la población y acelere el proceso de fijación de mutaciones (Charlesworth, 2002). Posterior a la supresión de la recombinación, los cromosomas se diferencian morfológicamente en la región encargada de la determinación sexual, a continuación, uno de los cromosomas degenera debido a la acumulación de mutaciones deletéreas, inserciones y rearrreglos a gran escala (Charlesworth *et al.*, 2005).

El primer reporte exitoso de la identificación de genes del cromosoma Y se realizó por Delichère *et al.* (1999) en *Silene latifolia*, quienes identificaron al gen *SIY1* (*S. latifolia* Y-gene 1) ligado al cromosoma Y. Este gen es homólogo a miembros de la familia de proteínas que contiene dominios repetidos WD. Estas proteínas están involucradas en una gran variedad de procesos, incluyendo la regulación transcripcional, el control del crecimiento, la diferenciación celular y la estructura de la cromatina. *SIY1* sólo se expresa en las flores de las plantas masculinas, particularmente en los estambres. Por otro lado el gen *SIX1* (la forma génica ligada al cromosoma X) se expresa de forma muy similar tanto espacial como temporalmente en tejidos masculinos y femeninos. La expresión del gen no se detectó en las etapas donde había concluido el desarrollo de los órganos sexuales. La proteína *SIX1/Y1* se localizó en el núcleo de células en división y en células al inicio de la diferenciación, por esto, se propuso que su papel podría estar involucrado con la promoción de la división celular y diferenciación temprana de los órganos sexuales. Un segundo par de formas alélicas ligadas al sexo son *SIX4* (forma ligada al cromosoma X) y *SIY4* (ligada al cromosoma Y). Ambos alelos son expresados en una gran variedad de tejidos de *S. latifolia*, y ambos muestran homología con la enzima 6-fosfofructo- 2-cinasa/fructosa-2-6-bifosfatasa, así que probablemente estos genes codifican proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos. De estos datos se infiere que estos genes pueden tener expresión constitutiva y funciones de mantenimiento celular básico (Atanassov *et al.*, 2001).

En *S. latifolia*, se identificó el gen *DD44* (*Differential Display 44*) durante una búsqueda de genes expresados en etapas tempranas de diferenciación y desarrollo de las flores masculinas; sin embargo, los análisis posteriores revelaron que este gen se expresa en varios tejidos de las flores masculinas y femeninas, sugiriendo así que su función podría estar relacionada con el mantenimiento celular básico en esas etapas de desarrollo en ambos tipos de flores. *DD44* es altamente similar a la subunidad  $\delta$  de la ATPasa mitocondrial de *Ipomea batatas*. *S. latifolia* tiene dos alelos del gen *DD44*, uno ligado al cromosoma Y (*DD44Y*) y el otro homólogo funcional ligado al cromosoma X (*DD44X* – Moore *et al.*, 2003). Otro par de genes homólogos ligados al sexo se aislaron de una biblioteca de cDNA obtenida de botones florales

masculinos de *S. latifolia*. El primero, *SlssX* (*S. latifolia spermidine synthase*) es la forma ligada al cromosoma X, mientras que *SlssY* está ligada al cromosoma Y. Este gen es homólogo a la espermidina sintasa, una enzima responsable de catalizar la biosíntesis de espermidina, una poliamina ubicua. El producto de este gen también puede tener funciones de mantenimiento celular (Filatov, 2005). Otros genes asociados a los cromosomas sexuales son *SIX3* (asociado al cromosoma X) y *SIY3* (asociado al cromosoma Y). Estas secuencias codifican para proteínas similares a las cinasas dependientes de calcio (CDPK's) del tabaco, arroz y *A. thaliana*, aunque al igual que los ejemplos anteriores, sus funciones parecen asociarse al mantenimiento celular (Nicolas et al., 2005).

El aislamiento de un gen del cromosoma X y su homólogo del cromosoma Y, o viceversa, ha sido de gran importancia debido a que permiten llevar a cabo análisis más detallados sobre la evolución de los cromosomas sexuales. La comparación de las tasas de mutación de ambos cromosomas, ha servido para determinar si existe supresión de la recombinación entre los cromosomas sexuales y sus consecuencias para las secuencias ligadas al cromosoma Y, tales como degeneración acelerada y presencia de pocos genes funcionales (Bergero et al., 2007). A pesar de estos hallazgos, hasta el momento, no se han identificado genes ligados a los cromosomas sexuales, cuya participación en el desarrollo de las flores unisexuales sea decisiva.

## **Genes de determinación del sexo especie-específicos**

### **a) Familia Cucurbitaceae**

El pepino (*Cucumis sativus*) es una especie que recientemente ha tomado mucha relevancia en el estudio de la determinación sexual.

*C. sativus* usualmente produce flores masculinas y femeninas en el mismo individuo, aunque algunos linajes producen flores hermafroditas. Dependiendo de las tasas de producción de flores masculinas, femeninas y hermafroditas, es posible encontrar plantas monoicas, andromonoicas, hermafroditas, masculinas y femeninas. El

genotipo monoico es el más común haciendo al pepino un sistema modelo para el estudio de la determinación del sexo en especies monoicas. El primordio floral de *C. sativus* es originalmente hermafrodita y la detención en el desarrollo de los órganos inapropiados en las flores unisexuales ocurre en regiones específicas del verticilo sexual, específicamente en las partes portadoras de los gametos sin afectar de forma importante el resto del órgano (Bai *et al.*, 2004).

La regulación de la producción de etileno endógeno se ha asociado a la determinación del sexo (Kamachi *et al.*, 1997), específicamente con la feminización de las flores (Rudich *et al.*, 1972). En los tejidos vegetales el etileno se sintetiza a partir de la S-adenosil metionina (AdoMet), la cual es convertida a aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) por la ACS (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa). Posteriormente, el ACC es oxidado a etileno por la ACC oxidasa (ACO). La disponibilidad de ACC frecuentemente es el paso limitante en la producción de etileno (Zarembinski y Theologis, 1994). En *C. sativus*, la expresión de los genes *Cs-ACS1* y *Cs-ACS1G* correlaciona con la producción de las flores femeninas y se ha propuesto que el gen *Cs-ACS1* está presente como única copia en las plantas monoicas del pepino (*ff*) mientras que las plantas femeninas (*FF*) poseen dos copias del gen (Treibitsh *et al.*, 1997; Mibus y Tatlioglu, 2004). Kamachi *et al.* (1997) encontraron que en plantas monoicas y femeninas, los genes *CS-ACS* están sobre-regulados por el etileno, algo que no pasa en las plantas andromonoicas. Aparentemente, la copia única de *Cs-ACS1* presente en las plantas monoicas y la duplicación de este locus, lleva a la expresión del nuevo gen *Cs-ACS1G* en un nuevo ambiente genómico, conllevando a cambios en la secuencia promotora y por tanto cambios en los patrones de expresión y concentración de etileno en los botones florales. De esta manera, la feminización inducida es una respuesta a esta doble dosis genética (Mibus y Tatlioglu, 2004).

En la región 5' distal del promotor *Cs-ACS1G*, pero no del promotor de *Cs-ACS1*, se localiza un dominio CARG, el cual le da a *Cs-ACS1G* la posibilidad de ser un blanco directo de proteínas MADS-box y ser regulado por los genes homeóticos que dirigen la identidad de los órganos florales (Knopf y Trebitsh, 2006). El gen homólogo a *Cs-ACS1/G* en *A. thaliana*, denominado *ACS9*, se expresa fuertemente en

el estilo, por lo que al etileno también se le ha implicado en el desarrollo del gineceo de las flores hermafroditas (Tsuchisaka y Thologis, 2004). Dado que la capacidad de producir y de responder al etileno es de gran importancia para las diferentes expresiones del sexo en *C. sativus*, se propone que la biosíntesis de etileno responsable de la diferenciación sexual, reside en los botones florales (Yamasaki *et al.*, 2003). El gen del pepino CS-ACS2 corresponde a la familia multigénica que codifica para la enzima ACS. Esta enzima se acumula debajo del primordio del pistilo de flores femeninas tanto en poblaciones monoicas como en dioicas. Sin embargo, no se detecta en los estambres o en sus primordios. En otras palabras, la expresión del gen CS-ACS2 correlaciona positivamente con la producción de flores femeninas, lo cual sugiere que la biosíntesis de etileno mediante la vía de CS-ACS2 en los botones florales, es consistente con la proporción de flores femeninas producidas en los linajes monoicos del pepino (Saito *et al.*, 2007).

Aunque se ha acumulado mucha información respecto al papel del etileno en la formación de flores femeninas en las plantas de pepino, los mecanismos de acción del etileno en la regulación de la determinación del sexo no han sido dilucidados. Ando *et al.* (2001) encontraron que la expresión del gen *ERAF17* (*Ethylene-Responsive gene Associated with the formation of Female flowers 17*) es inducida por etileno durante la formación de flores femeninas. El gen *ERAF17* es miembro de la familia génica MADS-box, con un dominio MADS-box y una caja K. Este gen aumenta su expresión en correlación con la inducción de la síntesis de etileno y, por lo tanto, con la formación de las flores femeninas. En una forma muy similar, su expresión se reprime por la presencia de inhibidores de la biosíntesis de etileno. En la flor masculina de un cultivar monoico del pepino, *ERAF17* apenas es detectable durante diferentes etapas de desarrollo, contrario a lo que ocurre en las flores femeninas de cultivares feminizados, donde el mRNA de *ERAF17* se detecta abundantemente desde las etapas más tempranas de desarrollo hasta la antesis. Debido a que la expresión de *ERAF17* se detecta aún antes de la aparición de los caracteres morfológicos asociados a las flores femeninas y permanece hasta las últimas etapas de desarrollo, se ha propuesto que constituye un factor que confiere feminidad al meristemo floral durante el desarrollo temprano. Además podría asociarse al

desarrollo y mantenimiento de los órganos florales femeninos, aunque su función se desconoce (Ando *et al.*, 2001). Otro gen identificado cuya expresión es inducida en respuesta al etileno es *ERAF16* el cual es homólogo a las metiltransferasas, pero cuya actividad no ha sido probada (Ando y Sakai, 2002). Los cambios en la expresión de *ERAF16* correlacionan fuertemente con el tiempo en el cual el etileno afecta la formación de las flores femeninas en los cultivares feminizados, mientras que la supresión en la expresión de *ERAF16*, puede involucrarse en la metilación de moléculas señalizadoras específicas, las cuales a través de una vía de transducción de señales desconocida inducirá la formación de flores femeninas en *C. sativus* (Ando y Sakai, 2002). Este mecanismo muestra grandes similitudes con el proceso de determinación del sexo reportado en maíz a través de la actividad de *Ts2* (DeLong *et al.*, 1993), pero hasta el momento no existen suficientes datos que permitan apoyar o descartar esta hipótesis.

Considerando la fuerte relación entre el etileno y la diferenciación sexual en el *C. sativus*, se ha considerado que no sólo la cantidad de etileno es importante para la diferenciación sexual, sino que también influye en el destino del desarrollo de los estambres y carpelos al regularse estos por diferencias en su sensibilidad al etileno. Estas diferencias permitirían la presencia de respuestas diferenciales a distintos rangos de concentraciones hormonales al inhibir o promover el desarrollo de cada órgano sexual de forma independiente (Yin y Quinn, 1995). Little *et al.* (2007) estudiaron las diferencias en la sensibilidad al etileno en los primordios florales del melón (*Cucumis melo*), una especie predominantemente andromonoica que presenta diferentes variaciones en su sistema sexual, así que es posible encontrar poblaciones monoicas, ginomonoicas y hermafroditas. Los linajes andromonoicos y femeninos del melón que sobreexpresan una versión no funcional del receptor de etileno, *etr1-1* de *A. thaliana*, son incapaces de unirse al etileno y suprimir su respuesta, aún cuando este último esté presente (Little *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 1999). Estas líneas insensibles al etileno prácticamente han suprimido la formación y desarrollo del carpelo, indicando la importancia de la percepción del etileno en este proceso. Además, la insensibilidad al etileno en los primordios de pétalos y estambres de un linaje del melón, resulta en el desarrollo casi absoluto de flores

masculinas. Por otro lado, la insensibilidad al etileno en los primordios carpelares promueve la formación de flores femeninas. Estos datos sugieren que la percepción del etileno por los primordios de pétalos y estambres es crítica para la determinación del sexo, manifestado por la promoción del desarrollo del carpelo y la supresión del desarrollo de los estambres. Aparentemente, si los niveles de etileno son suficientemente altos, o si los primordios estaminales son lo suficientemente susceptibles, la supresión de los estambres ocurre en las flores que desarrollan carpelos. Además de promover el desarrollo del carpelo en el momento de la determinación del sexo, el etileno también es importante para mantener el desarrollo de los órganos femeninos (Little *et al.*, 2007). Estas observaciones fueron hechas en el melón, específicamente en plantas transgénicas que expresan a ACS en forma constitutiva. Estas plantas desarrollan un mayor número de flores hermafroditas que las plantas de tipo silvestre y un gran número alcanzan la madurez. Estas dos características son muy deseables en cultivares con importancia económica (Papadopoulou *et al.*, 2005; Knopf y Trebitsh, 2006).

Sin embargo, el etileno no funciona de la misma manera en la determinación del sexo en todas las especies de la familia Cucurbitaceae. En la sandía (*Citrullus* spp.), una especie monoica o andromonoica, el etileno tiene un efecto masculinizante lo cual contrasta con el efecto feminizante que tiene esta molécula en otras especies de la familia mencionadas anteriormente (Salman *et al.*, 2008). En los órganos florales de la sandía, *CitACS1* (*Citrullus ACS1*) y *CitACS3* son genes cuya expresión es diferencial. El gen *CitACS1* se expresa en el primordio del botón floral, pero no es detectable en las flores durante la antesis. Además, no se observaron diferencias en la expresión al comparar tejidos de flores masculinas, femeninas y hermafroditas. Este patrón de expresión sin relación aparente con el sexo de la flor, sugiere que el gen puede participar en procesos de crecimiento celular de los órganos florales. Por otra parte, *CitACS3* se expresa en botones florales jóvenes y en flores masculinas y femeninas en antesis. Sin embargo, su expresión no se detecta en tejidos femeninos. El gen *CitACS3* se regula positivamente por el ACC, la cual es un precursor inmediato del etileno, considerada la hormona masculinizante de la sandía (Salman *et al.*, 2008).

### **b) *Silene latifolia***

En las flores masculinas y femeninas de *S. latifolia*, los cuatro verticilos florales inician su desarrollo, una vez que todos los órganos han surgido, la región femenina en el centro del meristemo floral es considerablemente más pequeña en las futuras flores masculinas que en las femeninas. Posteriormente, en las flores masculinas se desarrolla un filamento en lugar de órganos femeninos, en las flores femeninas, los estambres degeneran de forma temprana, mientras que cinco carpelos se desarrollan al centro de la flor. Debido a que el desarrollo del carpelo se detiene en etapas muy tempranas en las flores de *S. latifolia*, se han buscado genes ortólogos a los que se expresan en la parte central del meristemo floral de *A. thaliana*. Entre estos genes se encuentran *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* y *CUP SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1)* y *CUC2*. *STM* es un gen requerido en el meristemo floral para el mantenimiento de la proliferación celular (Endrizzi *et al.*, 1996), mientras que *CUC* podría estar involucrado en el mantenimiento de los límites específicos de los órganos dentro del meristemo floral (Vroemen *et al.*, 2003). Los ortólogos de *STM* en *S. latifolia*: *SISTM1* y *SISTM2* se expresan durante el desarrollo temprano en los meristemas florales masculinos, femeninos y hermafroditas [estos últimos son producidos por los mutantes *bsx11* que carecen de la porción del cromosoma X responsable del detenimiento en el desarrollo carpelo (Lardon *et al.*, 1999)]. Posteriormente, la expresión se restringe a la región central de los meristemas florales femeninos y hermafroditas. Durante el inicio del desarrollo del carpelo y los demás órganos, ni el transcrito de *SISTM1* ni el de *SISTM2* son detectados. El transcrito de *SICUC*, el ortólogo de *CUC* de *A. thaliana*, es detectado entre los límites de los verticilos de los meristemas florales masculino, femenino y hermafroditas, justo antes del inicio del desarrollo de los primordios. Posteriormente, *SICUC* se localiza en una extensa región de los meristemas masculinos únicamente. Este patrón de expresión concuerda con el tiempo en el cual *SISTM1* y *SISTM2* no pueden ser detectados en la misma región (Zluvova *et al.*, 2006). En *A. thaliana*, *STM* promueve la actividad de *CUC1*, y es requerido para la correcta expresión de *CUC2* (Weiblen *et al.*, 2000; Vroemen *et al.*, 2003). Los genes *CUC* se han asociado con la ausencia de la proliferación celular, específicamente entre los límites de los

verticilos (Lardon *et al.*, 1999). Probablemente, el meristemo pierde su identidad y por lo tanto desarrolla un filamento en lugar de un primordio carpelar (Zluvova *et al.*, 2006).

Matsunaga *et al.* (1996) identificaron cuatro cDNAs de las flores masculinas de *S. latifolia*: *MROS1-4* (*Male Reproductive Organ Specific 1-4*). Los cuatro genes se expresan exclusivamente en los órganos masculinos. *MROS2* se expresa durante la etapa de maduración de la antera. Este gen codifica para un dominio rico en glicinas y un motivo tipo extensina, sugiriendo que se adhiere a la pared celular y probablemente se relaciona con el desarrollo de la epidermis de la antera y la dehiscencia. El gen *MROS3* es expresado exclusivamente en el tapete maduro, y debido a que carece de homología con cualquier gen reportado previamente es imposible proponer una función específica.

A pesar de los grandes esfuerzos hechos en la búsqueda de las vías determinantes de la sexualidad en las plantas, estas muestran una gran variedad en la etapa en la que la determinación del sexo ocurre. De esta manera, es poco probable que un solo mecanismo esté dirigiendo el proceso en las diferentes especies, de hecho, es posible que sólo las especies cercanamente relacionadas compartan algunos aspectos en los mecanismos de determinación sexual, aunque en ejemplos como los del maíz o cucurbitáceas esta premisa no se cumple.

### **Genes involucrados en el desarrollo del carpelo**

Recientemente, muchos trabajos se han enfocado a la identificación de los genes que afectan el desarrollo del carpelo y los estambres. El control molecular del desarrollo del carpelo se ha investigado en varias especies modelo, especialmente en *A. thaliana*. La comparación del desarrollo del carpelo en diferentes grupos de angiospermas permitiría la identificación de variantes moleculares que expliquen la diversidad de las morfologías carpelares, como en el cese de la diferenciación de algunos tejidos y la subsecuente formación de flores unisexuales masculinas. La búsqueda de mutantes en las cuales sólo se encuentre afectado el gineceo, la descripción detallada de los fenotipos y la clonación del gen (o genes) regulador

(es) del proceso, son pasos esenciales para el entendimiento y esclarecimiento del proceso morfogénico del desarrollo del carpelo. Especial atención merecen los genes que actúan río abajo de aquellos factores involucrados en el establecimiento de la identidad del verticilo sexual femenino. Estos genes se han relacionado con una amplia variedad de procesos tales como el control del crecimiento, el establecimiento morfológico y la diferenciación regional, todos con la finalidad de producir un carpelo funcional. Es de esperarse que mutaciones en estos genes prevengan la culminación de los patrones de diferenciación regional y, por lo tanto, la diferenciación morfológica, comprometiendo de esta manera la fertilidad femenina en la planta. El conocimiento generado durante el estudio de la función de estos genes durante el desarrollo de los verticilos sexuales, ayudará en el esclarecimiento de las rutas evolutivas que generan flores unisexuales en general y, particularmente, en explicar la evolución del dioicismo vía el ginodioicismo (para detalles del desarrollo de carpelo ver Hill y Lord, 1989; Smyth *et al.*, 1990; Sessions y Zambryski, 1995; Ferrándiz *et al.*, 1999).

Dado que *A. thaliana* es una especie hermafrodita, parecería poco probable que genes que se han descrito que se encuentran involucrados en su programa de desarrollo del carpelo, pudieran formar parte de los programas de desarrollo de los carpelos en las flores unisexuales en las especies dioicas o monoicas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el ancestro común de las angiospermas, incluyendo las especies unisexuales existentes actualmente, fue hermafrodita (ver Endress y Doyle, 2009), y que muchos de los programas de desarrollo y su control genético están conservados tanto en angiospermas basales como en las actuales (Soltis *et al.*, 2009). Lo anterior indicaría que los mecanismos de control del desarrollo estaban presentes en el extinto ancestro común de las plantas, hace aproximadamente 300 millones de años, y que es a partir de estos que se originaron los mecanismos que controlan la formación de flores unisexuales en la actualidad.

La morfogénesis de las plantas requiere la acción de cascadas de señalización que involucran genes reguladores específicos. Una vez que la identidad del gineceo se ha establecido, otro conjunto de genes define su crecimiento diferencial (polaridad)

y diferenciación. La polaridad del eje interno-externo, la polaridad apical-basal (estigma, estilo y ovario), la polaridad lateral-medial, el desarrollo de tejidos específicos en los márgenes carpelares (como la placenta, el tejido de transmisión e incluso el estilo), tienen su desarrollo asociado a la acción de muchos genes específicos. Genes de este tipo, resultan de interés para este trabajo y algunos de ellos se presentan a continuación.

El gen *TOUSLED* (*TSL*) se identificó mediante el análisis de plantas mutantes con una inserción de T-DNA que interrumpen este gen. Las plantas mutantes *tsl-1* presentan alteraciones morfológicas en muchos órganos, mostrando los defectos más evidentes durante el desarrollo floral, incluido el desarrollo del gineceo, el cual siempre está presente y produce óvulos. Las plantas mutantes *tsl-1* desarrollan órganos femeninos aunque estos son estériles. Sin embargo, cuando las plantas crecen a 16°C ocasionalmente producen semillas viables producto de la autofecundación. Los defectos morfológicos del gineceo de las plantas *tsl-1* son consistentes, e incluyen la reducción de tejido estilar y estigmático, la formación incompleta de la placenta y el crecimiento anormal de los tegumentos de los óvulos (Roe et al., 1993). En la parte apical de las plantas mutantes *tsl-1* se forman parches de tejido estigmático y las células epidérmicas del estilo se localizan en los márgenes apicales del ovario. Aún cuando algunas de las células de estos mutantes son capaces de diferenciarse en células estilares o estigmáticas, las zonas donde deberían estar presentes se encuentran reducidas (Roe et al., 1993; Roe et al., 1997). Probablemente, las fallas en el desarrollo se deben a la carencia de coordinación en el crecimiento entre los primordios carpelares, resultando en una fusión incompleta de los carpelos en las flores maduras. *TSL* codifica para una cinasa de serina/treonina localizada en el núcleo. Este producto es expresado prácticamente de manera ubicua, aunque con un pico conspicuo en los botones florales (Roe et al., 1993).

El gen *CRABS CLAW* (*CRC*) se identificó a partir de una búsqueda en una colección de plantas mutantes, seleccionando aquellas que presentaban diferentes anomalías exclusivamente en el desarrollo del gineceo (Alvarez y Smyth, 1999).

Las plantas mutantes *crc-1* presentan un gineceo más corto y más ancho, con menos óvulos que las plantas de tipo silvestre. Todos los tipos celulares de un gineceo maduro están presentes en las plantas mutantes en las posiciones correctas; de cualquier forma, el estilo está considerablemente reducido y no se encuentra fusionado en el ápice, mostrando parches con tejido estigmático. De acuerdo a esto, CRC parece estar controlando algunos aspectos de la elongación del carpelo (Alvarez y Smyth, 1999; Alvarez y Smyth, 2002). La expresión de CRC está restringida a las flores, más específicamente a carpelos y nectarios. En los carpelos en desarrollo, los sitios de expresión se localizan en la epidermis y tejidos internos durante la elongación del gineceo. La proteína CRC contiene un dominio C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>, el cual es del tipo dedos de zinc, cercano al extremo amino. También posee un dominio rico en serinas y prolinas en la región central de la proteína y un dominio hélice-asa-hélice (HLH — Helix-Loop-Helix) en el extremo carboxilo. Estos dominios son característicos de factores de transcripción, sugiriendo que CRC es un miembro del aparato transcripcional (Bowman y Smyth, 1999; Alvarez y Smyth, 2002). La proteína CRC pertenece a la familia YABBY, la cual es específica de plantas y en *A. thaliana* está formada por seis miembros los cuales presentan un alto grado de conservación del dominio HLH, también conocido como dominio YABBY. Los miembros de la familia YABBY en *A. thaliana* son: *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, *CRC*, *INNER NO OUTER (INO)*, *YABBY2 (YAB2)*, *YAB3* y *YAB5* (Alvarez y Smyth, 1999; Bowman y Smyth, 1999; Siegfried et al., 1999).

Los genes *STYLISH1 (STY1)* y *STY2* se aislaron por Fridborg et al. (2001) como parte de la búsqueda de genes relacionados con el gen *SHORT INTERNODES (SHI)*. En un principio, estos genes fueron llamados *SHI-RELATED SEQUENCES 1 (SRS1)* y *SRS2*. La familia génica *SHI* incluye al menos 10 genes: *SHI* y *LRP1 (LATERAL ROOT PRIMORDIUM 1)*, *STY1*, *STY2*, *SRS3-SRS8* (Kuusk et al., 2002; Fridborg et al., 1999; Fridborg et al., 2001). Esta familia génica es exclusiva de plantas, dado que secuencias similares no han sido encontradas en otro tipo de organismos (Fridborg et al., 1999). Las plantas mutantes *sty1-1* exhiben malformaciones restringidas a la región apical del gineceo. En el gineceo maduro de las plantas mutantes algunas células estilares están anormalmente expandidas y crecen de manera no

coordinada. Esto afecta el desarrollo de las papilas estigmáticas, las cuales también crecen anormalmente. El estilo de las plantas mutantes *sty2-1* no presentan diferencias morfológicas comparadas con el fenotipo silvestre. De cualquier forma, las plantas dobles mutantes *sty1-1 sty2-1* presentan una reducción marcada en la cantidad de tejido estilar y estigmático, y el crecimiento no coordinado de las células estilares (Kuusk *et al.*, 2002). Estas características resultan en un estilo severamente distorsionado. De forma interesante, la reducción de la fertilidad en estos mutantes es mínima (Fridborg *et al.*, 2001).

### **El papel de la muerte celular programada en la unisexualidad**

La muerte celular programada (Programmed Cell Death — MCP) ha sido definida como una secuencia de eventos (potencialmente interrumpibles) que llevan a la destrucción controlada y organizada de la célula (Lockshin y Zakeri, 2004). Este proceso es crucial en las respuestas de defensa para prevenir la diseminación de patógenos y para el desarrollo correcto del plan corporal multicelular (Lam, 2004). van Doorn y Woltering (2005) han categorizado la MCP en plantas en tres tipos: apoptótica, autofágica y no lisosómica.

La mayor parte de los eventos de MCP involucrados en el desarrollo (desarrollo de las células de xilema y floema, dehiscencia de anteras, germinación del polen, formación de aerénquima, senescencia foliar y desarrollo de células de la cofia en la raíz, así como su pérdida y reemplazo) son clasificados como MCP tipo autofágica (revisado en van Doorn y Woltering, 2005; Shishkova y Dubrovsky, 2005; Gunawardena, 2008).

Las características morfológicas que se encuentra en la MCP tipo autofágica son: crecimiento desmedido de la vacuola, desaparición del retículo endoplásmico y otros organelos, colapso del tonoplasto y de la membrana plasmática, degradación de mitocondrias y núcleo y por último afectación de la pared celular (van Doorn y Woltering, 2005).

Un evento en el cual también se ha involucrado a la MCP es en el desarrollo de flores unisexuales, donde la aborción selectiva de los órganos reproductivos puede

ocurrir mediante la activación del programa de MCP. La MCP involucrada en la aborción de órganos se observa en las flores femeninas de *Actinidia deliciosa* (kiwi), en cuyas anteras se presentan características morfológicas típicas de la MCP, tales como condensación del citoplasma, rompimiento de la membrana plasmática y la envoltura nuclear, y condensación de la cromatina. La evidencia morfológica fue apoyada por la evidencia bioquímica, al observarse que las células que dan origen al polen, muestran fragmentación del DNA. Estos procesos dan como resultado esterilidad de los estambres de las flores femeninas en esta especie (Coimbra *et al.*, 2004). En *Vitis vinifera*, parte del programa de aborción del gineceo en las flores masculinas ocurre en los óvulos, los cuales sufren una separación entre la nucela y los tegumentos, aparentemente como consecuencia de la MCP, ya que en las células de la nucela se observan núcleos condensados. (Caporali *et al.*, 2003). No existe ninguna otra evidencia morfológica o bioquímica que apoye estos datos.

Como ya se mencionó anteriormente, la MCP es un participante natural durante el desarrollo de las anteras, en la dehiscencia para la liberación del polen. Teniendo en cuenta lo anterior, la ausencia de MCP también puede ser motivo de esterilidad masculina. Tal es el caso del género *Consolea* de la familia Cactaceae, el cual está conformado por nueve especies dioicas, seis de las cuales presentan flores pistiladas con estambres carentes de polen. Estas seis especies muestran retrasos o ausencia en la activación del programa de MCP, por lo que aquellos estratos de la antera que en las anteras fértiles de otras especies del género mueren para liberar al polen, permanecen intactos, dejando a la antera cerrada. En términos prácticos, estos estambres son estériles y esta esterilidad es debida a la ausencia de MCP (Strittmatter *et al.*, 2006). Un proceso similar ha sido descrito en *Helianthus annuus* por Balk y Leaver (2001) para las plantas que llevan la mutación mitocondrial PET1-CMS. En todos los estratos que forman las anteras de estas mutantes, las células primero pierden su forma regular y posteriormente presentan fragmentación del DNA, resultando en esterilidad masculina completa. Se sugiere que la mutación PET1-CMS induce MCP prematura la cual se extiende a todos los estratos de la antera.

## Antecedentes inmediatos

*Opuntia stenopetala* es una angiosperma perteneciente a la familia Cactaceae, es una de las 27 especies que en esta familia produce flores unisexuales. Muchas de las descripciones de los sistemas sexuales de las especies de cactáceas que producen flores unisexuales, se han realizado de forma incompleta, generando confusión. Tal es el caso de *Mamillaria dioica*, descrita con poblaciones con plantas que producen flores femeninas y plantas con flores hermafroditas (Brandege, 1897 en Lindsay y Dawson, 1952; Ganders y Kennedy, 1978) y poblaciones con plantas femeninas, plantas masculinas y plantas hermafroditas (Bravo-Hollis, 1978). Sin embargo, Lindsay y Dawson (1952) no lograron encontrar las flores unisexuales, por lo que concluyeron que los sistemas sexuales en esta especie son variables entre poblaciones. En el mismo reporte, los autores mencionan la presencia de flores unisexuales para otra especie, *M. neopelmeri*, pero no hacen mención de si estas flores son masculinas o femeninas. No obstante, otras descripciones de los sistemas sexuales diferentes al hermafrodita si resultan confiables debido a que la caracterización se realiza a partir de diferentes puntos de vista, como el ecológico, el estructural y el de desarrollo. Tales son los casos de *O. robusta*, una cactácea trioica (Del Castillo, 1986; Del Castillo y González, 1988), la planta dioica *Echinocereus coccineus* (Hoffman, 1992), *Pachycereus pringlei* con poblaciones trioicas y ginodioicas (Fleming *et al.*, 1994) y *Neobuxbaumia mezcalaensis* con poblaciones androdioicas (Valiente *et al.*, 1997).

*Opuntia stenopetala* se describió por Bravo-Hollis (1978) como una cactácea dioica cuyas flores masculinas presentan un estilo abortado. Sin embargo, no se hace ninguna referencia con respecto a la morfología del androceo de las flores femeninas. Nuestro grupo de trabajo analizó la morfología floral y describió el desarrollo de granos de polen y óvulos, tanto en flores masculinas como en flores femeninas. De este trabajo, se concluyó que en las flores femeninas, las anteras son indehiscentes y estériles debido a que la división meiótica en las células que dan origen al grano de polen no se completa y posteriormente estas células degeneran. Adicionalmente, en los óvulos de las flores masculinas no se encontraron indicios de que ocurra la meiosis, además de que el resto del desarrollo del óvulo es

incompleto. Estas características nos llevaron a proponer un dioicismo funcional en esta especie, aunque morfológicamente se aprecien ambas estructuras reproductoras en todas las flores analizadas, es decir, morfológicamente semejan flores hermafroditas (Orozco, 2002). Como ya se mencionó anteriormente, para muy pocas especies dioicas se ha realizado un análisis de los mecanismos moleculares involucrados en la formación de flores unisexuales y en los casos en los que se ha realizado avances, se trata en su mayoría de especies domesticadas con alguna utilidad económica o alimenticia, por ejemplo, pepino, maíz, kiwi y espinaca (ver Ainsworth, 2000). A diferencia de estos sistemas donde la repercusión de la selección humana en el proceso de separación de sexos no se ha determinado, *O. stenopetala* resulta un sistema interesante para dilucidar el mecanismo de determinación del sexo, puesto que se trata de una especie sin ningún tipo de manipulación humana, cuyas características unisexuales han surgido como producto de los mecanismos de evolución por selección natural.

## Hipótesis

La formación de flores masculinas en *Opuntia stenopetala* es el resultado de alteraciones fisiológicas y genéticas que interrumpen el desarrollo del gineceo afectando su función.

## Objetivos

### General

Determinar los posibles mecanismos moleculares implicados en el cese del desarrollo del gineceo de las flores unisexuales masculinas de *O. stenopetala*.

### Particulares

- i. Analizar y comparar el desarrollo del gineceo en flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala*.
- ii. Identificar y clonar posibles genes involucrados en el desarrollo del gineceo en *O. stenopetala*.
- iii. Evaluar los patrones de expresión de *OstSTY*, *OstCRC* y *OstTSL* en estilos de plantas masculinas y femeninas de *O. stenopetala* en diferentes etapas de desarrollo.
- iv. Identificar *in planta* el papel de la muerte celular programada en el desarrollo del gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*.
- v. Identificar *in planta* la participación de las auxinas en el desarrollo del gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*.

## Materiales y Métodos

### Obtención del material vegetal de *Opuntia stenopetala*

Las plantas estudiadas de *O. stenopetala* pertenecen a dos poblaciones ubicadas en el municipio de Cadereyta estado de Querétaro, México. La primer población corresponde a las coordenadas 20°42.007'N, 99°37.311'W mientras que la segunda tiene las coordenadas 20°41.176'N, 99°36.154'W. En estas localidades se colectaron botones florales en distintas etapas de desarrollo, flores en antesis y segmentos de tallo (cladodio). A cada individuo se le determinó el sexo mediante el análisis de tres flores en antesis disectadas. Una vez establecido el sexo del individuo, se realizaron las colectas de material. Una parte del material obtenido se trasladó al laboratorio para ser disectado, congelado en nitrógeno líquido y posteriormente almacenado a -70°C. Otra parte del material se disectó en el campo y se trató con diferentes fijadores dependiendo del procedimiento a realizar con él. Los botones florales de diversas etapas de desarrollo se separaron de acuerdo a su longitud y se les asignó una etapa de desarrollo de acuerdo a la Tabla 1:

**Tabla 1.** Intervalo de longitudes de los botones florales en las etapas de desarrollo establecidas.

ETAPA DE DESARROLLO	LONGITUD DEL BOTÓN (mm)
Temprano	<9.5
Intermedio	15 – 18
Tardío/Antesis	>25

### Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las flores y los botones separados por etapa de desarrollo se fijaron en FAA (formaldehído 4% v/v, ácido acético 0.5% v/v, alcohol etílico 50% v/v) por 24 horas y posteriormente se deshidrataron con etanol en diferentes grados: 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100% y 100% (v/v), durante una hora cada uno. Para exponer los verticilos sexuales, las unidades del perianto y tépalos se removieron total o parcialmente. Después de la deshidratación, el material se procesó en una desecadora de punto crítico con CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se montó el material en portamuestras metálicos

para luego ser cubiertos con oro con una ionizadora (CPD030). El material se observó en un MEB Hitachi S-2460N y se tomaron micrografías.

### **Cortes histológicos**

Para los cortes histológicos, el material se fijó en formaldehído al 4% v/v en PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 2 mM, pH a 7.4) durante 12 horas. Posteriormente se lavó el tejido con PBS 1x en tres ocasiones de 10 minutos cada vez, se deshidrataron con etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% y 100%; v/v) durante media hora cada uno. Posteriormente se colocaron los tejidos en Citrosolv (Moellhausen) por 15 minutos y luego en una mezcla de Paraplast (Leica):citrosolv 1:1 a 58°C durante toda la noche, para después pasarlos a Paraplast puro por 48 horas a 58°C. Las muestras se colocaron en un cubo de cartulina y se cubrieron con Paraplast líquido hasta que solidificó a temperatura ambiente. Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo rotatorio a 7 ó 10 µm de grosor y se montaron en portaobjetos (Corning) cubiertos con grenetina.

### **Purificación de RNA total**

El RNA total se aisló de tallos, anteras y estilos en diversas etapas de desarrollo de flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala*. El método de aislamiento utilizado estuvo basado en el reportado por Vicient y Delseney (1999) con algunas modificaciones. Un gramo de tejido se pulverizó con nitrógeno líquido, se le agregaron 10 mL de solución de extracción (LiCl 8M, β-mercaptoetanol 2%) y se agitó vigorosamente para disolverlo totalmente. La mezcla se almacenó por 8 horas a 4°C. Posteriormente se le dio un pulso de centrifugación hasta alcanzar 12,000 g y se conservó el sobrenadante. Este sobrenadante se centrifugó a 20,200 g durante 30 minutos a 4°C. El botón formado se resuspendió en 10 mL de amortiguador de solubilización (dodecil sulfato de sodio –SDS– 0.5%, NaCl 100 mM, ácido etilendiaminotetraacético –EDTA– 25 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y β-mercaptoetanol 2%) y se realizaron extracciones con volúmenes iguales de fenol y mezclas de fenol:cloroformo (fenol pH 7.6, fenol:cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 y cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). En cada ocasión se centrifugó a 17,200

g durante 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. La última fase acuosa se puso a precipitar con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 1.5 volúmenes de etanol anhidro frío durante 8 horas a -20°C. Después, se centrifugó a 20,200 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el botón se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 20,200 g, 5 minutos a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se secó el botón al aire por 10 minutos. El botón se resuspendió cuidadosamente en 50-100 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC (H<sub>2</sub>O con dietilpirocarbonato al 0.05%). El RNA se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes [MAE 1x pH 7 (MOPS 0.02%, Acetato de Sodio 5 mM pH 7, EDTA 1 mM) y formaldehído al 1.1%] con bromuro de etidio (0.0015 mg/mL). Se cargó en el gel 5 µl de RNA mezclados con 10 µl de amortiguador de carga 2x (formamida 55%, formaldehído 7.4%, MAE 10x 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol, H<sub>2</sub>O-DEPC) previamente calentados 5 minutos a 60°C.

### **Clonación de genes homólogos a *TSL*, *STY* y *CRC* de *A. thaliana* en *O. stenopetala***

Con el RNA total aislado, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR con el oligonucleótido dT (T<sub>17</sub>) para sintetizar el cDNA. Para amplificar los genes homólogos de *STY*, el RT-PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos degenerados<sup>1</sup>

5'CAGCTGTCAAGAYTGTGGRAAYCAAGCIAAGAAAGA y  
5'AAGCAGGAACCCAMGTGCTYITSACGTGRGT. Dichos oligonucleótidos flanquean una región altamente conservada en los genes que forman la familia génica *SHI*, a la cual pertenecen *STY1* y *STY2* y que corresponde al dominio RING, un dominio tipo anillo dedos de zinc, característico de la familia.

Para amplificar por RT-PCR los genes homólogos a *CRC*, se utilizaron los oligonucleótidos degenerados reportados por Fourquin et al. (2005)  
5'TTGGACACAGTGACAGTGAAGTGYGGNCAYTG y  
5'AGCCCAATTCTTAGCAGCAGCASWRAANGCYTC.

<sup>1</sup>Las degeneraciones utilizadas fueron: R= A ó G; Y= C ó T; M= A ó C; K= G ó T; S= C ó G; W= A ó T; H= A, C ó T; B= C, G ó T; V= A, C ó G; D= A, G ó T; N= A, C, G ó T.

Estos oligonucleótidos abarcan los dominios de dedos de zinc y YABBY, ambos dominios se encuentran altamente conservados y son característicos de los factores de transcripción de la familia génica YABBY.

Por último, los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes homólogos de TSL fueron 5'GARTAYTGYAGTGGIAARGAICTTGATGC y 5'GGTARRTACCAIGTTCCAGCTCCCTG, los cuales flanquean la mayor parte de la secuencia que codifica el dominio catalítico de cinasa de esta proteína. El dominio catalítico es altamente conservado en las secuencias provenientes de plantas e incluso de animales.

Los productos derivados del RT-PCR se purificaron del gel y se ligaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega) mediante una reacción de ligado como se muestra a continuación:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA	150 ng
Amortiguador Ligado 2x	1x
Vector pGEM-T-Easy	50 ng
T4 DNA Ligasa	3 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O para un volumen final de 10 $\mu$ l	

La reacción de ligación se incubó durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo se realizó la transformación de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Las colonias transformantes fueron seleccionadas de éstas se aisló el plásmido. La inserción del fragmento de DNA se analizó mediante secuenciación.

### **Análisis filogenético**

Cada una de las secuencias obtenidas se editó y se tradujo con ayuda de los programas EnzymeX3 (Mekentosj) y SIXFRAME ([www.workbench.sdsc.edu](http://www.workbench.sdsc.edu)). Con estas secuencias se realizó una búsqueda de secuencias similares con el programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Con todas las secuencias obtenidas y con las reportadas previamente en *A. thaliana*, se llevaron a cabo alineamientos múltiples (Anexo 1) con el algoritmo CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, 1994), los cuales sirvieron

como base para la realización de los árboles filogenéticos utilizando el método de *Neighbor Joining* con el programa MEGA 4.0 (Molecular and Evolutionary Genetic Analysis — Tamura et al., 2007) con 1000 réplicas de *bootstrap*.

Los números de acceso de las secuencias utilizadas para construir los árboles filogenéticos se tomaron de las bases de datos del GenBank™ y de TAIR (The Arabidopsis Information Resource — [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Las secuencias utilizadas en la construcción del árbol de OstSTY (GU583850) fueron: de *A. thaliana* STY1 (At3g5106), STY2 (At4g36260), LRP1 (At5g12330), SHI (At5g66350), SRS3 (At2g21400), SRS4 (At2g18120), SRS5 (At1g75520), SRS6 (At3g54430), SRS7 (At1g19790) y SRS8 (At5g33210); de *Populus trichocarpa* SHI1 (XP\_002310281), Ptr7 (XP\_001783671); de *Physcomitrella patens* Ppa1 (XP\_001783671); y de *Zea mays* SHI (B6TUV8) y LRP1 (B6T347).

Para la construcción del árbol filogenético de OstCRC (GU583852) y secuencias similares, se utilizó como base el alineamiento realizado por Toriba et al. (2007) cuyas secuencias pertenecen a las siguientes especies y tienen los siguientes números de acceso: *A. thaliana* CRC (At1g69180), *A. thaliana* FIL (At2g45190), *A. thaliana* YABBY2 (At1g08465), *A. thaliana* YABBY3 (At4g00180), *A. thaliana* YABBY5 (At2g26580), *A. thaliana* INO (At1g23420), *A. trichopoda* AmbF2 (AB168113), *A. trichopoda* AmbF1 (AB126654), *A. trichopoda* A (AJ877257), *A. majus* A (AJ559642), *A. majus* B (AYU451400), *A. majus* C (AJ808095), *A. majus* GRAM (AJ804783), *A. majus* PROL (AJ559762), *A. officinalis* A (CV289440), *C. flexuosa* A (AY854798), *Chrysanthemum* (AY173066), *C. sinensis* A (CN185168), *C. sinensis* B (CK935155), *C. sinensis* C (CK933417), *C. sparsifolia* A (AY854803), *C. rumphii* A (CB093758), *G. max* A (AW620722), *G. max* B (BF597047), *G. hirsutum* (AY854805), *H. centranthoides* (CB088054), *H. vulgare* A (BM374129), *H. vulgare* B (BI949633), *H. vulgare* C (BI948348), *L. africanum* (AY854802), *S. lycopersicum* A (SGN-U213463), *S. lycopersicum* B (SGN-U216251), *S. lycopersicum* C (SGN-U219329), *Malus* (CV631928), *N. alba* NaINO (AB092980), *N. tabacum* A (AY854800), *N. advena* A (CD472928), *O. sativa* OsYABBY1 (AB274013), *O. sativa* OsYABBY2 (AB274014), *O. sativa* OsYABBY3 (AB274015), *O. sativa* OsYABBY4 (AB274016), *O. sativa* OsYABBY5 (AB274017), *O. sativa* OsYABBY6 (AB274018), *O. sativa* OsYABBY7 (AB274019), *O. sativa* DL

(AB106553), *Mentha* (AW255624), *Petunia* (AY854801), *P. sitchensis* (DR517093), *P. taeda* (DR100835), *P. tremula* A (BU864185), *S. henryi* A (DT595147), *S. bicolor* A (BG048485), *S. bicolor* B (BG239844), *S. tuberosum* A (BQ117114), *S. tuberosum* B (BQ516639), *S. tuberosum* C (CV504351), *T. aestivum* A (CD929523), *T. aestivum* B (CD929734), *T. aestivum* TaYAB1 (AAQ93323), *V. vinifera* A (DT026152), *W. mirabilis* (CV004246), *Z. aethiopica* A (AJ700396), *Z. mays* A (DR811993), *Z. mays* B (BM079829), *Z. mays* C (DV539137), *Z. mays* D (DR808200), *Z. mays* ZYB9 (AY31390), *Z. mays* ZYB10 (AY313904), *Z. mays* ZYB14 (AY313901).

Los números de acceso utilizados en el alineamiento y árbol filogenético de OstTSL (GU583851) y secuencias relacionadas fueron: de *A. thaliana* TSL (At5g20930); de *O. sativa* OsaTLK (AAL58952); de *Triticum aestivum* TaeTLK (AY847708); de *Nicotiana glutinosa* NglTLK (AAM94621); de *Zea mays* ZmaTLK1 (T001185) y ZmaTLK4 (T001186); de *Danio rerio* DrepKUa (AAK52417) y DrepKUb (AAK52418); de *Homo sapiens* HsaTLK (AAH32657), HsaTLK1 (NP\_036422), HsapKUa (BAA20561) y HsapKUb (BAA20562); de *Mus musculus* MmuTLK (AAC02226) y MmuTLK1 (NP\_766252); de *C. elegans* CelTLK (S40704); y de *D. melanogaster* DmelTLK (AAD55423).

### Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

El RNA total aislado de estilos de diferentes etapas de desarrollo de flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala* se utilizó para realizar reacciones de RT-PCR en dos pasos. Para la transcripción reversa, en un tubo nuevo de 0.2 ml se agregó lo siguiente:

REACTIVO	CANTIDAD
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µl
Oligonucleótido dT(T) <sub>17</sub> 10 µM	2 µl
RNA templado	—
H <sub>2</sub> O	—
Volumen Total	10 µl

Los componentes de mezclaron y brevemente se centrifugaron para colectarlos en el fondo del tubo, se incubaron a 70°C por 10 minutos y luego se pusieron en hielo. Posteriormente se añadió:

REACTIVO	CANTIDAD
10x M-MLV Amortiguador de Transcriptasa Reversa	2 $\mu$ l
M-MLV Transcriptasa Reversa	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	—
Volumen Final	20 $\mu$ l

La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego a 37°C por 50 minutos. Para desnaturalizar a la M-MLV RT se incubaron los tubos a 85°C por 10 minutos. El cDNA recién sintetizado se almacenó a -70°C hasta su utilización.

El PCR se llevó a cabo con los siguientes componentes:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Oligonucleótido 1	0.5 $\mu$ M
Oligonucleótido 2	0.5 $\mu$ M
dNTPs 10 mM	0.2 mM
Amortiguador PCR 10x	1x
Taq DNA Polimerasa	2 u
DNA Molde	---
Volumen Final	25 $\mu$ l

en las siguientes condiciones:

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	94°C	5 minutos
Amplificación –35 ciclos–		
a) Desnaturalización	94°C	15 segundos
b) Alineamiento	60°C (OstTSL y OstUBQ) 55°C (OstSTY y OstCRC)	30 segundos
c) Elongación	72°C	1 minuto
Elongación final	72°C	7 minutos

Las reacciones de RT-PCR se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron mediante luz UV. El análisis de expresión de los genes incluyó además la realización de reacciones de PCR utilizando un gen para corroborar que se estuvieran utilizando cantidades similares de cDNA. El gen utilizado fue el de la ubiquitina (OstUBQ) con los siguientes oligonucleótidos degenerados: 5'ATGCAGATCTTCGTGAARACCCTRACGGG y

5'ACGTAGGTGAGDCCRCCTTRCCRCAGTA. Todos los productos de RT-PCR fueron subclonados y secuenciados, como se describió anteriormente.

### **Extractos de proteína total de estilos de *O. stenopetala***

Estilos de flores masculinas y estilo-estigma de flores femeninas se congelaron con nitrógeno líquido y se trituraron con pistilo en un mortero para finalmente ser homogenizados en un amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; NaCl 100 mM; Tritón X-100 1% v/v;  $\beta$ -mercaptoetanol 1% v/v; inhibidores de proteasas – ROCHE) utilizando 5 ml del amortiguador por gramo de tejido. Posteriormente, el homogenizado se centrifugó 5 minutos a 3,000 g a 4°C, se recuperó el sobrenadante el cual se centrifugó por 20 minutos a 7,700 g a 4°C, se separó la fase soluble de cada extracto y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **Cuantificación de la proteína total**

La cantidad de proteína total se determinó utilizando el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (SIGMA) como patrón. La cuantificación se hizo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

### **Anticuerpos policlonales contra OstTSL**

De la secuencia obtenida de OstTSL se eligió la región correspondiente a los aminoácidos NKRTQKIIHYDLKP, los cuales conforman una zona altamente hidrofílica según la escala de Kyte y Dolittle (1982). Dicho péptido se utilizó para la generación de anticuerpos policlonales contra la proteína OstTSL realizado por la compañía SIGMA-ALDRICH. La titulación del anticuerpo se realizó realizando ensayos de inmunodetección tipo Western-blot con diferentes diluciones en solución de bloqueo.

### **Inmunodetección de OstTSL**

Para estos ensayos, se utilizaron los extractos de proteína total de estilos de flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala*, los cuales se separaron electroforéticamente en geles SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida

con SDS) al 12.5% y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 50 minutos a 75 mA en un sistema semihúmedo. La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó (leche descremada 5% v/v en PBS 1x; Tween-20 0.1% v/v) durante una hora a temperatura ambiente con suave agitación constante, posteriormente se sumergió la membrana en solución de bloqueo fresca con el anticuerpo primario diluido (Anti – OstTSL 1:30,000) y se incubó por 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con suave agitación constante. A continuación se lavó la membrana con PBS 1x – Tween-20 0.1% v/v, durante 5 y 10 minutos y luego se incubó en solución de bloqueo fresca con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina con una dilución de 1:10,000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS 1x – Tween-20 0.1% v/v, durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente, luego se incubó la membrana durante 10 minutos en amortiguador pH 9.5 (Tris HCl 100 mM; NaCl 0.58% v/v; MgCl<sub>2</sub> 0.1% v/v; ajustar pH a 9.5) y luego se reveló sumergiendo la membrana en solución de revelado [50 µl de nitrotetrazolio azul 33 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) al 70%; 50 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato 17 mg/ml en DMSO; ambos disueltos en amortiguador pH 9.5].

### **Clonación y sobreexpresión del fragmento del cDNA OstTSL**

Con el propósito de sobreexpresar a la proteína recombinante OstTSL se realizó una reacción de PCR con los oligos 5' CGCGAATTCGCCAAAATCCGTCAGTTTAGCTACTCC y 5' CGCGGATCCATTGAATACTGCAGTGGGAAG, los cuales contienen a los sitios de restricción para las enzimas EcoRI (subrayado doble) y BamHI (subrayado) respectivamente. El producto de PCR se ligó al vector pGEM-T-Easy (Promega) y clonado en células de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Una vez seleccionadas las clonas transformantes, se procedió a la purificación del DNA plasmídico y corroboración de la inserción por reacciones de digestión.

El fragmento insertado en el vector pGEM-T-Easy se liberó con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y posteriormente se clonó en el vector de expresión pGEX 4T-2 (Amersham Biosciences). El vector tipo pGEX está diseñado para que los polipéptidos que se expresan estén fusionados al extremo carboxilo de la glutatión-

S-transferasa (GST), una proteína citoplasmática común en eucariontes, lo cual idealmente permitirá la purificación de la proteína en condiciones no desnaturizantes. El sitio de restricción *Bam*HI permite la conservación del marco de lectura entre el último codón del extremo carboxilo terminal de la GST y el primero del amino terminal de la proteína a fusionar (OstTSL); el sitio de restricción *Eco*RI permite que el cDNA se inserte direccionalmente en el plásmido además de la conservación del codón de término (TGA).

Las digestiones con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (New England Biolabs) tanto del plásmido pGEM-T-Easy con el inserto OstTSL como de pGEX 4T-2 (para linearizar el plásmido) se dejaron incubando a 37°C por dos horas, las muestras se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en presencia de bromuro de etidio. El DNA purificado del gel se ligó al vector de expresión utilizando una T4 DNA ligasa (Gibco BRL) incubando toda la noche a 4°C. La reacción de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5- $\alpha$  crecidas en presencia de ampicilina (100  $\mu$ g/ml). A partir de las células seleccionadas se aisló el DNA plasmídico y se corroboró la presencia del inserto mediante una reacción de digestión doble *Bam*HI y *Eco*RI. Los plásmidos positivos se utilizaron para transformar células competentes de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS, la cual contiene el gen *l* del bacteriófago T7 que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac* UV5, el cual es transcripcionalmente inducible con isopropiltiogalactósido (IPTG), un análogo no hidrolizable de la lactosa. Adicionalmente la cepa contiene el plásmido pLysS, el cual expresa a la lisozima T7 en el citoplasma bacteriano reprimiendo la expresión proteica en ausencia de inducción, de esta manera se evita la expresión de proteínas tóxicas. La lisozima T7 se une a la T7 RNA polimerasa inactivándola e inhibiendo la transcripción. Con la inducción con IPTG, la cantidad de T7 RNA polimerasa es suficiente para superar la inhibición por la lisozima (GST Gene Fusion System Handbook — GE Healthcare).

La inducción de la sobreexpresión se realizó de la siguiente manera: se tomaron 15  $\mu$ l de la cepa congelada a -70°C (con 15% de glicerol en medio LB) y se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina (concentración final 100  $\mu$ g/ml) y se dejó creciendo toda la noche con agitación constante a 37°C. De este cultivo se tomaron 50  $\mu$ l y se

pusieron en 1 ml de LB sin antibiótico hasta obtener una  $A_{600}$  de 0.5 a 0.7 (aproximadamente dos horas). El procedimiento se realizó por duplicado para tener un control de no inducción. A uno de los cultivos se le agrega IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubaron por dos horas más. Transcurrido el tiempo de inducción, se centrifugó el cultivo a 20,200 g por 3 minutos, el botón se resuspendió en 200  $\mu$ l de PBS 1x a 4°C (fracción de células resuspendidas). Las células se lisaron con ayuda de un sonicador (25 KHz por 30 segundos) y se centrifugó la muestra. El sobrenadante constituye la fracción soluble mientras que el botón se resuspendió en 100  $\mu$ l de PBS 1x a 4°C (fracción insoluble). Cada una de las fracciones del procedimiento de inducción y el control sin inducir, se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE, y mediante ensayos de inmunodetección.

### **Prueba de TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling)**

Para la prueba de TUNEL se disectaron estilos de flores masculinas y femeninas en diferentes etapas de desarrollo. La fijación se llevó a cabo utilizando formaldehído al 4% (v/v) en PBS 1x durante 12 horas a 4°C con vacío. Posteriormente el tejido se lavó con PBS 1x en tres ocasiones durante 10 minutos cada vez y se deshidrató con etanol en diferentes concentraciones (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% y 100% v/v) durante media hora cada uno. El tejido se colocó en el solvente Citrosolv por 15 minutos y luego en una mezcla de Paraplast (Leica):citrosolv 1:1 a 58°C durante toda la noche, para después pasarlos a Paraplast puro durante 48 horas a 58°C. Las muestras se colocaron en un cubo de cartulina y se cubrieron con Paraplast líquido esperando que solidificara a temperatura ambiente. Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo rotatorio a 7 ó 10  $\mu$ m de grosor y se montaron en portaobjetos Fisherbrand Superfrost® (Fisher Scientific). Los cortes se desparafinaron en una estufa a 60°C por 30 minutos y se colocaron en el sustituto de xileno Slide Brite (Biocare Medical) durante 10 minutos, se realizaron dos cambios. Los cortes luego se hidrataron con cambios de alcoholes (100%, 100%, 96%, 85% y 70% v/v) por cinco minutos cada uno para luego ser enjuagados con PBS 1x en tres ocasiones por tres minutos cada uno. Después de eliminar el exceso de PBS 1x,

los cortes se aislaron con un marcador Dako-Pen (DAKO) y se agregaron dos gotas de Proteinasa K (Proteinase K Ready-to-Use — DAKO) sobre los cortes y se incubaron a 35°C por 15 minutos. Los cortes se lavaron con PBS 1x tres veces por tres minutos cada vez y se realizó la prueba de TUNEL utilizando el kit *In situ Cell Death Detection Kit AP* (ROCHE). Sobre los cortes se aplicó la mezcla de reacción de TUNEL (50 µl del Vial 1 Solución de Enzimas y 450 µl del Vial 2 Solución de Marcaje) cubriendo la totalidad del corte, se incubó por 1.5 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Posteriormente se enjuagaron las muestras cinco veces con PBS 1x a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se montaron en medio de montaje (Fluorescent Medium — DAKO) mezclado con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole — ROCHE) 5:1. Las muestras se cubrieron con un cubreobjeto y se sellaron con barniz transparente, se mantuvieron a 4°C en la oscuridad hasta su observación en el microscopio confocal.

Para realizar el control positivo de la prueba de TUNEL, se siguió el mismo procedimiento mencionado anteriormente, con la diferencia de que en una de las muestras, se aplicaron 50 µl de solución de DNasa I [(15 µl de DNAsal — 10,000 U/ml, Sigma) en amortiguador de DNasa 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 2mM)] durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó la mezcla de reacción de TUNEL y se siguió el procedimiento descrito. Como control negativo, en lugar de la mezcla de reacción de TUNEL, se utilizaron 50 µl del vial 2, Solución de Marcaje (sin Solución de Enzimas, vial 1) y se incubó durante 1.5 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente en oscuridad, y después se siguió el procedimiento previamente descrito.

### **Microaplicaciones de auxina**

Para las microaplicaciones de auxina se utilizó ácido naftalenoacético (1-Naphthalenacetic acid —NAA — SIGMA) 100 µM disuelto en DMSO. Se probaron dos concentraciones finales de NAA: 5 y 25 µM añadidas a lanolina (SIGMA) con 2.5% de parafina líquida (SIGMA — concentración final de DMSO 97.5%) para crear una pasta de consistencia suave, la cual se utilizó para aplicarla sobre los estilos. El tratamiento control consistió únicamente de DMSO añadido a la lanolina con 2.5%

de parafina líquida. Se cortaron segmentos de tallos de individuos masculinos y femeninos que contenían botones florales en etapas de desarrollo temprano e intermedio, a estos botones se les removieron las partes apicales del perianto y los tépalos para exponer el estilo. La pasta de lanolina-NAA se aplicó en las partes apicales del estilo con ayuda de una espátula, los estilos se cubrieron con los restos del perianto previamente removido. Los segmentos de tallo con los botones florales tratados y no tratados (control), se trasladaron al invernadero. Las observaciones de los gineceos se realizaron después de mantener los cladodios de las plantas en condiciones de invernadero durante 7 días. Después de este tiempo, los botones se disectaron completamente para aislar los estilos y los restos de lanolina se removieron manualmente. Los estilos disectados se fijaron en FAA y tratados para ser observados en el MEB o para realizar cortes histológicos.

### **Inmunolocalización de ácido indol acético (IAA)**

Estilos de flores masculinas y femeninas en diversas etapas se disectaron y sumergidos en una solución acuosa de EDAC [1-ethyl-3-(dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide hydrochloride] al 3% durante 2 horas a 4°C. El EDAC se utiliza para entrecruzar el grupo carboxilo del IAA a las proteínas estructurales de las células vegetales y también sirve para conservar la antigenicidad del IAA a su anticuerpo (Shi *et al.*, 1993). Posteriormente el material se fijó en Paraformaldehído al 4% v/v en PBS 1x por 12 horas a 4°C. Las muestras se deshidrataron y embebieron en Paraplast como se describió anteriormente. Los cortes en micrótomo se realizaron entre 6 y 10 µm de grosor y se colocaron en portaobjetos Superfrost/Fisherbrand (Fischer Scientific).

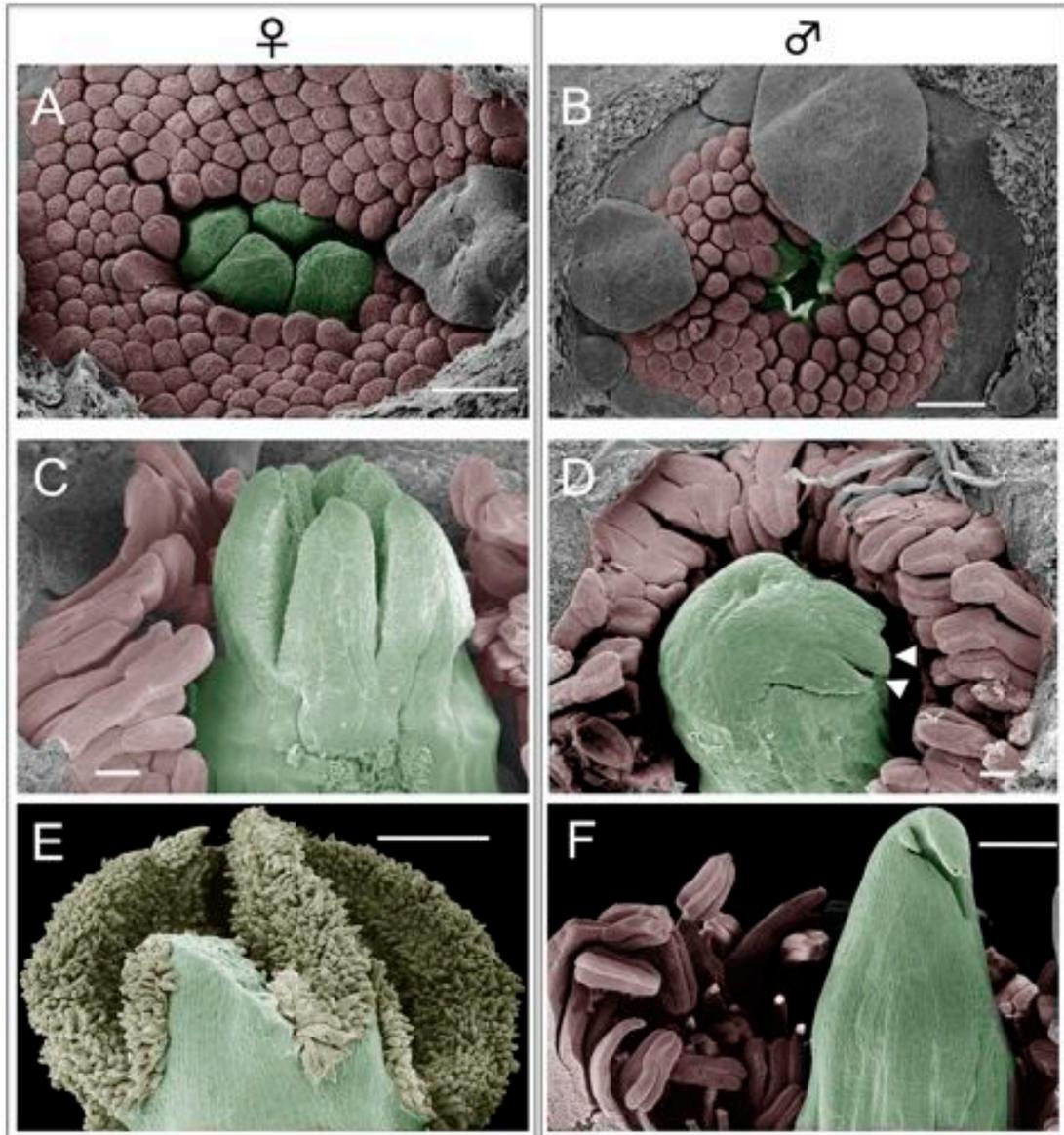
Para realizar la inmunolocalización, primero se desparafinó el material sumergiéndolo en SlideBrite durante 40 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se hidrataron los cortes en una serie gradual de etanol (100, 100, 96, 80, 70 y 50% v/v) durante diez minutos en cada uno. A continuación se colocaron los cortes en PBS 1x por 10 minutos en dos ocasiones y se bloquearon las secciones con solución de bloqueo (albúmina de suero bovino –BSA– 3%, Tritón X-100 0.1% v/v; en PBS 1x) durante 4 horas a 4°C. Después del bloqueo, se incubaron las secciones con

el anticuerpo primario  $\alpha$ -IAA (1:50 — SIGMA), diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Transcurrido el periodo de incubación, se hicieron dos lavados con PBS 1x de diez minutos cada uno a temperatura ambiente y luego se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 (1:200 — Invitrogen) durante 4 horas a 4°C en una cámara húmeda en oscuridad. Transcurrido este tiempo se lavaron los cortes con PBS 1x durante 10 minutos en tres ocasiones y se montaron con medio de montaje para fluorescencia Fluoromount (SIGMA) y se sellaron con barniz para uñas transparente. Las preparaciones se almacenaron a 4°C, aisladas de la luz, hasta su observación en el microscopio confocal (Olympus FV-1000).

## Resultados

### **Las flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala* inician su desarrollo siendo hermafroditas**

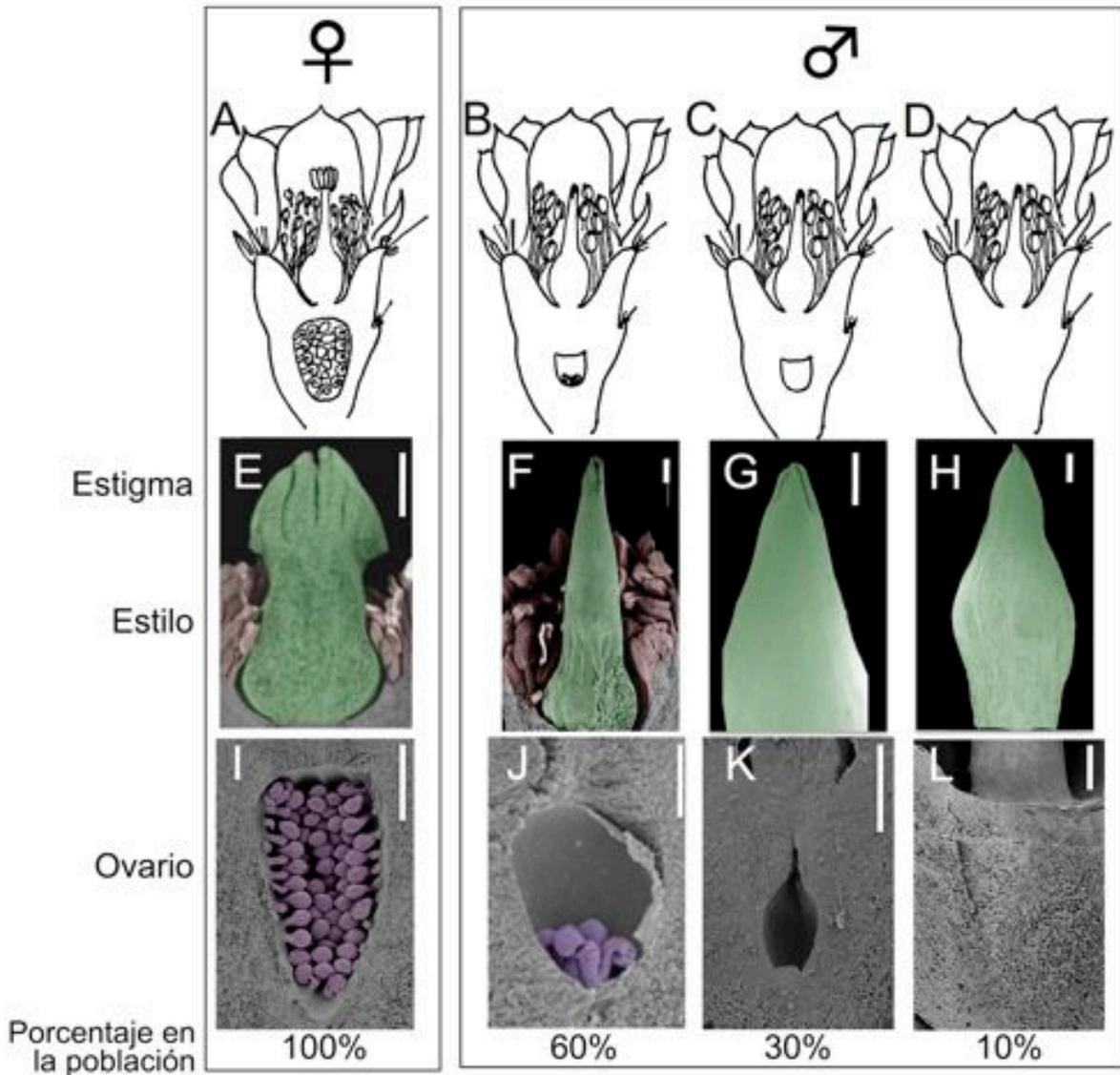
*Opuntia stenopetala* es una planta dioica, es decir, existen individuos que sólo producen flores masculinas e individuos que sólo producen flores femeninas. Para conocer el desarrollo de las flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala* se recolectaron botones florales en diversas etapas de desarrollo y se analizaron con ayuda del MEB. Durante las etapas tempranas de desarrollo, ambos tipos florales iniciaron el desarrollo de los órganos sexuales femeninos y masculinos haciendo a los botones florales prácticamente indistinguibles (Figuras 3A y 3B). En ambos se observó a los primordios carpelares al centro del botón, y alrededor de ellos, múltiples primordios estaminales. Durante la etapa intermedia de desarrollo son notables las diferencias morfológicas existentes en el grado de diferenciación. En el gineceo de las flores femeninas los primordios carpelares se fusionaron para dar origen al estilo, el cual en la parte apical divergió formando múltiples lóbulos estigmáticos (Figura 3C). En las flores masculinas también ocurrió la fusión de los primordios carpelares para dar origen al estilo; sin embargo, la divergencia del estilo para dar origen a los lóbulos estigmáticos es incompleta y sólo se observó la formación de diminutas divisiones en la parte apical, pero que no tienen morfología parecida a los lóbulos estigmáticos de las flores femeninas (Figura 3D). La parte correspondiente al androceo mostró características morfológicas muy similares durante esta etapa. Durante la etapa de desarrollo tardío las diferencias en el gineceo son fehacientes, en las flores femeninas los lóbulos estigmáticos se encontraron cubiertos de papilas estigmáticas (Figura 3E), mientras que el estilo de las flores masculinas no se dividió correctamente para originar los lóbulos estigmáticos ni se produjeron papilas estigmáticas (Figura 3F). En la antesis, el androceo presentó diferencias significativas, mientras que en las flores masculinas los estambres se desarrollaron hasta producir grandes cantidades de polen, el androceo de las flores femeninas se encontró colapsado, de menor tamaño y sin producción de granos de polen.



**Figura 3. Desarrollo de flores masculinas y femeninas en *O. stenopetala*.** (A y B) Etapas de desarrollo temprano. (A) Botones de flor femenina y (B) de flor masculina. Los primordios estaminales (rojo) rodean a los primordios carpelares (verde). En esta etapa ambos botones florales son prácticamente indistinguibles entre sí. (C y D) Etapas de desarrollo intermedio. En el botón floral femenino (C) se observa la diferenciación del ápice del gineceo (verde) en lóbulos estigmáticos, mientras que en el botón floral masculino (D) sólo hay bifurcaciones mínimas (cabezas de flecha). (E y F) Flores de etapas de desarrollo tardío. (E) En el gineceo de las flores femeninas se observa que los lóbulos estigmáticos han sido cubiertos con múltiples papilas estigmáticas (verde-gris). (F) En el gineceo (verde) de las flores masculinas no hay desarrollo de papilas estigmáticas ni de lóbulos estigmáticos. Los estambres de estas flores (rojo) son grandes productores de polen. Escalas: (A-D), 100  $\mu\text{m}$ ; (E, F), 500  $\mu\text{m}$ .

## Existen diferentes tipos de flores en las poblaciones de *O. stenopetala*

Como parte de la descripción de la población estudiada de *O. stenopetala*, se realizó un censo de la población para determinar el número de individuos masculinos y femeninos y se describió la morfología de las flores masculinas y femeninas en anthesis (Figuras 4A–4D). Un total de 98 plantas con flores se encontraron formando la población estudiada. Con base en las características florales, se determinó que 60 plantas eran masculinas y 38 plantas femeninas. Las plantas femeninas produjeron únicamente flores femeninas (Figura 4A) con gineceo bien desarrollado, formado por un estigma dividido en varios lóbulos, cada uno de ellos cubierto con múltiples papilas estigmáticas (Figura 4E). Por debajo del estigma se encontró un estilo semi-sólido que es sostenido por el ovario que contiene una gran cantidad de óvulos funcionales (Figura 4I). Los estambres de las flores femeninas permanecieron por debajo de los lóbulos estigmáticos, aunque se trató de estambres completos formados por filamento y antera, fueron estambres estériles pues no producen granos de polen. Todas las flores femeninas analizadas presentaron morfología similar a la descrita. El análisis de las flores masculinas reveló que no todas las flores de este sexo son morfológicamente iguales, se lograron identificar tres tipos de flores masculinas cuyas diferencias se presentaron a nivel del ovario (Figuras 4B–4D). Sin embargo, los tres morfos identificados compartieron la característica de desarrollar un estilo carente de tejido estigmático (Figuras 4F–4H). El morfo floral más abundante, denominado tipo floral I (Figura 4B), presentó un ovario reducido en tamaño y con óvulos únicamente en la base del ovario (Figura 4J). Dichos óvulos, presentaron un desarrollo incompleto, la formación de tegumentos es el punto máximo de desarrollo observado en estos óvulos, aunque frecuentemente los óvulos permanecieron sólo como primordios de óvulos indiferenciados. El tipo floral II (Figura 4C), con menor abundancia que el tipo I, presentó un ovario vacío (Figura 4K), es decir, sólo se encontró la cámara del ovario pero no se desarrolló ningún óvulo en ella. El morfo floral menos abundante, el tipo III (Figura 4D), presentó una reducción dramática del ovario, el cual fue prácticamente inexistente y sólo perduró una ligera abertura semejante a una cicatriz, en la cual no se desarrollaron óvulos (Figura 4L).



**Figura 4. Morfos florales encontrados en la población estudiada de *O. stenopetala*.** (A–D) Representación esquemática del único morfo floral femenino encontrado (A) y de los tres diferentes morfos florales masculinos (B–D). (E–L) Imágenes del MEB del gineceo de las flores femeninas (E, I) y del gineceo de las flores masculinas (F–H, J–L). (E) Gineceo de flor femenina (verde) y estambres no funcionales (rojo). (F–H) Gineceo de flor masculina (verde) mostrando la carencia de tejido estigmático y estambres funcionales (rojo). (I) Ovario de flor femenina mostrando múltiples óvulos (violeta). (J) Ovario encontrado con mayor frecuencia en la población (cerca del 60%) mostrando tamaño reducido en comparación con el ovario femenino y óvulos sólo en la base. (K) Ovario de flor masculina mostrando tamaño reducido, pero ausencia de óvulos. Se encuentra en aproximadamente 30% de individuos. (L) Fenotipo de ovario de flor masculina menos frecuente (alrededor del 10%), el cual se encuentra prácticamente cerrado y sin desarrollo de óvulos. Entre 5 y 6 flores de cada individuo, ( $n=98$  individuos) fueron examinadas. Escalas: (E,I), 1 mm; (F–H), 200  $\mu\text{m}$ ; (J–L), 500  $\mu\text{m}$ .

## **Las diferencias morfológicas del gineceo también se presentan a nivel histológico**

Para determinar si las diferencias morfológicas entre gineceos se encontraban únicamente en la parte exterior, o bien, si existen mayores diferencias, se analizaron los estilos de flores masculinas y femeninas de flores en antesis a través de cortes histológicos transversales y se realizó un análisis comparativo. Para esto se dividió al estilo en tres regiones: la basal o parte más cercana al ovario, la región media y la región apical correspondiente al estigma.

La región basal de los estilos provenientes de flores femeninas (Figura 5A) presentó en su parte más externa una epidermis monoestratificada bien diferenciada; hacia el centro se ubicaron varios estratos de parénquima caracterizados por ser células con forma hexaédrica, inmersas entre este estrato parenquimatoso se encontraron múltiples células mucilaginosas cuyo contenido provocó una tinción más intensa. En posición central se hallaron múltiples haces vasculares muy bien definidos y al centro del estilo el tejido de transmisión rodeando al canal estilar, que en este nivel se encontró casi completamente cerrado y formando una especie de cicatriz. En la región basal de los estilos de flores masculinas (Figura 5D) de forma similar a la base del estilo de las flores femeninas, se observó una epidermis monoestratificada, varios estratos de córtex parenquimatoso y un canal estilar casi cerrado por completo. Las diferencias entre estilos radicaron en que la base del estilo de flores masculinas posee un número considerablemente mayor de células mucilaginosas, además de que estas presentaron mayor tamaño que las células mucilaginosas de la base del estilo de las flores femeninas. Otra diferencia se encontró en los haces vasculares y el tejido de transmisión, en ambos casos, en el estilo de las flores masculinas estos no se hallan totalmente desarrollados ni diferenciados, de hecho, el tejido de transmisión no fue fácilmente apreciable. Los haces vasculares no se encontraron diferenciados en el mismo grado que los haces vasculares de los estilos de las flores femeninas.

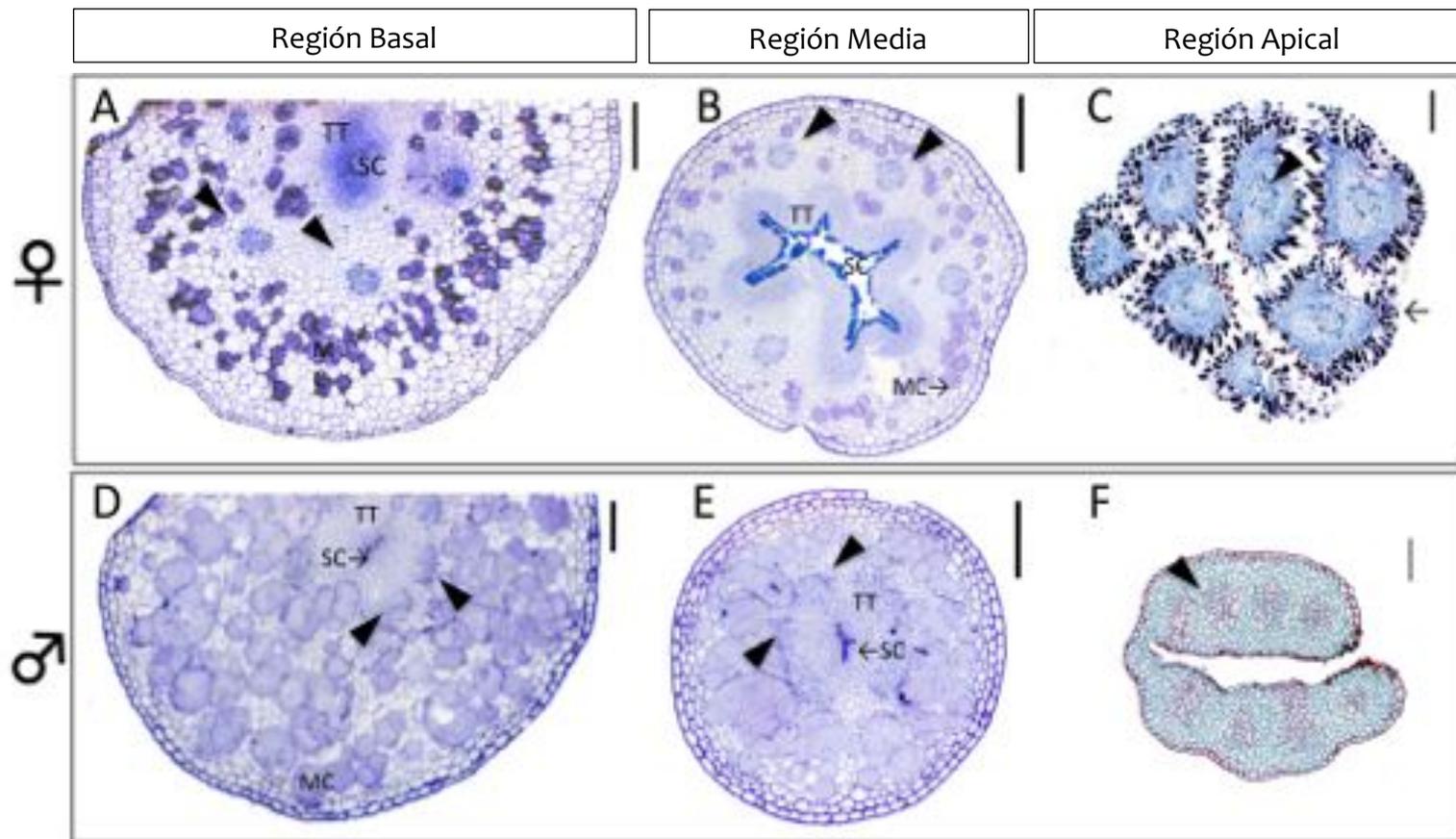
La región media del estilo de las flores femeninas (Figura 5B) presentó epidermis monoestratificada, córtex de múltiples estratos con pequeñas células mucilaginosas entremezcladas. Inmerso en el córtex también se hallaron los haces vasculares

perfectamente definidos. Hacia el centro del estilo se identificó el tejido de transmisión formado por células muy pequeñas que permiten que la clara distinción del córtex parenquimatoso. El tejido de transmisión rodea al canal estilar que en este nivel alcanza su amplitud máxima. Alrededor del canal estilar se detectaron células cuyo citoplasma se tiñe densamente y cuya actividad presumiblemente sea secretora. Las características de la región media del estilo de las flores masculinas (Figura 5E) se mostraron prácticamente idénticas a las de la parte basal del estilo: epidermis monoestratificada, grandes células mucilaginosas inmersas en el córtex parenquimatoso y poca diferenciación del tejido de transmisión y de los haces vasculares. El canal estilar se identificó como un tipo de cicatriz central y permaneció completamente cerrado.

La región apical de los estilos fue la más divergente. Los estilos de las flores femeninas en el ápice (Figura 5C) se bifurcaron para dar origen a los lóbulos estigmáticos. Cada lóbulo estigmático se encontró formado por tejido parenquimatoso y un haz vascular, cubierto por papilas estigmáticas cuyas células se tiñeron densamente por lo que probablemente tengan actividad secretora. Por otra parte, el ápice de los estilos de flores masculinas (Figura 5F) no presentó formación de estructuras estigmáticas, por el contrario, se observó que en esta zona el estilo no se fusiona por completo. Aunque se lograron distinguir haces vasculares, no existen papilas estigmáticas y sólo se observaron unas pocas células cuyo citoplasma se tiñe densamente, aunque estas sólo se ubican en una pequeña zona dentro del ápice del estilo.

### **Los cDNAs de *O. stenopetala* tienen homología con los genes *TSL* y *STY* de *A. thaliana***

En la búsqueda de los genes que podrían estar afectados en el gineceo en las flores de las plantas masculinas de *O. stenopetala*, se realizó una selección de genes reportados con actividad durante el proceso morfogénico del gineceo. Una descripción detallada de dicho proceso y la identificación de algunos genes involucrados, se ha realizado en la planta modelo *A. thaliana* (ver Ferrándiz *et al.*, 1999; Balanzá *et al.*, 2006; Irish, 2010).



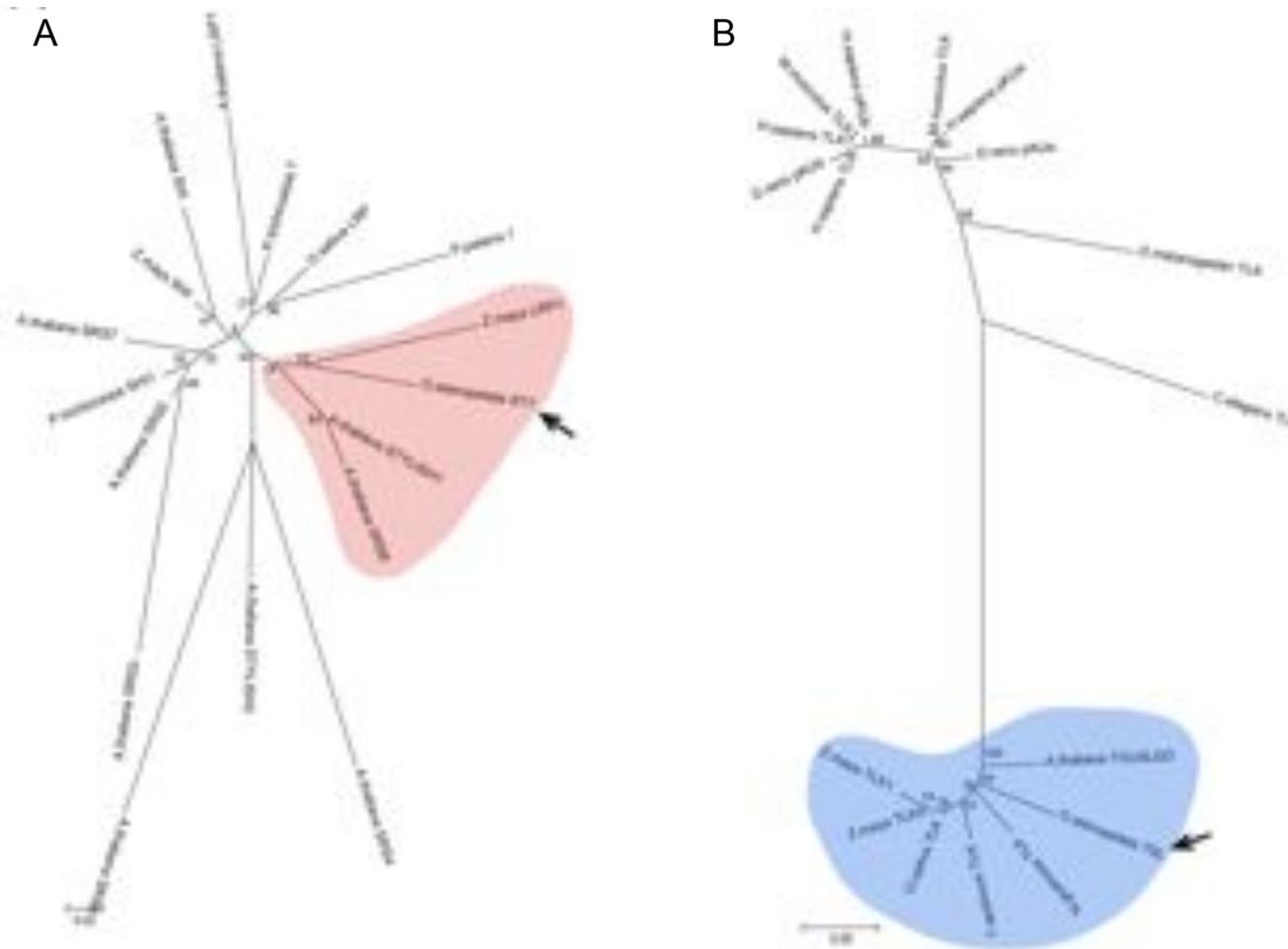
**Figura 5. Diferencias histológicas entre los estilos de flores masculinas y de flores femeninas de *O. stenopetala*.** (A–C) Estilos de flores femeninas. (A) Corte histológico de la región basal del estilo. El canal estilar es muy angosto, las células de mucilago se tiñen más densamente. (B) La región media del estilo presenta mayor abertura del canal estilar, tejido de transmisión fácilmente diferenciable, haces vasculares bien desarrollados. (C) Región apical del gineceo formada por múltiples lóbulos estigmáticos cubiertos de papilas estigmáticas (flecha). (D–F) Estilos de flores masculinas. (D) Corte histológico de la región basal. Se observa el canal estilar cerrado, tejido de transmisión reducido, haces vasculares poco diferenciados y gran cantidad de células mucilaginosas. (E) Región media del estilo, se observan las mismas características que la región basal. (F) Región apical del estilo, se observa ausencia total del tejido estigmático y que los carpelos no se han fusionado completamente. CE–canal estilar, TT–tejido de transmiisión, CM–célula mucilaginoso, las cabezas de flecha señalan la posición de los haces vasculares. Escalas: (C, F), 100  $\mu\text{m}$ ; (A, B, D, E), 200  $\mu\text{m}$ .

De los múltiples genes que se han descrito, *STYLISH*, *TOUSLED* y *CRABS CLAW* fueron los genes de interés para este trabajo debido a los fenotipos mostrados en plantas mutantes de *A. thaliana*. En todos los casos, el desarrollo del estilo se encontraba afectado (Kuusk *et al.*, 2002; Roe *et al.*, 1993; Alvarez y Smith., 1999). Bajo la premisa de que estos genes pudieran tener funciones conservadas en el proceso de desarrollo del estilo en las angiospermas y que además sus secuencias también se encuentran conservadas, se procedió al alineamiento de las secuencias reportadas para estos genes en diferentes especies (ver Anexo 1). En estos alineamientos se identificaron las regiones de mayor conservación, y a partir de ellas, se diseñaron oligonucleótidos degenerados para poder amplificar secuencias similares de *O. stenopetala* mediante PCR.

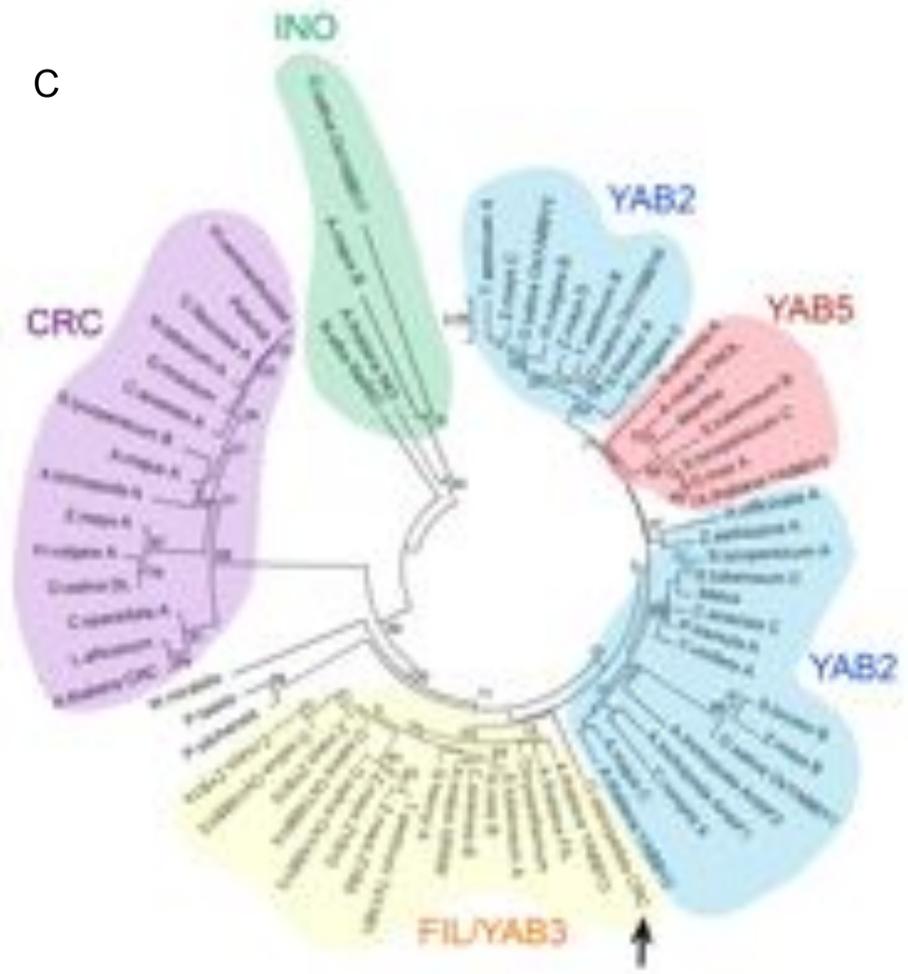
El árbol filogenético obtenido para la secuencia de OstSTY (*O. stenopetala* STY — Figura 6A) mostró que esta secuencia se agrupa con la secuencia LRP1 de maíz y con las secuencias de *A. thaliana* STY1 y SRS8. La secuencia LRP1 de maíz no ha sido caracterizada y sólo se sabe que se expresa durante el desarrollo de la espiga femenina, a la fecha se desconoce su función. (Zhu *et al.*, 2009). SRS8 es aparentemente un pseudogen ya que no se logró amplificar la misma secuencia mediante RT-PCR (Eklund, 2009). El agrupamiento de OstSTY y STY1 en el mismo clado, sugiere fuertemente que se tratan de genes homólogos en ambas especies.

En el análisis filogenético de las secuencias TSL y tipo TSL (Figura 6B), se observó la formación de dos grandes clados, el clado que agrupó a las secuencias tipo Tousled que provienen de animales, y el clado que agrupó a las secuencias provenientes de plantas, entre las cuales se encontró la secuencia de *O. stenopetala* OstTSL. Este resultado nos permite proponer que OstTSL es un homólogo verdadero de TSL.

En el árbol filogenético de OstCRC (*O. stenopetala* CRC) y de los miembros de la familia génica YABBY (Figura 6C), se observó el agrupamiento de nuestra secuencia en el clado en donde se ubicaron los miembros de *A. thaliana* FIL y YAB3 y que le dan nombre al clado (Toriba *et al.*, 2007). La secuencia CRC, que es la que se ha involucrado directamente con el desarrollo del gineceo (Alvarez y Smyth, 1999; Alvarez y Smyth, 2002) se agrupó en otro clado, distante de OstCRC, por lo que



**Figura 6. Análisis filogenético de las secuencias OstSTY, OstCRC y OstTSL de *O. stenopetala*.** (A) Árbol filogenético de las secuencias de proteínas correspondientes a la familia génica *SH1/STY* y de secuencias relacionadas. El árbol fue construido utilizando la región de la secuencia correspondiente al dominio dedos de zinc característico de la familia. (B) Árbol filogenético de las secuencias proteicas de TSL y proteínas TLK relacionadas. El análisis se realizó con el alineamiento de la secuencia correspondiente al dominio catalítico de cinasa. Las relaciones evolutivas de los árboles fueron inferidas por el método de *Neighbor-Joining* con 1000 réplicas de *bootstrap*. Las abreviaciones utilizadas y los números de acceso de las secuencias se encuentran en la sección de materiales y métodos. Las secuencias obtenidas de *O. stenopetala* están marcadas con una flecha.



**Figura 6. (CONTINUACIÓN). Análisis filogenético de las secuencias OstSTY, OstCRC y OstTSL de *O. stenopetala*.** (C) Árbol filogenético de las proteínas de la familia génica YABBY y proteínas relacionadas. Se alinearon las regiones de secuencia correspondientes al dominio YABBY y al dominio dedos de zinc. Las relaciones evolutivas de los árboles fueron inferidas por el método de *Neighbor-Joining* con 1000 réplicas de *bootstrap*. Las abreviaciones utilizadas y los números de acceso de las secuencias se encuentran en la sección de materiales y métodos. Las secuencias obtenidas de *O. stenopetala* están marcadas on una flecha.

proponemos que la secuencia obtenida no es ortóloga de CRC, aunque si pertenece a la familia génica YABBY.

### ***OstTSL* y *OstSTY* se expresan diferencialmente en los estilos de flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala***

Para conocer el patrón de expresión de los genes estudiados en distintos órganos de *O. stenopetala*, se aisló RNA de diferentes tejidos, no reproductivos y reproductivos. El tejido no reproductivo utilizado fueron segmentos de cladodio de plantas previamente identificadas como femeninas o masculinas; y como tejidos reproductivos se utilizaron botones florales de etapas tempranas del desarrollo, o bien estambres y gineceos provenientes de flores femeninas o masculinas. Es importante aclarar que aunque se hace referencia al gineceo, únicamente se utilizó la parte del estilo y del estigma de las flores femeninas y la parte del estilodio de las flores masculinas. Salvo que se especifique, en ninguno de los casos la parte correspondiente al ovario se tomó en cuenta para el análisis, debido a que la variación fenotípica encontrada en las flores masculinas sugiere que el mecanismo molecular o involucrado en el cese del desarrollo de ovario y óvulos, difiere entre morfos florales. Por otra parte el estilo carente de estigma de las flores masculinas, es una característica constante que sugiere que la reducción del tejido estilar y estigmático es un proceso controlado por el mismo mecanismo molecular en los tres morfos florales masculinos. Con el RNA aislado, se realizaron reacciones de RT-PCR las cuales se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

Los tamaños aproximados esperados de los cDNAs parciales fueron: para *OstTSL* 300 pares de bases (pb), para *OstSTY* 120 pb, para *OstCRC* 350 pb y para *OstUBQ* 450 pb. En la figura 7A se observó que el cDNA de *OstTSL* se amplificó en los distintos tipos de tejidos probados. En tallo y en estambres se observó DNA amplificado, independientemente de si el tejido provenía de un individuo masculino o femenino. Además, la intensidad de las bandas fue muy similar comparando tejido masculino con el femenino. Sin embargo, cuando se analizó el patrón de amplificación de *OstTSL* en botones florales y en gineceo, en ninguno de los casos se logró detectar amplificación cuando se utilizó el tejido de plantas masculinas, por el contrario,

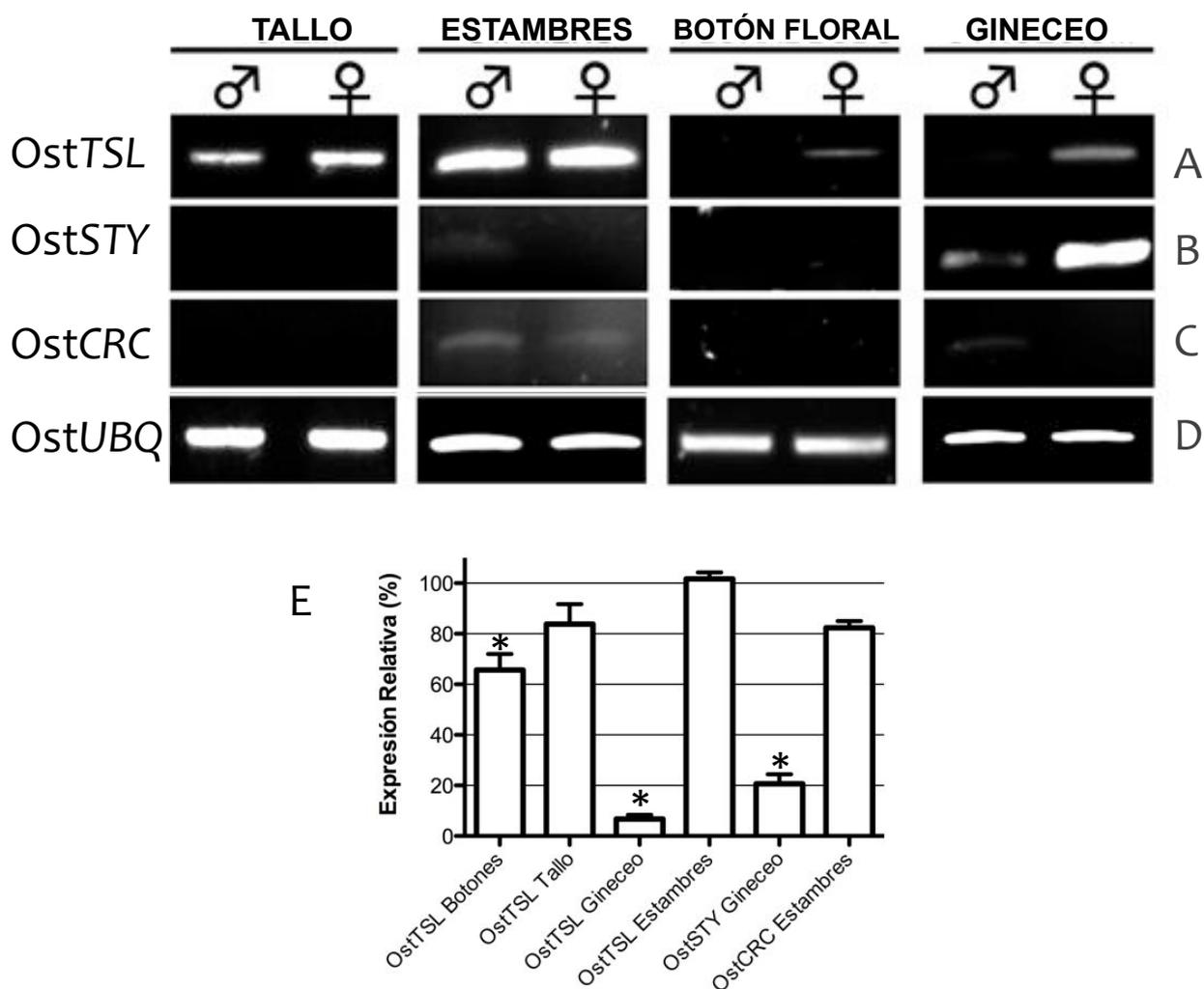
cuando se usó mRNA de tejidos de plantas femeninas se observaron fragmentos de DNA de tamaño esperado.

En el caso de *OstSTY*, este se detectó sólo en el gineceo (Figura 7B), tanto de las flores femeninas como de las flores masculinas. De forma notable, la amplificación observada en el gineceo de las flores femeninas es mucho más intensa que la observada en las flores masculinas.

El transcrito *OstCRC* se detectó en los estambres provenientes de flores masculinas y femeninas y en el gineceo de las flores masculinas (Figura 7C). En los estambres la acumulación de transcrito resultó ser muy similar entre ambos sexos, mientras que en el gineceo de las flores masculinas, aunque se detectó muy ligera acumulación de transcrito, en el gineceo de las flores femeninas no se logró amplificar un cDNA. Tampoco se logró detectar amplificación en los botones florales ni en los tallos, sin importar si provenían de individuos masculinos o de individuos femeninos.

Como control interno para asegurar igualdad en la carga de RNA para las reacciones de RT-PCR, se utilizaron reacciones de amplificación del mRNA de la ubiquitina (*OstUBQ* — Figura 7D).

Los patrones de expresión más interesantes resultado de este estudio, fueron los observados para *OstTSL* y *OstSTY*, asumiendo que la disminución en la acumulación de ambos transcritos en el gineceo de las flores masculinas, en comparación con el gineceo de las flores femeninas, se relaciona directa o indirectamente con la disminución de tejido estigmático y estilar en las flores masculinas. Por estas razones, se decidió ampliar la investigación sobre el papel de estos genes en el cese del desarrollo del gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*.



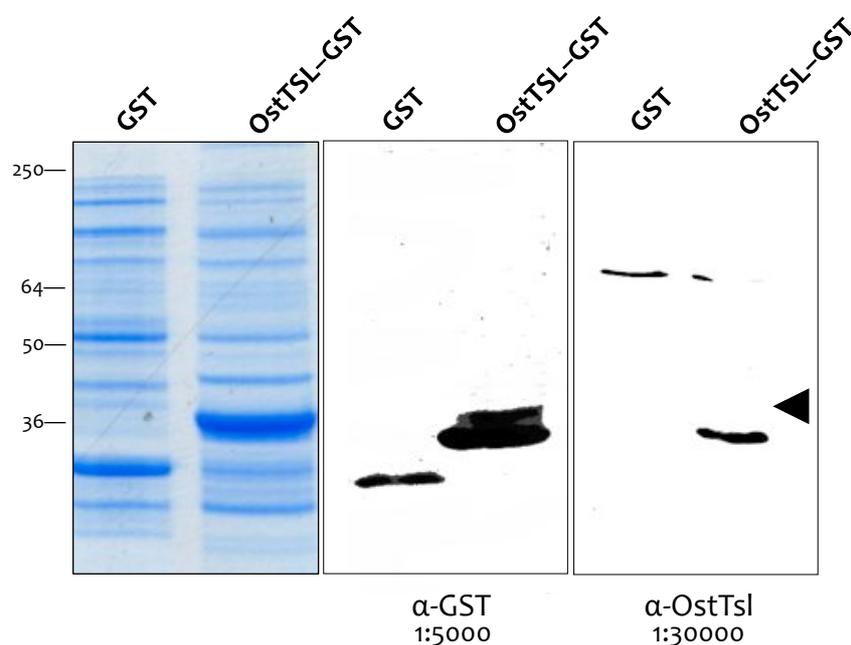
**Figura 7. Patrones de expresión de los genes *OstSTY*, *OstCRC* y *OstTSL* de *O. stenopetala*.** Análisis de expresión realizado por RT-PCR. **(A)** *OstTSL* mostró mayor acumulación de transcrito en el gineceo de flores femeninas y en los botones florales femeninos, comparado con sus contrapartes masculinas. **(B)** *OstSTY* mostró mayor acumulación en el gineceo de las flores femeninas. En los otros órganos analizados no fue detectado. **(C)** *OstCRC* se acumuló sólo en estructuras reproductivas, en estambres y gineceo, aunque en estos últimos, sólo en el gineceo de las flores masculinas. **(D)** Las reacciones de *OstUBQ* (Ubiquitina) fueron incluídas como control interno para asegurar cargado de RNA equitativo en las reacciones. **(E)** Cuantificación relativa de la intensidad de los productos amplificados. Los amplificadores provenientes de tejidos femeninos fueron tomados como 100% y los correspondientes valores de los tejidos masculinos fueron graficados como expresión relativa. Las barras de error indican el error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tejidos masculinos y femeninos ( $P < 0.05$ ). El análisis fue realizado mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey ( $n=3$ ).

## **Los niveles proteicos de OstTSL no difieren entre los estilos de flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala***

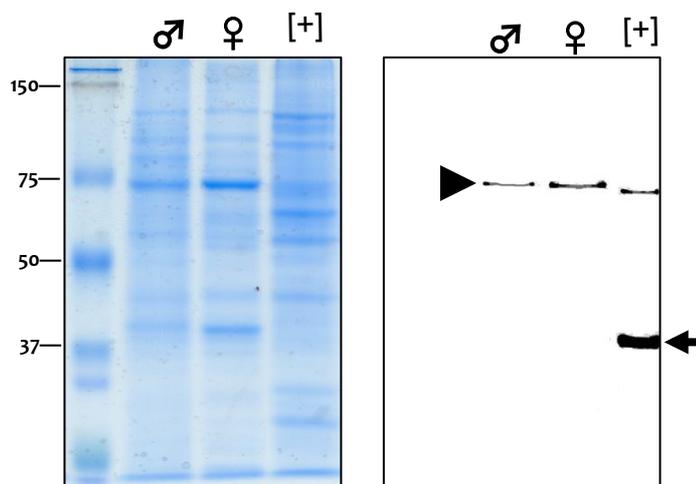
En *A. thaliana*, TSL se ha asociado con la coordinación del correcto crecimiento del gineceo (Roe *et al.*, 1993; Roe *et al.*, 1997) probablemente mediante la coordinación de la remodelación de la cromatina durante la mitosis (Han *et al.*, 2005; Richie y Golden, 2005; Wang *et al.*, 2006). La disminución en el transcrito de OstTSL en los estilos de las flores masculinas respecto a las flores femeninas, sugiere una disminución en la cantidad de proteína producida. De suceder lo anterior, la disminución en la actividad de OstTSL podría reflejarse en la interrupción del desarrollo de los estilos de las flores masculinas. Si dicha disminución detiene o demora la continuidad de las divisiones mitóticas en el estilo, también retrasaría el proceso de diferenciación, afectando con ello la génesis de los diferentes tejidos propios del gineceo.

Para probar esta hipótesis, primero inspeccionamos los niveles de proteína OstTSL en los estilos de las flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala*. Para ello, se prepararon extractos de proteína total de ambos tipos de estilos provenientes de flores en anthesis, las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 12.5% y se analizaron por ensayos tipo Western blot. Para detectar a la proteína OstTSL se utilizaron anticuerpos dirigidos contra una región hidrofílica de la proteína (NKRTQIIHYDLKP) con una dilución de 1:30,000. En la figura 8 se puede observar que el anticuerpo anti-OstTSL reconoció a la proteína recombinante OstTSL-GST sobre-expresada en *E. coli* de manera específica. La misma proteína es reconocida utilizando anticuerpos específicos anti-GST (Figura 8).

Con el anticuerpo anti-OstTSL se inmunodetectó una banda de aproximadamente 75 kDa tanto en los extractos de proteína de estilos de flores masculinas como de estilos de flores femeninas (Figura 9). Esta masa molecular coincide con la reportada para otras proteínas tipo TSL de diferentes organismos, por ejemplo, TSL de *A. thaliana* tiene un peso molecular teórico de 78 kDa.



**Figura 8. Inmunodetección de la proteína recombinante OstTSL.** En el primer panel se muestra el gel teñido con azul de Coomasie con extractos de proteína total de *E. coli* sobreexpresando la proteína de fusión GST o la proteína recombinante OstTSL-GST. En el segundo panel se muestra la inmunodetección de la proteína recombinante OstTSL-GST de aproximadamente 35 kDa, utilizando un anticuerpo específico anti-GST. También se observa la detección de la proteína de fusión GST sola (29 kDa). En el panel de la derecha se observa la inmunodetección de la proteína Ost-TSL (cabeza de flecha) utilizando el anticuerpo específico anti-OstTSL. La proteína GST sola no es detectada. Los números de la izquierda representan la masa molecular en kDa.



**Figura 9. Inmunodetección de OstTSL en extractos de proteína total del gineceo de *O. stenopetala*.** Extracto de estilos masculinos (♂) y de estilos femeninos (♀). Como control positivo [+] se utilizó la proteína recombinante expresada en *E. coli*. El panel de la derecha muestra la detección de una sola banda en ambos extractos estilares de aproximadamente 75 kDa (cabeza de flecha) y de la proteína recombinante de 35 kDa (flecha). A la izquierda se muestra el gel teñido con azul de Coomasie. Los números representan la masa molecular en kDa.

El ensayo mostró que la cantidad de proteína OstTSL es muy similar en los extractos proteicos de estilos de las flores masculinas y los estilos de las flores femeninas en etapas tardías de desarrollo (Figura 9).

### **No hay señales de muerte celular programada en los estilos de flores masculinas de *O. stenopetala***

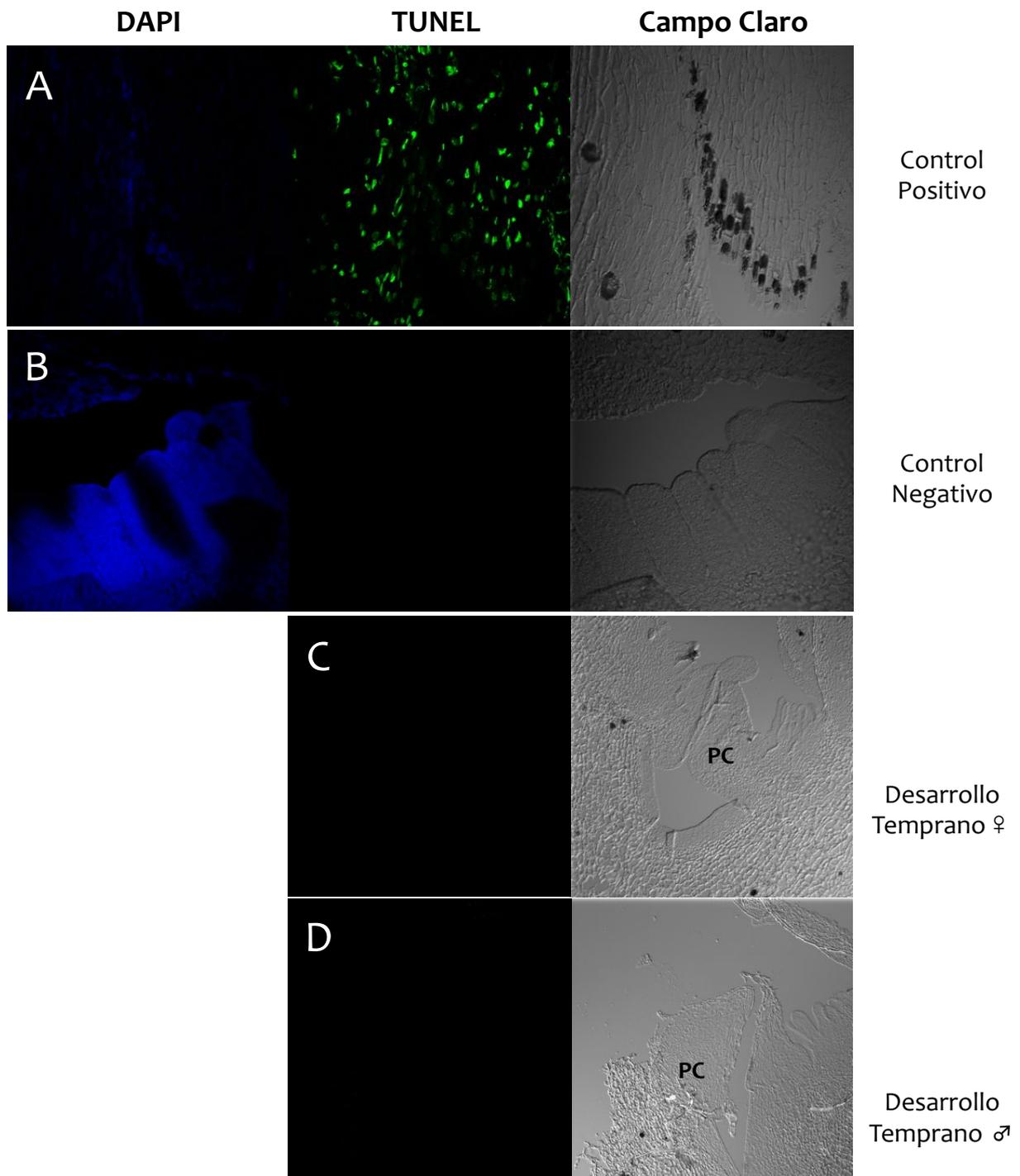
A pesar de que las cantidades de la proteína OstTSL resultaron semejantes en los estilos de plantas masculinas y femeninas, se decidió examinar si existían diferencias en las divisiones mitóticas de las células de los estilos. Esta posibilidad surge debido a que las plantas mutantes *tsl1-1* de *A. thaliana* presentan desarrollo reducido de los tejidos estilar y estigmático, probablemente debido a que TSL en las plantas con fenotipo silvestre, promueve las divisiones celulares que permiten un crecimiento coordinado de los primordios carpelares (Roe *et al.*, 1993; Roe *et al.*, 1997; Ehsan *et al.*, 2004). De cumplir un papel similar en los estilos de *O. stenopetala*, la disminución de su actividad podría comprometer el desarrollo de las divisiones mitóticas. Previo al proceso de división, la célula debe verificar que el DNA se encuentre sin daño, y de existir, repararlo adecuadamente. Cuando una célula no puede reparar el daño al DNA, es común que se activen los programas de muerte celular programada para evitar daños en la información genética, por lo que el ciclo celular no se completa (Gehring y Koty, 2005). El detenimiento o interrupción del ciclo celular es una característica común en células que eventualmente experimentan Muerte Celular Programada (MCP — Meikrantz y Schlegel, 1995). La posibilidad de que las células estilares de las flores masculinas estuvieran comprometidas en la continuidad del ciclo celular mitótico, se evaluó determinando la existencia de MCP. Si existen fallas en las divisiones mitóticas en los estilos de las flores masculinas, estas probablemente desencadenarían el proceso de MCP. Una de las características clave para determinar si se ha activado el proceso de MCP es determinar si existe fragmentación del DNA nuclear (Mittler y Lam, 1997; Danon y Gallois, 1998; McCabe y Leaver, 2000). La fragmentación de DNA en células individuales es posible detectarla a través de la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling), con los cuales se etiquetan los extremos 3'-OH libres del

ADN y son observados por fluorescencia. Los ensayos de TUNEL se realizaron en cortes histológicos del gineceo de flores masculinas y femeninas en diferentes etapas de desarrollo.

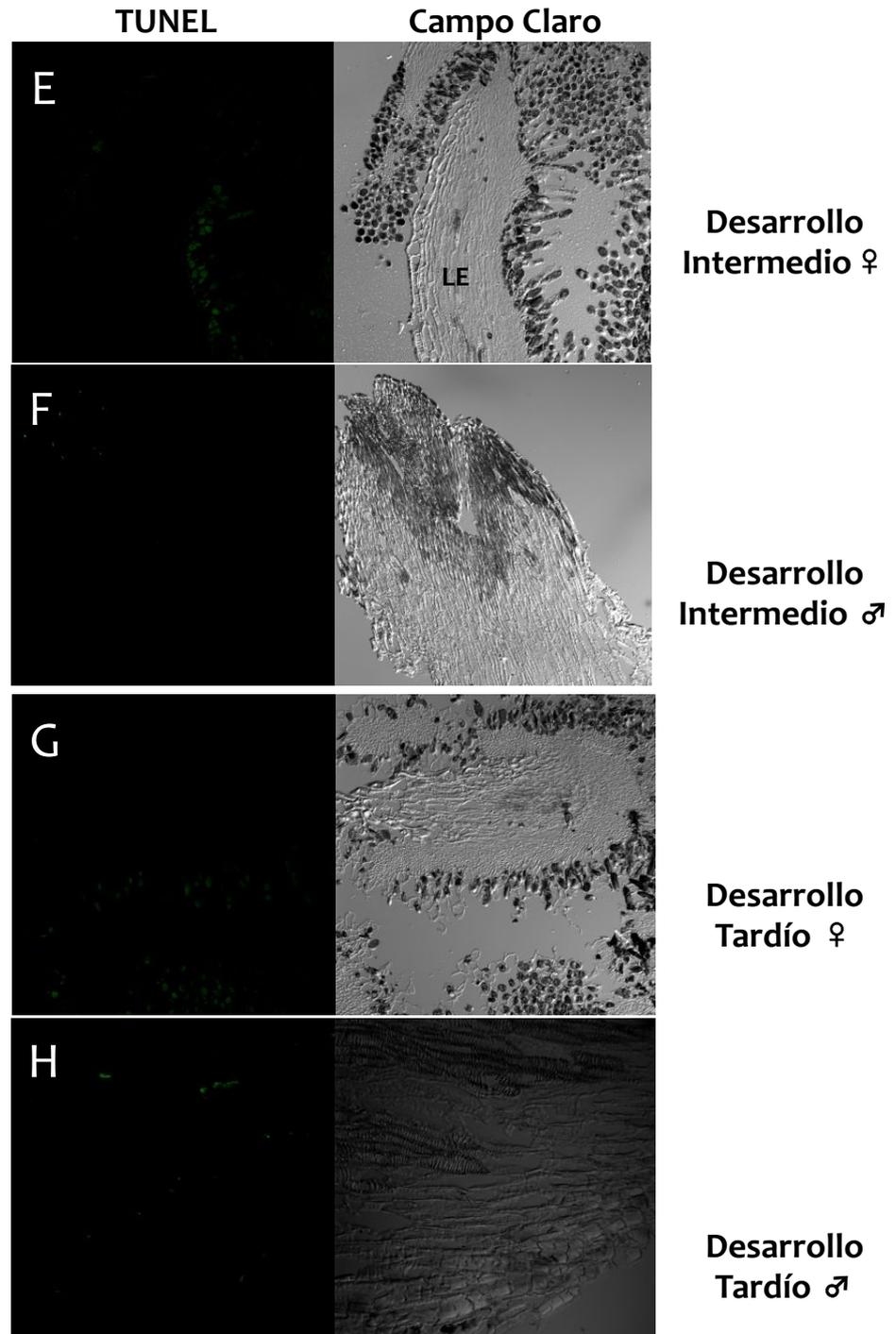
La validez de estos resultados se corroboró con la realización de ensayos control de las pruebas de TUNEL. En el primer ensayo, el control positivo (Figura 10A), se añadió solución con DNAsa I para asegurar la fragmentación del DNA nuclear y la incorporación de la fluoresceína en los extremos 3'—OH libres. A la par se realizaron también los controles negativos (Figura 10B), en los cuales se omitió el uso de la enzima dUTP transferasa terminal, con lo cual no fue posible la incorporación de la fluoresceína por lo que no se observó señal fluorescente.

Durante el desarrollo temprano, cuando en los botones florales se da la fusión de los primordios carpelares, no se logró detectar fragmentación de DNA en los botones florales femeninos (Figura 10C) ni en los masculinos (Figura 10D). En la etapa de desarrollo intermedio, en el gineceo de las flores femeninas (Figura 10E) se empiezan a formar las bifurcaciones del estilo y se inicia la diferenciación de las papilas estigmáticas; en tanto que en el gineceo de las flores masculinas no existe tal diferenciación (Figura 10F), sólo crece el estilo. En esta fase en ninguno de los dos tipos de gineceo se observó señal de la fragmentación del DNA nuclear. Tampoco se detectó señal fluorescente en el gineceo de flores femeninas (Figura 10G) o masculinas (Figura 10H), en la última etapa de desarrollo analizada, la madura, correspondiente a gineceo de flores en antesis.

Debido a que no se observaron señales de MCP en los estilos de las flores masculinas, se continuó con la investigación del otro gen de interés, OstSTY.



**Figura 10. No se detectó fragmentación de DNA en el gineceo de las flores de *O. stenopetala*. (A, B) Tratamientos control. (A) Control positivo añadiendo DNasa I. (B) Control negativo sin añadir enzima dUTP transferasa terminal. (C, D) Gineceos en etapa temprana de desarrollo. (C) Primordios carpelares (PC) en un botón floral femenino y (D) masculino. En ninguno de ellos fue positiva la prueba de TUNEL.**



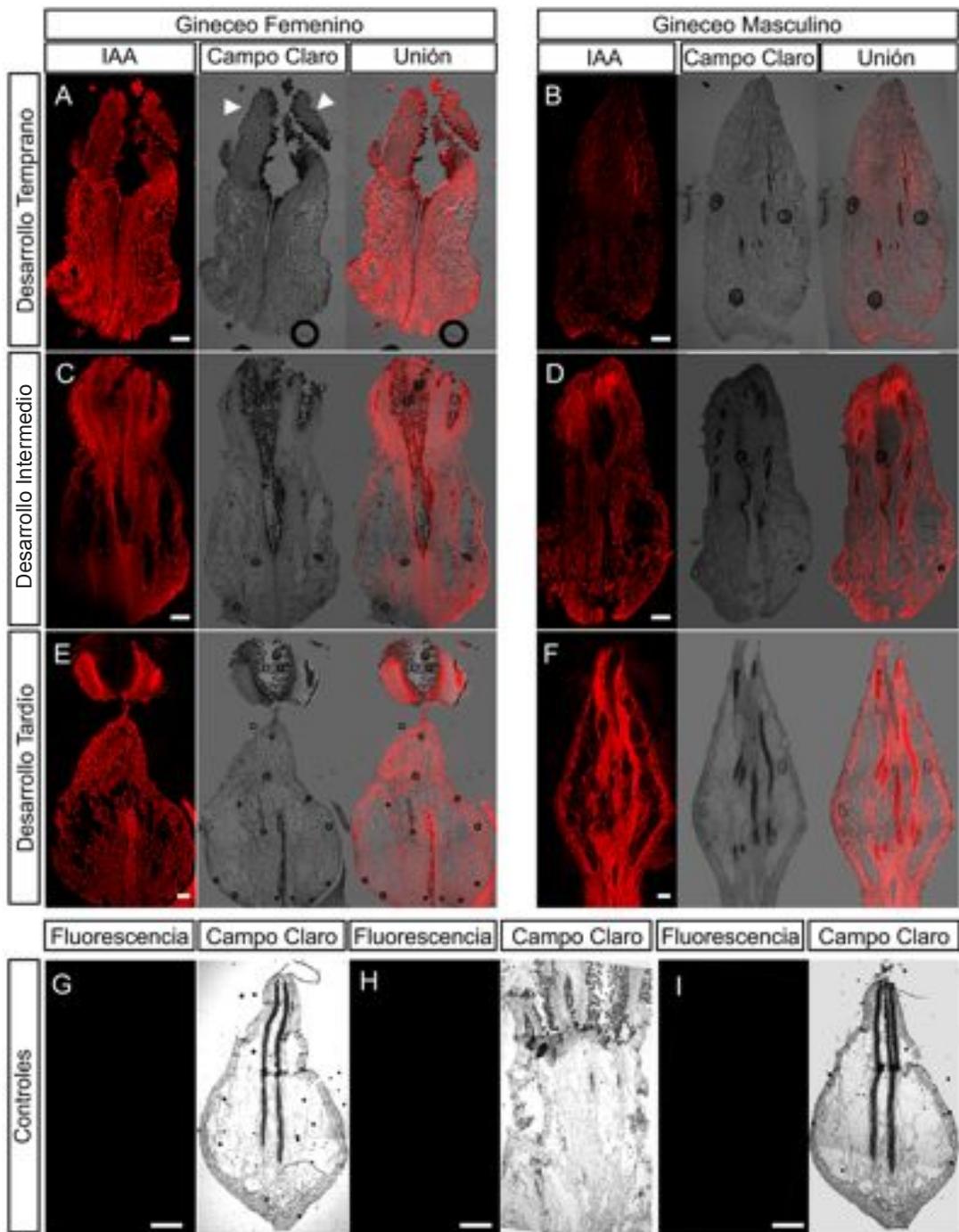
**Figura 10. (CONTINUACIÓN).** No se detectó fragmentación de DNA en el gineceo de las flores de *O. stenopetala*. (E, F) Gineceo en etapa de desarrollo intermedio. (E) Gineceo femenino mostrando los lóbulos estigmáticos (LE). (F) Gineceo masculino, mostrando la parte apical del estilo. (G, H) Gineceo en etapa de desarrollo tardío. (G) Gineceo femenino. (H) Parte apical del gineceo masculino. En ninguno de ellos se detectó fluorescencia indicativa de fragmentación del ADN nuclear.

## **Los estilos de las flores masculinas presentan niveles menores de IAA en etapas tempranas de desarrollo**

En *A. thaliana* STY1 induce la expresión del gen *YUCCA4*, un gen involucrado en la biosíntesis de auxina (Sohlberg *et al.*, 2006; Eklund *et al.*, 2010a). Esto sugiere que la disminución del transcrito *OstSTY* en los estilos de las flores masculinas respecto a los estilos de las flores femeninas, podría dar lugar a un menor nivel en la cantidad de auxina en los tejidos estilares de las flores masculinas. Las auxinas están involucrada de manera intrínseca con el correcto desarrollo y diferenciación de tejidos en el gineceo de *A. thaliana*. Por lo anterior, se decidió determinar los niveles de la auxina principal, el ácido indolacético (IAA), mediante inmunolocalizaciones realizadas en cortes histológicos de estilos de flores femeninas y estilos de flores masculinas, con ayuda del anticuerpo monoclonal anti-IAA.

Durante el desarrollo temprano los estilos de las flores femeninas (Figura 11A) presentaron mayor señal del IAA endógeno que los estilos de las flores masculinas (Figura 11B). Esta diferencia en los niveles de auxina se presentó en un momento del desarrollo en el cual se ha iniciado la diferenciación de los lóbulos estigmáticos en el gineceo de las flores femeninas. En etapas intermedias de desarrollo, la intensidad de la señal y su distribución fue prácticamente idéntica en el gineceo de las flores femeninas (Figura 11C) y en el de las masculinas (Figura 11D). En la etapa de desarrollo tardío, donde el gineceo de las flores femeninas (Figura 11E) mostró una intensidad de la señal fluorescente muy similar a la del gineceo de las flores masculinas (Figura 11F), es decir desde la etapa intermedia hasta la antesis, no hubo diferencias drásticas en cuanto a la cantidad de IAA detectado.

Los controles realizados para garantizar que la señal observada correspondiera únicamente a los anticuerpos utilizados para detectar al IAA, consistieron en omitir en la detección inmunohistoquímica en los cortes histológicos de estilos de flores femeninas y masculinas, el uso del anticuerpo primario (Figura 11G), el anticuerpo secundario (Figura 11H), o ambos (Figura 11I). En ninguno de los casos anteriores se obtuvo señal, indicando la especificidad de los anticuerpos.



**Figura 11. Inmunodetección del IAA en los estilos de flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala*.** (A, B) Gineceos en etapa de desarrollo temprano. (A) Gineceo de flor femenina, mostrando la formación de tejido estigmático en el ápice (cabezas de flecha). (B) Gineceo de flor masculina, la intensidad de la señal de inmunofluorescencia es menor que en (A). (C, D) Gineceos en etapa de desarrollo intermedio. La intensidad de la señal inmunofluorescente de IAA es similar en el gineceo de las flores femeninas (C) y en el gineceo de las flores masculinas (D). (E, F) Gineceos maduros en etapas de desarrollo tardío. (E) Gineceo de flor femenina y (F) de flor masculina, de forma similar a la etapa previa, la intensidad de la señal de IAA es muy similar. (G-I) Controles. (G) Gineceo de flor masculina, en la reacción de inmunodetección se omitió el uso de anticuerpo anti-IAA. (H) Gineceo de flor femenina, se omitió el uso de anticuerpo secundario. (I) Gineceo de flor masculina, se omitió el uso de ambos anticuerpos. Tres repeticiones biológicas fueron realizadas y se muestran los resultados representativos de un experimento. Escalas: (A-F), 200  $\mu\text{m}$ ; (G-I), 500  $\mu\text{m}$ .

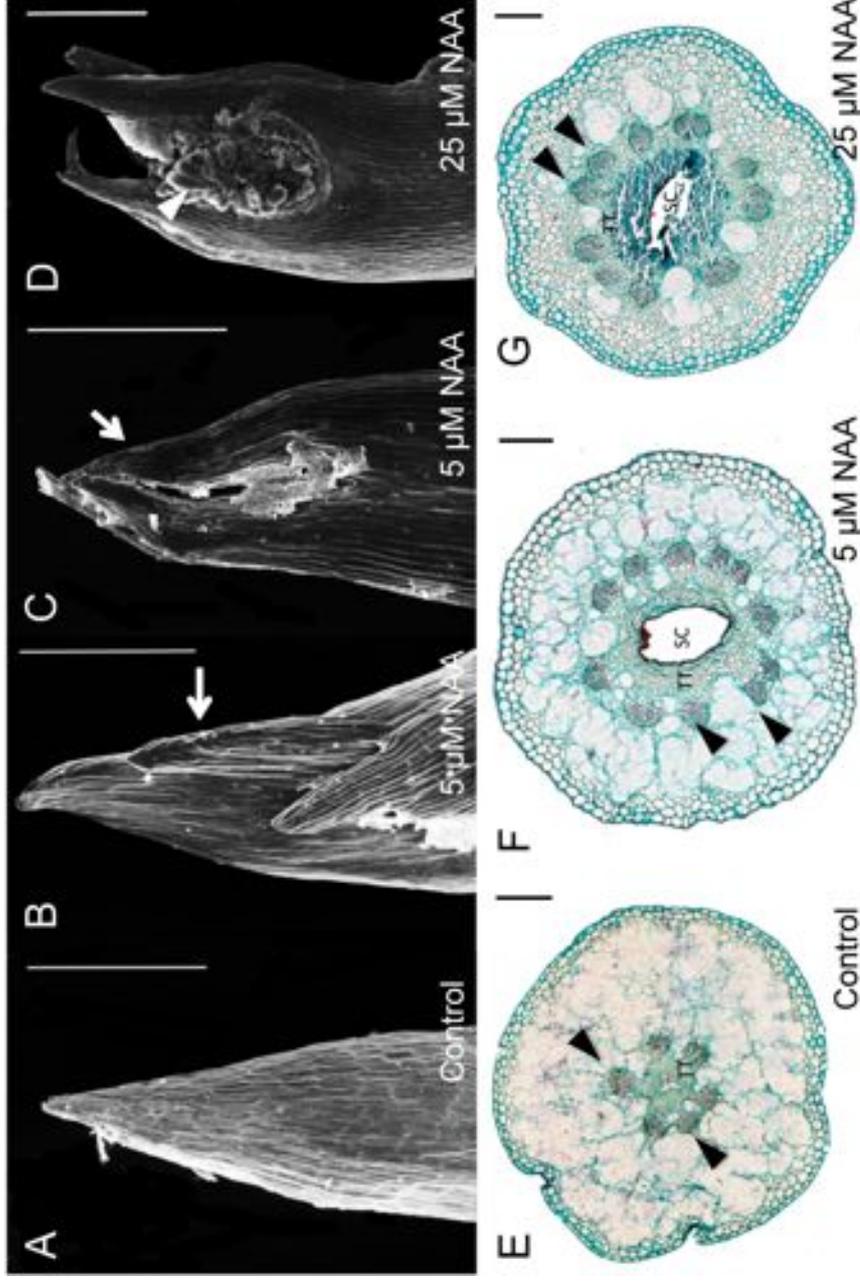
## **La aplicación de NAA exógeno restaura parcialmente los defectos morfológicos externos e internos del gineceo de las flores masculinas**

Los resultados descritos anteriormente, sugieren la posibilidad de que la cantidad de auxina en el gineceo de las flores femeninas de *O. stenopetala* es la adecuada para que este verticilo sexual complete su desarrollo y diferenciación de forma exitosa. Por el contrario, la disminución en la cantidad de auxina encontrada durante el desarrollo temprano en los estilos de las flores masculinas, sugiere que esto podría ser la causa del cese en el desarrollo de esta estructura y posterior esterilidad femenina.

Para probar la hipótesis anterior, se eligieron flores masculinas y femeninas en etapa de desarrollo temprano que todavía se encontraban unidas al tallo de *O. stenopetala*. A cada botón floral se le aplicó auxina (NAA) directamente sobre el estilo en desarrollo. Se eligieron dos concentraciones de NAA, 5 y 25  $\mu\text{M}$ , disueltas en lanolina. El tratamiento control de este experimento consistió en aplicar únicamente lanolina sin NAA sobre los estilos en desarrollo (Figura 12A).

En los estilos de las flores femeninas no hubo diferencias significativas en el desarrollo de los estilos tratados, con 5  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$  de NAA, respecto a los estilos con el tratamiento control. En todos los casos observados, el desarrollo morfológico externo de los estilos y estigmas de las flores femeninas resultó sin alteraciones evidentes.

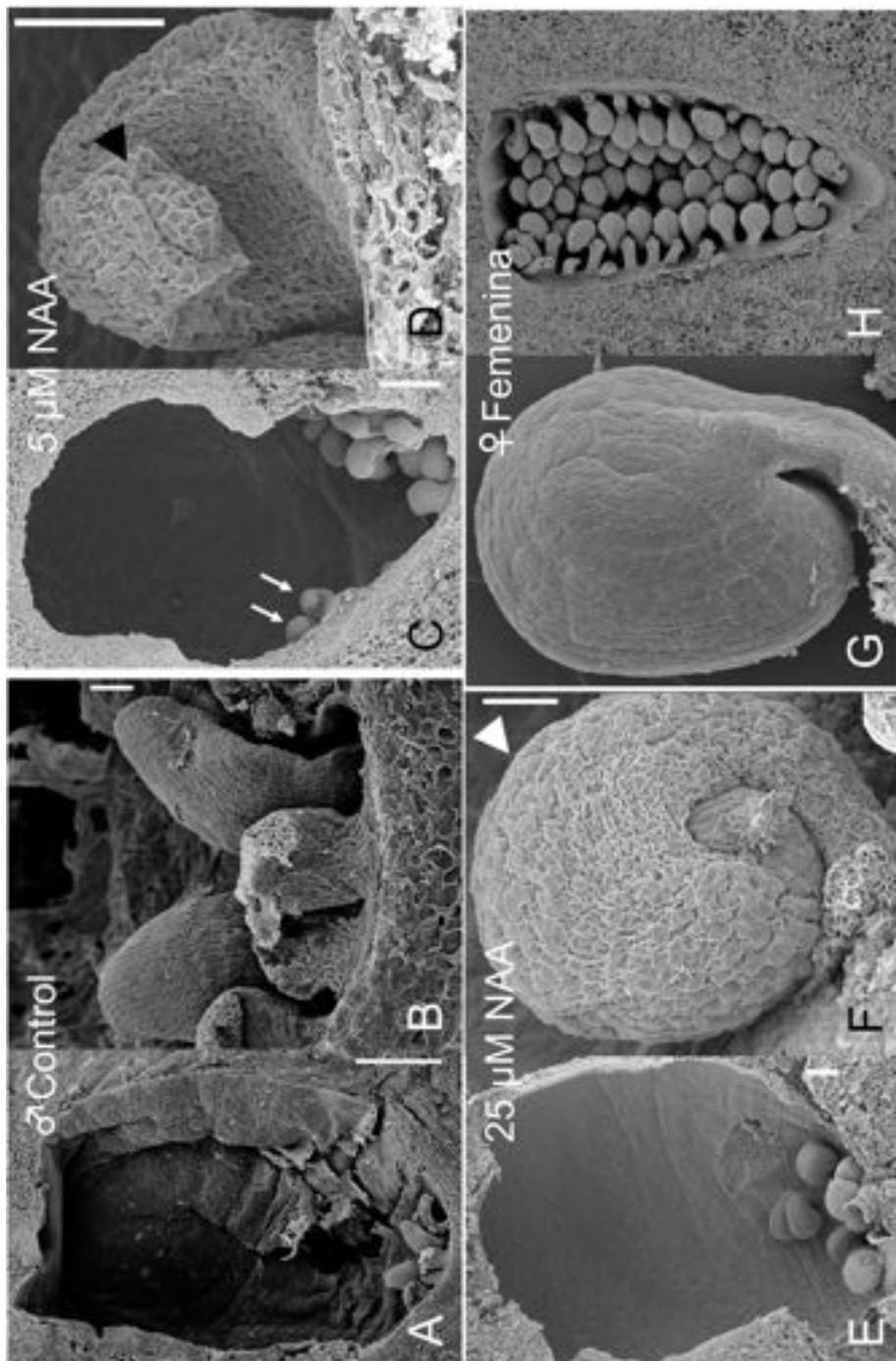
Por otro lado, los tratamientos con 5 o 25  $\mu\text{M}$  de NAA sobre los estilos de flores masculinas sí provocaron diferencias morfológicas respecto a los estilos no tratados. Con el tratamiento de 5  $\mu\text{M}$  de NAA, los estilos de las flores masculinas presentaron un mayor grado de ramificación en la parte apical (Figuras 12B y 12C), las cuales son análogas a la formación de lóbulos estigmáticos de las flores femeninas. Los estilos tratados con 25  $\mu\text{M}$  de NAA presentaron múltiples bifurcaciones en el ápice. También se encontraron cúmulos de células cuya morfología es semejante a la de las papilas estigmáticas encontradas en los estigmas de las flores femeninas (Figura 12D).



**Figura 12. La aplicación de auxina exógena promueve la formación de tejido estigmático en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetalia*. (A–D)** Fotografías de MEB de la región apical del gineceo de las flores masculinas. (A) Tratamiento control sin adición de NAA. (B, C) Tratamiento con 5  $\mu\text{M}$  de NAA, las flechas indican el aumento en las ramificaciones en el ápice del estilo. (D) Tratamiento con 25  $\mu\text{M}$  de NAA, el cual induce la ramificación del estilo y producción de papilas estigmáticas (cabeza de flecha). (E–G) Cortes histológicos de la región media de los estilos de flores masculinas sin tratamiento de NAA (E) y tratados con 5  $\mu\text{M}$  (F) y 25  $\mu\text{M}$  de NAA (G). En los estilos tratados con NAA se observa un notable incremento de la cantidad de tejido de transmisión, ampliación del canal estilar y mayor diferenciación de los haces vasculares (cabezas de flecha). Las aplicaciones de 5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  de NAA se realizaron en 14 y 22 botones florales masculinos, respectivamente, con resultados similares, con resultados similares. Escalas: (A, D), 500  $\mu\text{m}$ ; (B, C), 400  $\mu\text{m}$ ; (E–G), 200  $\mu\text{m}$ .

El tratamiento con 25  $\mu\text{M}$  de NAA también indujo el aumento en el diámetro de la base del estilo respecto al diámetro de la base de los estilos tratados con 5  $\mu\text{M}$  NAA o los estilos no tratados. El crecimiento en diámetro no parece ser debido a un aumento en el número de células, sino más bien a un aumento en el crecimiento de algunas células, particularmente de aquellas con contenido mucilaginoso. La comparación a nivel histológico de los estilos no tratados (Figura 12E) y los tratados con 5  $\mu\text{M}$  de NAA (Figura 12F) reveló que la auxina provoca un incremento en la formación y diferenciación de los haces vasculares así como en la abundancia del tejido de transmisión (Figura 12F). Además, el canal estilar presentó un ensanchamiento significativo en su diámetro. A nivel tisular, los estilos tratados con 25  $\mu\text{M}$  de NAA (Figura 12G) mostraron los mismos signos de recuperación de estructuras que los estilos tratados con 5  $\mu\text{M}$  de NAA.

En colaboración con el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se analizó el efecto de la aplicación de auxina exógena en los ovarios de las flores de plantas masculinas de tipo I, es decir aquellas que presentaban sólo óvulos en la base. En estos experimentos, el NAA diluido en DMSO se inyectó directamente sobre el ovario. Los experimentos control consistieron en inyectar únicamente el DMSO, lo que no indujo cambios el desarrollo de los óvulos (Figuras 13A y 13B). Sin embargo, la inyección de 5  $\mu\text{M}$  de NAA en el ovario promovió la formación de más óvulos, ya que no sólo se formaron en la base del ovario sino también en las paredes (Figuras 13C y 13D). La aplicación de 25  $\mu\text{M}$  de NAA mostró de igual forma un incremento en el número de óvulos producidos, formación de óvulos en las paredes laterales del ovario y además, un mayor grado de diferenciación de los óvulos, debido a que el funículo creció y alcanzó a rodear casi por completo al resto del óvulo (Figuras 13E y 13F), de manera muy semejante a lo que ocurre con los óvulos producidos por los ovarios de las flores femeninas (Figuras 13G y 13H).



**Figura 13. La adición de auxina exógena promueve el desarrollo de los óvulos de las flores masculinas. (A-H)** Fotografías de MEB de ovarios y óvulos. (A) Tratamiento control sin adición de NAA. (B) Acercamiento a los óvulos de (A), los cuales no se desarrollan por completo. (C) Ovario tratado con 5  $\mu$ M de NAA. Las flechas indican a los óvulos que crecen por las paredes laterales del ovario. (D) Acercamiento a un óvulo de (C) mostrando el desarrollo del tegumento interno. (E) Ovario tratado con 25  $\mu$ M de NAA. (F) Acercamiento a un óvulo de (E) mostrando al funículo (cabeza de flecha) envolviendo prácticamente a todo el óvulo. (G) Óvulo y (H) ovario de flor femenina, ambos se encuentran completamente desarrollados y son funcionales. El tratamiento de 5  $\mu$ M de NAA se aplicó en 23 ovarios y 12 presentaron incremento en el desarrollo. El tratamiento de 25  $\mu$ M de NAA se aplicó en 41 ovarios y 24 presentaron incremento en el desarrollo. Escalas: (A, C, E), 200  $\mu$ m; (B, D, F, G), 50  $\mu$ m; (H), 1 mm.

## Discusión

### **El dimorfismo sexual en *Opuntia stenopetala* es un proceso tardío**

En este trabajo se caracterizaron las flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala* en diferentes etapas de desarrollo con la intención de dilucidar los mecanismos que controlan la determinación del sexo en esta especie. Aparentemente, los programas de desarrollo de los verticilos sexuales en las flores hermafroditas han sido modificados repetidamente para culminar en programas de desarrollo que producen flores masculinas (estaminadas) o femeninas (pistiladas).

La mayoría de las especies que producen flores unisexuales pasan por una breve etapa hermafrodita, posteriormente en determinado momento del desarrollo, uno de los dos órganos sexuales detiene su crecimiento y/o diferenciación y queda como un órgano vestigial, que no es funcional en las flores maduras (Mitchell y Diggle, 2005). Las flores masculinas y femeninas de *O. stenopetala* presentan estas características. Los diferentes tipos de flores masculinas difieren en el grado de desarrollo alcanzado por el ovario y óvulos, lo cual sugiere que esta característica está en plena transición hacia una pérdida completa de estas estructuras. En contraste, la presencia del estilo carente de tejido estigmático, es una característica estable debido a que se encuentra presente en los tres morfos florales descritos. El análisis del desarrollo floral demuestra que el dimorfismo sexual en *O. stenopetala* es un proceso que se lleva a cabo de manera tardía en el desarrollo, ya que ocurre después de la formación de los primordios carpelares. Desde un punto de vista evolutivo, el cese en el desarrollo de los órganos reproductivos femeninos en las flores masculinas indica que esta especie está en plena transición hacia un sistema reproductor completamente dioico, no sólo a nivel funcional sino también a nivel morfológico.

Dado que la pérdida de tejido estigmático es la única característica morfológica compartida y estable en los tres morfos florales masculinos, decidimos indagar los posibles mecanismos moleculares involucrados en la formación de flores unisexuales masculinas en *O. stenopetala*.

## Posible papel de OstCRC, OstTSL y OstSTY en el proceso de unisexualidad en las flores masculinas de *O. stenopetala*

### OstCRC — CRABS CLAW

En la búsqueda de posibles genes candidatos que pudieran estar involucrados en el proceso de unisexualidad en *O. stenopetala*, se eligieron aquellos relacionados previamente con el desarrollo del gineceo, especialmente aquellos esenciales en el desarrollo del estilo y tejido estigmático. Algunos de estos genes han sido ampliamente estudiados en la planta modelo *A. thaliana* (ver Ferrándiz *et al.*, 1999; Balanzá *et al.*, 2006; Irish, 2010). Con base en las características morfológicas, como la disminución de los tejidos estilar y estigmático, que presentan las plantas cuando la expresión de estos genes ha sido abatida, se eligió analizar a *TOUSLED*, *CRABS CLAW* y *STYLISH* (Roe *et al.*, 1993; Alvarez y Smyth, 1999; Kuusk *et al.*, 2002;) para ver si alguno de ellos estaba involucrado en el cese del desarrollo del gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*.

Con las secuencias de *O. stenopetala* obtenidas, se realizaron reconstrucciones filogenéticas, las cuales sugieren que se clonaron posibles homólogos de *STY* y *TSL* en *O. stenopetala*. En el caso de OstCRC, su ubicación en un clado diferente al de CRC, sugiere que no es un homólogo de CRC, sino un homólogo del gen *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*, el cual pertenece a la familia génica YABBY que codifica factores de transcripción (Bowman y Smyth, 1999). Los miembros de la familia YABBY se han involucrado en la promoción del destino celular abaxial como un activador de genes efectores, o bien como un inhibidor de genes que promueven el destino celular adaxial (Siegfried *et al.*, 1999). La evidencia experimental apoya la hipótesis de que los miembros de la familia de factores transcripcionales YABBY, son capaces de promover la identidad abaxial y el crecimiento de los órganos laterales asociados al fomentar el destino celular abaxial de la epidermis por la acción de los genes *INO (INNER NO OUTER)* y *CRC* en células epidérmicas adaxiales en tejidos vegetativos. De hecho, se ha observado que *FIL* está involucrado en el crecimiento foliar en eudicotiledóneas y monocotiledóneas aunque con patrones de expresión diferentes (Sawa *et al.*, 1999; Siegfried *et al.*, 1999; Watanabe y Okada, 2003; Juarez *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2007; Sarojam *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). Sin

embargo, miembros de la familia YABBY que se expresan en tejidos vegetativos no complementan las funciones específicas que *INO* y *CRC* llevan a cabo cuando están involucrados en el desarrollo reproductivo. Este último dato indica que estos genes, además de preservar funciones de un programa de desarrollo básico (establecer la identidad abaxial), han ganado funciones adicionales especializadas (Meister *et al.*, 2005) que pueden ser el resultado de cambios en los patrones de expresión, en las regiones codificantes o en los genes que actúan en conjunto o río abajo de la red transcripcional de éstos (Fourquin *et al.*, 2007). La acumulación del transcrito de *OstCRC* se asemeja ligeramente con la de *CRC* de *A. thaliana*, en la cual el mRNA se detecta en el gineceo y en los nectarios (Bowman y Smyth, 1999). El transcrito de *OstCRC* se detectó en el gineceo de las flores masculinas, aunque no en el de las flores femeninas. Este patrón de expresión no correlaciona con los fenotipos observados, ya que el gineceo de las flores masculinas presenta diversas características morfológicas asociadas con el malfuncionamiento de los genes YABBY. Sin embargo, este peculiar patrón de acumulación podría deberse al papel que desempeña *CRC* en el desarrollo de nectarios en *A. thaliana* (Bowman y Smyth, 1999) y en otras especies de eudicotiledóneas (Lee *et al.*, 2005a; Lee *et al.*, 2005b), incluida la especie ancestral *Amborella trichopoda* (Fourquin *et al.*, 2007). En nuestras observaciones en el campo detectamos que las flores femeninas producen menor cantidad de néctar que las flores masculinas. La misma situación se presenta con las flores de *O. robusta*, una cactácea trioica, en donde las flores masculinas producen mayor cantidad de néctar que las flores femeninas o hermafroditas (Del Castillo y González, 1988). Es posible que la mayor acumulación del transcrito de *OstCRC* en los estambres de las flores masculinas corresponda con una mayor formación de la cantidad de tejido nectarial, el cual en la familia Cactaceae es común que se encuentre entre los dos verticilos sexuales, es decir, en la base de los estambres que confluye con la base del gineceo (Mauseth, 1988). Un patrón de expresión similar al observado en *O. stenopetala*, se presenta en *Gossypium hirsutum*, cuyo ortólogo de *CRC*: *GhCRC* tiene expresión específica en estambres y carpelos (Lee *et al.*, 2005b). A pesar de que el análisis de secuencias no muestra que *OstCRC* sea un homólogo de *CRC*, por el patrón de expresión que presenta no se

descarta una posible participación en el desarrollo del gineceo de *O. stenopetala*, aunque sea poco probable que esté involucrado en el proceso de unisexualidad.

### **OstTSL — TOUSLED**

Los defectos morfológicos encontrados en el gineceo de los mutantes *tsl-1* en *A. thaliana* (Roe *et al.*, 1993) incluyen varias de las alteraciones morfológicas similares a las observadas en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*. Entre dichas alteraciones encontramos la reducción del tejido estilar y estigmático y la formación incompleta de óvulos. Los defectos en el gineceo de los mutantes *tsl-1* son atribuidos a la descoordinación del crecimiento de los márgenes apicales del gineceo (Roe *et al.*, 1997). El papel de TSL y de las cinasas tipo Tousled (Tousled-Like Kinases — TLK's) en el desarrollo del gineceo no se ha elucidado por completo. Experimentos realizados en modelos animales sugieren que las TLK's tienen una función en el establecimiento de la estructura de la cromatina (Li *et al.*, 2001; Jenuwein y Allis, 2001; Ehsan *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a que el efecto de la pérdida de la función de las TLK's es mucho más severo, e inclusive letal, en animales que en *A. thaliana*, Fourquin *et al.* (2005) sugieren que existe divergencia en el papel de estas proteínas en los diversos linajes. Ehsan *et al.* (2004) han reportado que las plantas *tsl-1* muestran un incremento en los niveles de expresión del gen *CYCLIN B1;1*, lo que sugiere que TSL tiene un papel fundamental durante la división mitótica. El aumento en la expresión de esta ciclina es un indicador de que la célula debe iniciar actividad mitótica o está en mitosis (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Por lo tanto, la actividad de TSL en plantas pudiera ser reprimir la expresión de *CYCLINB1;1*, provocando un retraso en las divisiones celulares (Ehsan *et al.*, 2004).

Durante el desarrollo del gineceo en *A. thaliana*, durante las etapas tempranas TSL se expresa en la región apical del primordio carpelar, y durante el desarrollo tardío la expresión se restringe a la región estilar (Roe *et al.*, 1997). La actividad de TSL oscila durante todo el ciclo celular, mostrando mayor actividad durante la fase G<sub>2</sub>/M. Un interactor de TSL, identificado por doble híbrido, denominado TKI1 (TSL-Kinase Interacting Protein 1) presenta regiones homólogas con el dominio SANT/myb (Ehsan *et al.*, 2004), el cual tiene homología con la proteína *cramped* de

*D. melanogaster*, que es un miembro del grupo Polycomb D (Yamamoto *et al.*, 1997), involucrado en la regulación de la cromatina durante el desarrollo de *D. melanogaster*. El dominio SANT ha sido encontrado en una gran cantidad de proteínas que actúan como complejos reguladores de la transcripción. Aparentemente, estos dominios tienen papeles críticos con los complejos de proteínas involucrados en la remodelación de la cromatina (ver Ehsan *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren fuertemente que TSL está involucrada en los procesos de remodelación de la cromatina.

La disminución en la acumulación de transcrito de *OstTSL* en el gineceo de las flores masculinas, en comparación del gineceo de las flores femeninas, podría provocar retrasos en las divisiones de las células del estilo afectando la continuidad del ciclo celular y probablemente provocar muerte celular prematura. La muerte de células estilares podría ser la causa de la ausencia de tejido estigmático en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*. Sin embargo, los datos encontrados en cuanto a la acumulación de la proteína en el estilo y a la falta de evidencia sobre la activación de la MCP, no apuntan a involucrar a *OstTSL* en la falta de crecimiento y diferenciación en los estilos de las flores masculinas de esta especie. Por lo tanto, es necesario investigar cambios en la actividad de cinasa o en los patrones espacio-temporales, de *OstTSL* en los estilos de flores femeninas y masculinas.

### ***OstSTY — STYLISH***

El doble mutante *sty1-1 sty2-1* de *A. thaliana* presenta varias anormalidades en el gineceo que abarcan una marcada reducción en la cantidad de tejido estilar y estigmático, así como falta de coordinación en el crecimiento de las células estilares (Kuusk *et al.*, 2002). Además presenta reducción del xilema estilar y reducción en la bifurcación de los haces vasculares (Kuusk *et al.*, 2006). Las anormalidades presentes en el sistema vascular del doble mutante *sty1-1 sty2-1* llevó a Kuusk *et al.* (2006) a sugerir que defectos en el transporte polar de auxina (PAT), el metabolismo de auxina o su señalización podrían ser responsables de las malformaciones del gineceo. Varias de estas características se observaron en el

gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala*, por lo que se procedió a buscar genes parecidos a *STY1* y *STY2*.

La secuencia similar a *STY* de *A. thaliana* encontrada en *O. stenopetala*, denominada *OstSTY*, posee todos los residuos de aminoácidos que constituyen el dominio de dedos de zinc característico de los miembros de la familia génica *SHI/STY* (Fridborg *et al.*, 1999; Kuusk *et al.*, 2002). *OstSTY* se agrupa en el mismo clado con *STY1* de *A. thaliana*, por lo que lo consideramos un homólogo de *STY*. Lo anterior resulta muy interesante debido a que *STY1* es el gen con mayor relevancia en el desarrollo del gineceo de *A. thaliana*, mientras que otros genes de la familia como *STY2*, *SRS3-7* y *LRP1* aparentemente no son esenciales en el proceso, ya que cuando se abate la transcripción de estos genes, no se observan defectos morfológicos en el gineceo (Kuusk *et al.*, 2006). Aunque otros miembros de la familia génica *STY/SHI* también se expresan en las raíces laterales (Kuusk *et al.*, 2006) y en algunos casos, como en *LRP1*, su expresión es activada en presencia de auxina (Ullah *et al.*, 2003), la expresión de *OstSTY* parece estar limitada a los órganos reproductores, principalmente el gineceo, al igual que *STY* de *A. thaliana*. De manera significativa, se detectó una mayor acumulación del transcrito *OstSTY* en el gineceo de las flores femeninas, respecto al gineceo de las flores masculinas. Esta diferencia en la acumulación de transcrito está en concordancia con el posible papel de *STY* en el desarrollo del gineceo de *A. thaliana*.

### **No hay indicios de degradación del DNA en el gineceo de las flores masculinas de *O. stenopetala***

La muerte celular programada (MCP) ha sido definida como una secuencia de eventos, potencialmente interrumpibles, que llevan a la destrucción controlada y organizada de la célula (Lockshin y Zakeri, 2004). Las características morfológicas de las células vegetales con MCP han dado la pauta para la clasificación de este tipo de muerte, aunque las evidencias bioquímicas cada vez toman mayor importancia.

La MCP es un proceso que ocurre durante un amplio rango de programas de desarrollo y diferenciación, los cuales acontecen desde el inicio hasta el final del ciclo de vida de las plantas (Rogers, 2005). La MCP a menudo involucra la

desaparición completa de las paredes celulares; por ejemplo, en el tapete de las anteras (Balk y Leaver, 2001), y en el aerénquima, endospermo y mesófilo de las hojas y pétalos senescentes, en otros casos, los efectos de la MCP sobre la pared celular apenas son notorios: en las células del suspensor, en los vasos, traqueidas y fibras del xilema, fibras del floema, y en las células del corcho de la madera (van Doorn y Woltering, 2005). La condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA se reportan como eventos que ocurren en la MCP en *Helianthus annuus* (Balk y Leaver, 2001) y en la familia Cactaceae (Shishkova y Dubrovsky, 2005).

La unisexualidad floral provee un sistema donde estudiar los eventos de la MCP, la cual ha sido propuesta como la vía por la cual se inhibe el desarrollo del órgano sexual no deseado; sin embargo, existe poca evidencia que corrobore o desmienta esto (Jones y Dangl, 1996; Wu y Cheng, 2000). En las anteras de las flores femeninas del kiwi, *Actinidia deliciosa*, una planta dioica, durante el cese del desarrollo del grano de polen se presentan algunas características morfológicas que concuerdan con las de la MCP, tales como condensación de citoplasma, formación de vesículas por la membrana plasmática y nuclear, y condensación de la cromatina. A la evidencia morfológica de la MCP, se le añadió evidencia bioquímica cuando se comprobó la fragmentación del DNA nuclear mediante la técnica de TUNEL (Coimbra *et al.*, 2004).

En el maíz, una planta monoica, al inicio del desarrollo todas las flores son hermafroditas. En las flores masculinas, la eliminación del primordio carpelar involucra la formación de múltiples vacuolas y la eliminación de organelos (Cheng *et al.*, 1983; Dellaporta y Calderon-Urrea, 1994). Las mutaciones que feminizan las flores masculinas del maíz se describieron hace varios años. Estas incluyen mutaciones en los genes *tasselseed1* (*ts1*), *tasselseed2* y *tasselseed5*, las cuales principalmente afectan el desarrollo del gineceo (Irish *et al.*, 1994). Las mutaciones en *ts1* y en *ts2* mostraban un fenotipo muy simple: la transformación de flores masculinas a femeninas. *TS2* codifica una deshidrogenasa de alcoholes de cadena corta cuyos mayores niveles de expresión se alcanzan en las células subepidérmicas del gineceo (DeLong *et al.*, 1993). Mientras trataban de elucidar el papel de *TS2* como mediador de la MCP en los órganos florales de maíz, Wu *et al.*, (2007)

descubrieron que la proteína TS2 presentaba actividad sobre brasinoesteroides, los cuales muestran interacciones regulatorias con diferentes compuestos como el ácido abscísico, el ácido jasmónico y las giberelinas. Dichas interacciones parecen ser esenciales durante la MCP. En el pariente cercano del maíz, *Tripsacum dactyloides*, se reportó el mismo proceso de MCP regulado por *ts2*, aunque sólo a nivel de expresión genética (Li *et al.*, 1997). Mutaciones en *ts4* y *ts6* resultan en proliferación anormal de los órganos florales del maíz, dando paso a flores irregulares masculinas, femeninas, hermafroditas y estériles (Irish y Nelson, 1989). En los mutantes *ts4* los pistilos no son abortivos, aunque no se encuentran completamente fusionados y los órganos sexuales masculinos no se desarrollan, lo que feminiza las flores masculinas (Irish y Nelson, 1989). El gen *ts4* codifica para un microRNA, miembro de la familia génica miR172 y nombrado *zma-miR172e* (Chuck *et al.*, 2007). Esta familia está involucrada en la regulación del factor de transcripción *APETALA2 (AP2)* en *A. thaliana*. Aparentemente, *zma-miR172e* suprime la traducción de *indeterminate spikelet1 (ids1)* cuya expresión prolongada reprime la expresión de los genes MADS-box del maíz, causando así la indeterminación del meristemo floral y las fallas en el aborto del carpelo. Además, la expresión extendida de *IDS1* incrementa el número de células madre, lo que lleva a un retraso en la diferenciación y permite la formación de meristemos florales incapaces de responder correctamente a las señales de determinación sexual. Este estudio realizado en maíz, es el primero en el cual el proceso de determinación del sexo ha sido descifrado, en este caso, en los aspectos concernientes a la aborción del carpelo. Desde un punto de vista evolutivo sería interesante descubrir si el proceso de determinación sexual del maíz definido por *ts4* e *ids1*, es común en otras especies de monocotiledóneas monoicas o especies dioicas de diferentes linajes (Weiblen *et al.*, 2000; Kinney *et al.*, 2008). El papel de estos genes en la determinación del sexo no se ha investigado en otras especies de pastos o angiospermas, pero es posible que la formación de flores unisexuales sea el resultado de diversos programas genéticos que se han originado independientemente en los pastos.

Los patrones tisulares de muerte celular en los gineceos abortados de *Z. mays* y *T. dactyloides* son muy similares (Cheng *et al.*, 1983; Li *et al.* 1997). Sin embargo, en

otras especies de pastos, la MCP ocurre en diferentes etapas de desarrollo y en diferentes estratos celulares (Malcomber y Kellog, 2006; Kinney *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere que ambos programas de desarrollo y la participación de *TS2* en la determinación del sexo no se encuentran ampliamente distribuidos. Estos genes no se han implicado en otros casos de determinación del sexo ya que los homólogos de *TS2* en *A. thaliana* (*ATA1*) y en *S. latifolia* (*STA1-2*), una planta hermafrodita y una dioica, respectivamente, se expresan exclusivamente en las células del tapete de la antera y no en el gineceo (Lebel-Hardenack *et al.*, 1997).

Por otra parte, aunque el proceso de aborción de estambres en las flores femeninas del maíz presenta características morfológicas similares a los de la MCP (Cheng *et al.*, 1983), recientemente se ha demostrado que el desarrollo incompleto se debe a una detención del ciclo celular y no a un mecanismo de muerte celular. Los estambres abortados presentan integridad nuclear aún en etapas avanzadas de desarrollo y distintas pruebas indican que no ocurre fragmentación de DNA, como sucede en los pistilos de las flores estaminadas (Kim *et al.*, 2007). El transcrito del gen *CYCLIN B*, que actúa como regulador positivo durante la fase G<sub>2</sub>/M, no es detectable en los estambres abortivos, mientras que es notable la expresión de *WEE1*, un regulador negativo del ciclo celular (Kim *et al.*, 2007).

En *O. stenopetala* no se encontraron estas características morfológicas y/o bioquímicas, por lo que concluimos que no existen indicios que involucren a la MCP en el cese en el desarrollo del gineceo en las flores masculinas. Dado que las células permanecen vivas y son capaces de responder a la adición de auxina, proponemos que dichas células no han concluido su etapa de diferenciación probablemente debido a que no han recibido las señales adecuadas para completar su ciclo de desarrollo.

### **La auxina está involucrada en el desarrollo del gineceo y juega un papel importante en el proceso de masculinización en *O. stenopetala***

Las auxinas han sido involucradas en prácticamente todos los procesos del desarrollo vegetal. Algunos de estos procesos lo hacen a través del establecimiento de una polaridad apical-basal durante la embriogénesis, diferentes tipos de

tropismos, iniciación de los órganos laterales, establecimiento de los haces vasculares, formación de cotiledones, morfogénesis foliar, arquitectura de la raíz, formación de las raíces laterales, desarrollo floral, desarrollo del gineceo, dominancia apical y regulación de la filotaxia (revisado en Balanzá *et al.*, 2006; Zhao, 2010). En estos procesos, la distribución diferencial de las auxinas junto con los cambios locales en los niveles de auxinas, actúan como señales instructoras de la regulación del crecimiento y diferenciación celular.

En el modelo propuesto por Nemhauser *et al.* (2000), los autores consideran que la biosíntesis de auxina en *A. thaliana* tiene lugar en el ápice del gineceo para posteriormente ser transportada de forma basipetala a través de éste. El proceso permite el establecimiento de un gradiente de auxina, el cual promueve el patrón de diferenciación regional del gineceo: altos niveles de auxina promueven la diferenciación del estilo y del estigma, mientras que los niveles bajos son críticos para el correcto desarrollo del ovario, óvulos y ginóforo (Nemhauser *et al.*, 2000).

En *A. thaliana*, *STY1* actúa como un activador transcripcional del gen *YUCCA4* (*YUC4*; Kuusk *et al.*, 2006; Sohlberg *et al.*, 2006; Eklund *et al.*, 2010a), el homólogo de *YUC1*, una flavin-monooxigenasa clave en la biosíntesis de auxina (Marsch-Martínez *et al.*, 2002). *STY1* interacciona con una pequeña región del promotor de *YUC4* (Eklund *et al.*, 2010a). Ståldal *et al.* (2008) mostraron que la aplicación de auxina restablece los defectos fenotípicos del estilo en la doble mutante *sty1-1 sty2-1*, lo que sugirió una reducción en la concentración de auxina en el estilo. En otros organismos como el musgo *Physcomitrella patens*, al abatimiento de la expresión de genes de la familia *SHI/STY* resulta en la reducción de las tasas de biosíntesis de auxina con los consiguientes defectos esperados en el desarrollo de la planta (Eklund *et al.*, 2010b).

Con estos antecedentes, la disminución en la acumulación de *OstSTY* en el gineceo de las flores masculinas podría estar ligado con el bajo contenido de auxina detectado por inmunohistoquímica en etapas tempranas de desarrollo. En estas primeras etapas, el tejido estigmático en las flores femeninas empieza su diferenciación a partir del tejido estilar, mientras que en las flores masculinas este tejido permanece sin diferenciarse por lo que no se forma el tejido estigmático.

Estos datos originan la posibilidad de que una disminución en la biosíntesis de auxina y/o su contenido en el gineceo de las flores masculinas provoque el arresto en el desarrollo del estilo y del estigma. En apoyo a esta hipótesis, se demostró que la aplicación de auxina a los estilos de las flores masculinas durante etapas tempranas del desarrollo, estimula significativamente las bifurcaciones del estilo, la formación de tejido estigmático y revierte algunos de los defectos en la estructura interna del estilo, además promovió la formación de un mayor número de óvulos y un incremento en su diferenciación. Estos resultados sugieren que las células estilares y las del ovario de las flores masculinas, tienen la capacidad de responder a los estímulos de la auxina y que, la morfogénesis del estilo en *O. stenopetala*, al igual que en la flor hermafrodita de *A. thaliana*, es un proceso dependiente de auxina. Aún cuando no fue posible demostrar el establecimiento de un gradiente en la concentración de IAA en los estilos de *O. stenopetala* durante su morfogénesis, no se descarta su formación debido a la presencia de otras moléculas que contribuyen a la homeostasis de la auxina.

Las plantas sometidas a tratamientos con hormonas exógenas muestran una rápida aunque transitoria alteración de los perfiles transcripcionales (Goda *et al.*, 2008). En *A. thaliana* los tratamientos hormonales cortos, de aproximadamente una hora, alteran la expresión de ~10-300 genes, con casi igual número de genes activados y reprimidos. Los genes regulados por alguna hormona en específico son genes relacionados con la homeostasis y distribución hormonal, así como con la retroalimentación transcripcional negativa. Los conjuntos de genes regulados por las auxinas incluyen factores de transcripción requeridos en eventos de desarrollo específicos (Paponov *et al.*, 2008).

Otro factor de transcripción que se ha involucrado en el desarrollo correcto del gineceo y en la biosíntesis de auxina en *A. thaliana*, es NGATHA (NGA, Alvarez *et al.*, 2009; Trigueros *et al.*, 2009). La familia de genes NGA en *A. thaliana* comprende cuatro miembros (NGA1-4), cuando la actividad de cada uno se disminuye por separado, no existen defectos morfológicos significativos en el gineceo. Los defectos morfológicos se presentan sólo en dobles, triples y cuádruples mutantes, siendo éste último el caso más dramático ya que los tejidos estilares y estigmáticos

están ausentes por completo (Trigueros *et al.*, 2009). Aparentemente, los genes *SHI/STY* contribuyen en la promoción de la activación y mantenimiento de la expresión de los genes *NGA* (Alvarez *et al.*, 2009), los cuales a su vez activan la transcripción de los genes *YUC2* y *YUC4* (Trigueros *et al.*, 2009), este último en conjunto con *STY1* (Sohlberg *et al.*, 2006), proceso que aparentemente regula la síntesis de auxina en el ápice del gineceo.

Resulta claro que la biosíntesis *de novo* de la auxina tiene un papel esencial en muchos procesos del desarrollo. Sin embargo, aún quedan muchas interrogantes acerca de las rutas de biosíntesis de auxina y su participación en el crecimiento y desarrollo vegetal. El esclarecimiento de los mecanismos sobre cómo las auxinas controlan el desarrollo en las plantas, contribuirá también al esclarecimiento del papel de esta hormona en el desarrollo evolutivo de los sistemas sexuales en las angiospermas.

En especies de cucurbitáceas como *Cucumis sativus*, se ha demostrado que las auxinas promueven la formación de flores femeninas probablemente a través de la inducción de la biosíntesis de etileno (Trebitch *et al.*, 1987). Varios genes involucrados en la biosíntesis y percepción del etileno, así como genes cuya expresión se activa por el etileno, se han involucrado en el proceso de determinación del sexo en esta especie (Saito *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010). Uno de estos genes, involucrado en la biosíntesis de etileno, es el que codifica para la 1-aminoaciclopropano-1-carboxilato (ACC) sintasa (ACS — Trebitsh *et al.*, 1997), del que se ha propuesto que reprime el desarrollo de los estambres en los botones florales (Shiber *et al.*, 2008 en Wu *et al.*, 2010). La auxina parece promover la expresión de los genes ACS y de otros genes de respuesta a auxina, los cuales promueven la síntesis de etileno y con ello el desarrollo de flores femeninas (Trebitch *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2010).

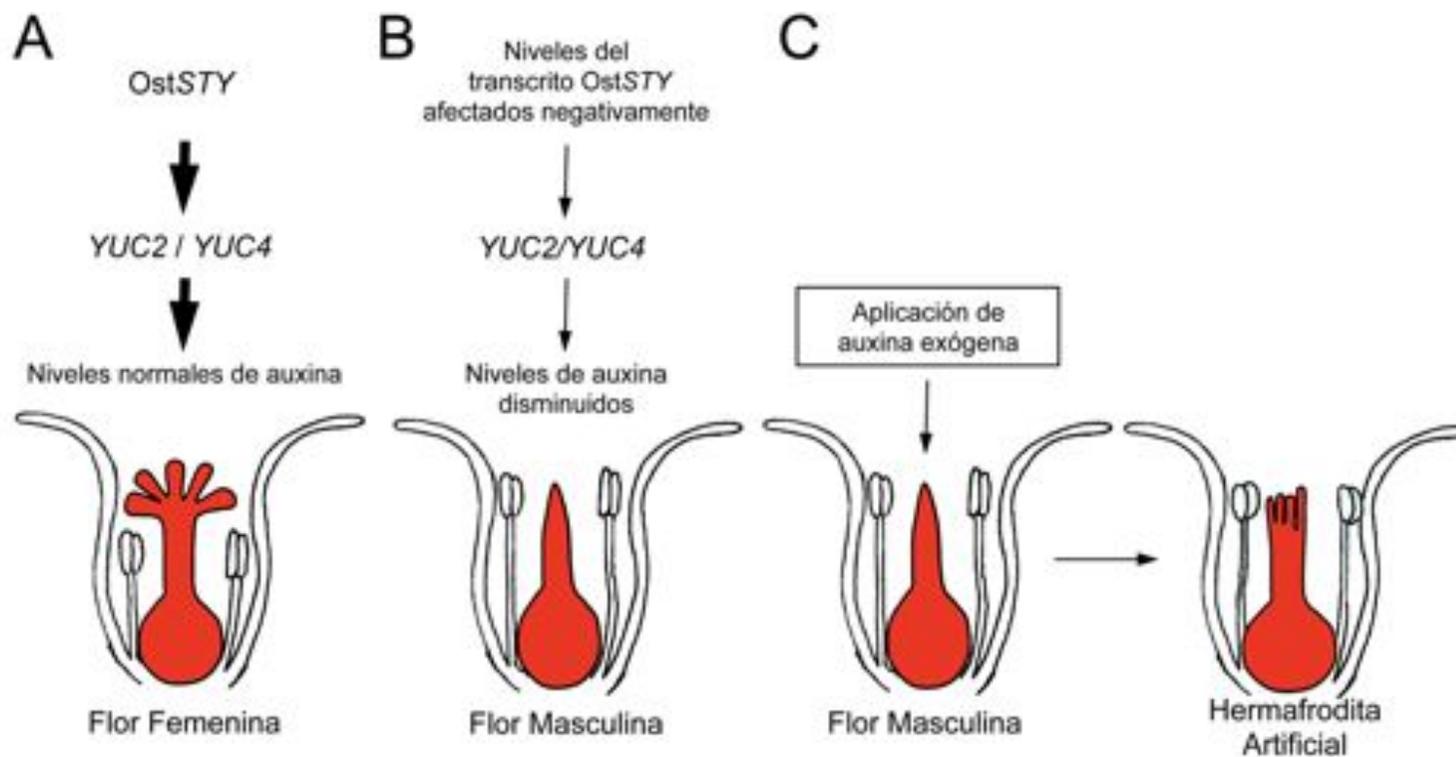
Recientemente, en *Hordeum vulgare* se ha demostrado que un incremento en la temperatura durante el desarrollo floral provoca una reducción, específicamente en las anteras, de aproximadamente 50% del contenido de auxina junto con una disminución en la respuesta a la señalización por esta hormona. Las altas

temperaturas también tuvieron efecto en la expresión de genes como *YUC2* y *YUC6* de *A. thaliana* y los genes *YUCCA* del centeno. Como resultado del incremento en la temperatura, los granos de polen del centeno y de *A. thaliana*, abortan provocando esterilidad masculina (Sakata *et al.*, 2010). Las altas temperaturas predominan en el ambiente en el cual habita *O. stenopetala*, por lo que no es descartable que estas tengan efectos similares a los observados en *H. vulgare* o *A. thaliana*, no sólo en los estambres sino también en el gineceo. En *O. stenopetala* podría probarse si es que en las plantas que producen flores masculinas, los estambres presentan mayor control de la síntesis de auxinas y por tanto resistencia a las altas temperaturas, mientras que el gineceo es sensible al incremento en la temperatura lo cual se ve reflejado en la síntesis, transporte o percepción de auxina. Diferencias en el efecto de las altas temperaturas entre tejidos de la misma planta fueron reportados por Sakata *et al.* (2010), quienes observaron una disminución en la señalización de la auxina por efecto de las altas temperaturas sólo en los estambres, mientras que otras partes de la misma planta, como el gineceo, pétalos y raíces, mostraron incrementos en la señalización de auxinas.

### **Modelo del proceso de masculinización en *O. stenopetala***

El siguiente modelo (Figura 14) propone una de las posibles explicaciones acerca de la participación de las auxinas en el proceso de formación de flores unisexuales masculinas en *O. stenopetala*. En las flores femeninas (Figura 14A), con gineceo bien desarrollado y completamente funcional, los niveles de expresión del gen *OstSTY* promueven la expresión de genes tipo *YUC* (especialmente tipo *YUC2* y/o *YUC4*), los cuales son un punto de control en el proceso de síntesis de auxina. Se ha propuesto en *A. thaliana*, que una vez sintetizada la auxina, ésta se acumula y distribuye a lo largo del gineceo estableciendo un gradiente de acumulación. La formación de dicho gradiente es requisito indispensable para el desarrollo correcto y diferenciación de los tejidos estilar y estigmático (Nemhauser *et al.*, 2000). En las flores masculinas (Figura 14B) el descenso en la expresión de *OstSTY* provoca que disminuya la tasa de síntesis de auxina y con ello se afecta su acumulación y establecimiento del gradiente en el gineceo. De esta manera, la auxina no alcanza los altos niveles de acumulación requeridos para llevar a cabo los procesos de

diferenciación de los tejidos estilar y estigmático. Al estar ausentes estos tejidos, la estructura femenina es estéril y, por lo tanto, la flor sólo cumple con una función reproductiva masculina. Si a los gineceos de flores masculinas en desarrollo se les añade auxina en la etapa apropiada (Figura 14C), de modo que los niveles endógenos se incrementen, se puede observar la reversión de los defectos morfológicos de los estilos, en los cuales incluso se llegan a encontrar parches de tejido estigmático. La flor de esta forma, tendrá características hermafroditas. Un proceso similar estaría ocurriendo a nivel del ovario, en donde el incremento de auxina, consecuencia de la aplicación de auxina, promueve el desarrollo y diferenciación de los óvulos. Probablemente, si la aplicación de auxina fuera metodológicamente viable durante las primeras etapas de desarrollo del gineceo, de modo que el efecto pudiera ser más prolongado, se lograría la reversión completa de los defectos del gineceo, incluido el restablecimiento de la fertilidad femenina.



**Figura 14. Modelo de desarrollo de las flores masculinas de *O. stenopetala*.** (A) Desarrollo de una flor femenina. *OstSTY* regula la síntesis de auxina a través de *YUC2/YUC4* de modo que los niveles alcanzados resultan óptimos para la formación correcta del gineceo. (B) Desarrollo de una flor masculina. Al encontrarse afectada la acumulación del transcrito *OstSTY*, se afecta la expresión de *YUC2/YUC4* y con ello la síntesis y acumulación de auxina, la cual resulta insuficiente para el desarrollo completo del estilo y del estigma. (C) Cuando a una flor masculina se le añade auxina durante una etapa intermedia de desarrollo, se logra restablecer parcialmente el desarrollo del estilo y estigma. Quizá si la aplicación de auxina se realizara en etapas tempranas de desarrollo se alcanzaría recuperación total de los tejidos estilares y estigmáticos; sin embargo, metodológicamente esto es imposible.

## Conclusiones

Una característica común en las flores de las plantas masculinas de *O. stenopetala* es la ausencia de tejido estigmático en el gineceo. A nivel tisular, los haces vasculares, el tejido de transmisión y canal estilar del gineceo no se desarrollan completamente. En este trabajo se identificaron dos genes: *OstTSL* y *OstSTY*, homólogos a *TSL* y *STY* de *A. thaliana*, cuya reducción en la expresión correlaciona con el cese del desarrollo del gineceo de las flores masculinas, lo que sugirió que estos pueden tener funciones similares a las reportadas durante el desarrollo del gineceo de *A. thaliana*. Otro de los genes bajo estudio, *OstCRC*, no resultó un gen homólogo a *CRC* de *A. thaliana*, aunque sí pertenece a la misma familia génica, la de factores de transcripción *YABBY*.

El gineceo de las flores masculinas presentó una menor acumulación de IAA comparado con el gineceo de las flores femeninas. La aplicación de auxina en el gineceo de las flores masculinas en estas etapas de desarrollo, revirtió parcialmente algunos de los defectos morfológicos, incluida la formación de parches de tejido estigmático. Estas observaciones correlacionan con la disminución en el gineceo de las flores masculinas de los niveles de mRNA de *OstSTY*, un miembro de la familia génica *SHI/STY*, la cual se ha involucrado en la homeostasis de auxina.

Por otro lado, la reducción en la concentración de auxina en el gineceo de las flores masculinas parece estar involucrada directamente con el proceso de cese en el desarrollo de este verticilo y con el proceso de masculinización de las flores en *O. stenopetala*.

## Referencias

1. Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. **Annals of Botany**. 86, 211-221.
2. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 2008. **Molecular biology of the Cell**. Garland Science. 5a Edición. New York, USA.
3. Alvarez, J., y D. Smyth. 1999. CRABS CLAW and SPATULA, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. **Development**. 126, 2377-2386.
4. Alvarez, J. y D. Smyth. 2002. CRABS CLAW and SPATULA genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. **International Journal of Plant Sciences**. 163, 17-41.
5. Alvarez, J. P., A. Goldshmidt, I. Efroni, J. L. Bowman y Y. Eshed. 2009. The NGATHA distal organ development genes are essential for style specification in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. 21, 1373-1393.
6. Ando S. y S. Sakai. 2002. Isolation of an ethylene-responsive gene (*ERAF16*) for a putative methyltransferase and correlation of *ERAF16* gene expression with female flower formation in cucumber plants (*Cucumis sativus*). **Physiologia Plantarum**. 116, 213-222.
7. Ando, S., Y. Sato, S. Kamachi y S. Sakai. 2001. Isolation of a MADS-box gene (*ERAF17*) and correlation of its expression with the induction of formation of female flowers by ethylene in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). **Planta**. 213, 943-952.
8. Atanassov, I., C. Delichère, D. Filatov, D. Charlesworth, I. Negrutiu y F. Monéger. 2001. Analysis end evolution of two functional Y-linked loci in a plant sex chromosome system. **Molecular Biology and Evolution**. 18, 2162-2168.
9. Bai, S. L., Y. B. Peng, J. X. Cui, H. T. Gu, L. Y. Xu, Y. Q. Li, Z. H. Xu y S. N. Bai. 2004. Developmental analyses reveal early arrests of the spore-bearing parts of reproductive organs in unisexual flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Planta**. 220, 230-240.
10. Baker, H. 1984. Some functions of dioecy in seed plants. **The American Naturalist**. 124, 149-158.
11. Balanzá, V., M. Navarrete, M. Trigueros y C. Ferrándiz. Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. **Journal of Experimental Botany**. 57, 3457-3469.
12. Balk, J. y C. J. Leaver. 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. **The Plant Cell**. 13, 1803-1818.
13. Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. **Nature Review Genetics**. 3:274-284.
14. Bawa, K. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. **The Annual Review of Ecology and Systematics**. 11, 15-39.
15. Bergero, R., A. Forrest, E. Kamau y D. Charlesworth. 2007. Evolutionary strata on the X chromosomes of the dioecious plant *Silene latifolia*: evidence from new sex-linked genes. **Genetics**. 175: 1945-1954.
16. Bhojwani, S. S. y S. P. Bhatnagar. 1999. **The embryology of angiosperms**. Vilkas Publishing House PVT LTD, 4a Edición, Nueva Delhi, India.
17. Bowman, J. y D. Smyth. 1999. CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. **Development**. 126, 2387-2396.
18. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254.
19. Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. 2a Edición. Volúmen 1. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
20. Caporali, E., A. Carboni, M. Galli, G. Rossi, A. Spada y G. Marziani. 1994. Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. Search for a point of transition from hermaphroditic to unisexual developmental pathway. **Sexual Plant Reproduction**. 7, 239-249.

21. Caporali, E., A. Spada, A. Losa y G. Marziani. 2000. The MADS box gene *AOM1* is expressed in reproductive meristems and flowers of the dioecious species *Asparagus officinalis*. **Sexual Plant Reproduction**. 13, 151-156.
22. Caporali, E., A. Spada, G. Marziani, O. Failla y A. Scienza. 2003. The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* spp. *silvestris*. **Sexual Plant Reproduction**. 15, 291-300.
23. Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. **Heredity**. 88: 94-101.
24. Charlesworth, D., B. Charlesworth y G. Marais. 2005. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**. 95, 118-128.
25. Cheng, P., R. Greyson y D. Walden. 1983. Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. **American Journal of Botany**. 70, 450-462.
26. Chuck, G., R. Meeley, E. Irish, H. Sakai y S. Hake. 2007. The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1. **Nature Genetics**. 39, 1517-1521.
27. Colón-Carmona, A., R. You, T. Haimovitch y P. Doerner. 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. **The Plant Journal**. 20:503-508.
28. Coen, E. S. y E. M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**. 353, 31-37.
29. Coimbra, S., L. Torrão e I. Abreu. 2004. Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. **Plant Physiology and Biochemistry**. 42, 537-541.
30. Costich, D. y T. Meagher. 2001. Impacts of floral gender and whole-plant gender on floral evolution in *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae). **Biological journal of the Linnean Society**. 74, 475-487.
31. Dai, M., Y. Hu, Y. Zhao, H. Liu y D. Z. Zhou. 2007. A *WUSCHEL*-like homeobox gene represses a *YABBY* gene expression required for rice leaf development. **Plant Physiology**. 144, 380-390.
32. Danon, A. y P. Gallois. 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**. 437, 131-136.
33. de Nettancourt, D. 2001. Incompatibility and Incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, New York, USA. 232. pp.
34. Del Castillo, R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento de *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México.
35. Del Castillo, R. y M. González. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). **Agrociencia**. 71, 185-196.
36. Delichère, C., J. Veuskens, M. Hernould, N. Barbacar, A. Mouras, I. Negrutiu y F. Monegér. 1999. *SIY1*, the first active gene cloned from a plant Y chromosome, encodes a WD-repeat protein. **The EMBO Journal**. 15, 4169-4179.
37. Dellaporta, S.L. y A. Calderon-Urrea. 1994. The sex determination process in maize. **Science**. 266, 1501-1505.
38. DeLong, A., A. Calderon-Urrea y S. Dellaporta. 1993. Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. **Cell**. 74, 757-768.
39. Di Stilio, V., E. Kramer y D. Baum. 2005. Floral MADS box genes and homeotic gender dimorphism in *Thalictrum dioicum* (Ranunculaceae) - a new model for the study of dioecy. **The Plant Journal**. 41, 755-766.
40. Ehsan, H., J. P. Reichheld, T. Durfee y J. Roe. 2004. *TOUSLED* kinase activity oscillates during the cell cycle and interacts with chromatin regulators. **Plant Physiology**. 134, 1488-1499.
41. Eklund, M. 2009. *SHI/STY*-family members redundantly regulate auxin homeostasis in basal and higher plants. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Suecia. 84 pp.
42. Eklund, M. D., V. Ståldal, I. Valsecchi, I. Cierlik, C. Eriksson, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi, J. F. Sundström, M. Thelander, I. Ezcurra y E. Sundberg. 2010a. The *Arabidopsis thaliana* *STYLISH1* protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. **The Plant Cell**. 22, 349-363.
43. Eklund, M. D., M. Thelander, K. Landberg, V. Ståldal, A. Nilsson, M. Johansson, I. Valsecchi, E. R. A. Pederson, M. Kowalsczyk, K. Ljung, H. Ronne y E. Sundberg. 2010b. Homologues of the *Arabidopsis thaliana* *SHI/STY/LRP* genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss *Physcomitrella patens*. **Development**. 137: 1275-1284.

44. Endress, P. K. y J. A. Doyle. 2009. Reconstructing the ancestral angiosperm flower and its initial specializations. **American Journal of Botany**. 96, 22-66.
45. Endrizzi, K., B. Moussian, A. Haecker, J. Z. Levin y T. Laux. 1996. The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. **The Plant Journal**. 10, 967-979.
46. Ferrándiz, C., S. Pelaz y M. F. Yanofsky. 1999. Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. **Annual Review of Biochemistry**. 68, 321-354.
47. Filatov, D. 2005. Substitution rates in a new *Silene latifolia* sex-linked gene, *Slss X/Y*. **Molecular Biology and Evolution**. 22, 402-408.
48. Fleming, T.S.H., S. Maurice, S. Buchmann y M. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). **American Journal of Botany**. 81, 858-867.
49. Fourquin, C., M. Vinauger-Douard, B. Fogliani, C. Dumas y C. Scutt. 2005. Evidence that *CRABS CLAW* and *TOUSLED* have conserved their roles in carpel development since the ancestor of the extant angiosperms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 102, 4649-4654.
50. Fourquin, C., M. Vinauger-Douard, P. Chambrier, A. Berne-Dedieu y C. Scutt. 2007. Functional conservation between *CRABS CLAW* orthologues from widely diverged angiosperms. **Annals of Botany**. 100, 651-657.
51. Fridborg, I., S. Kuusk, M. Robertson y E. Sundberg. 2001. The *Arabidopsis* protein SHI represses gibberellin responses in *Arabidopsis* and barley. **Plant Physiology**. 127, 937-948.
52. Fridborg, I., S. Kuusk, T. Moritz y E. Sundberg. 1999. The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. **The Plant Cell**. 11, 1019-1031.
53. Ganders, E.R. y H. Kennedy. 1978. Gynodioecy in *Mammillaria dioica* (Cactaceae). **Madroño**. 25, 234.
54. Geber, M.A. 1999. Theories of the evolution of sexual dimorphism. En: Gerber, M.A., T.E. Dawson y L.F. Delph. (Eds.). **Gender and sexual dimorphism in flowering plants**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. pp. 97-122.
55. Gehring, M.E. y P.P. Koty. 2005. Detection of programmed cell death in cells exposed to genotoxic agents using a caspase activation assay. En: Keohavong, P. y S.G. Grant. (Eds.). **Molecular Toxicology Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 291. Humana Press Inc. Totowa, NJ. pp. 465-472.
56. Goda, H., E. Sasaki, K. Akiyama, A. Maruyama-Nakashita, K. Nakabayashi, et al. 2008. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. **Plant Journal**. 55, 526-42.
57. Gunawardena, A. H. L. A. N. 2008. Programmed cell death and tissue remodeling in plants. **Journal of Experimental Botany**. 59, 445-451.
58. Hall, A. E., Q. G. Chen, J. L. Findel, G. E. Schaller y A. B. Bleecker. 1999. The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. **Plant Physiology**. 121, 291-299.
59. Han, Z., G. Riefler, J. Saam, S. Mango y J. Schumacher. 2005. The *C. elegans* Tousled-like kinase contributes to chromosome segregation as a substrate and regulator of the Aurora B kinase. **Current Biology**. 15, 894-904.
60. Hardenack, S., D. Ye, H. Saedler y S. Grant. 1994. Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. **The Plant Cell**. 6, 1775-1787.
61. Hill, J. y E. Lord. 1989. Floral development in *Arabidopsis thaliana*: a comparison of the wild type and the homeotic pistillata mutant. **Canadian Journal of Botany**. 67, 2922-2936.
62. Hoffman, M.T. 1992. Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geographical range of floral dimorphism. **American Journal of Botany**. 79, 1382-1388.
63. Irish, E. y T. Nelson. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious plants. **The Plant Cell**. 1, 737-744.
64. Irish, E., J. Langdale y T. Nelson. 1994. Interactions between tassel seed genes and other sex determining genes in maize. **Developmental Genetics**. 15, 155-171.

65. Irish, V. F. 2010. The flowering of *Arabidopsis* flower development. **The Plant Journal**. 61, 1014-1028.
66. Jenuwein, T. y D. Allis. 2001. Translating the histone code. **Science**. 293, 1074-1080.
67. Jones, A., y J. L. Dangl. 1996. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. **Trends in Plant Science**. 1, 114-119.
68. Juarez, M. T., J. S. Kui, J. Thomas, B. A. Haller y M. C. P. Timmermans. 2004. microRNA-mediated repression of *rolled leaf1* specifies maize polarity. **Nature**. 428, 84-88.
69. Kamachi, S., H. Sekimoto, N. Kondo y S. Sakai. 1997. Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. **Plant and Cell Physiology**. 38, 1197-1206.
70. Khryanin, V. 2007. Evolution of the pathways of sex differentiation in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**. 54, 845-852.
71. Kim, J., H. Laparra, A. Calderón-Urrea, J. Mottinger, M. Moreno y S. Dellaporta. 2007. Cell cycle arrest of stamen initials in maize sex determination. **Genetics**. 177, 2547-2551.
72. Kinney, M., J. Columbus y E. Friar. 2008. Unisexual flower, spikelet, and inflorescence development in monoecious/dioecious *Bouteloua dimorpha* (Poaceae, Chloridoideae). **American Journal of Botany**. 95, 123-132.
73. Knopf, R. y T. Trebitsh. 2006. The female-specific Cs-ACS1G gene of cucumber. A case of gene duplication and recombination between the non-sex-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene and a branched-chain amino acid transaminase gene. **Plant Cell Physiology**. 47, 1217-1228.
74. Kuusk, S., J. Sohlberg, D. M. Eklund y E. Sundberg. 2006. Functionally redundant *SHI* family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. **The Plant Journal**. 47, 99-111.
75. Kuusk, S., J. Sohlberg, J. Long, I. Fridborg y E. Sundberg. 2002. *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. **Development**. 129, 4707-4717.
76. Kyte, J. y R. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**. 157, 105-132.
77. Lam, E. 2004. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. 5, 305-315.
78. Lardon, A., S. Georgiev, A. Aghmir, G. Le Merrer e I. Negrutiu. 1999. Sexual dimorphism in white campion: complex control of carpel number is revealed by Y chromosome deletions. **Genetics**. 151, 1173-1185.
79. Lebel-Hardenack, S., E. Hauser, T. Law, J. Schmid y S. Grant. 2002. Mapping of sex determination loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism. **Genetics**. 160: 717-725.
80. Lebel-Hardenack, S. y S.R. Grant. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. **Trends in Plant Science**. 2, 130-136.
81. Lee, J., S. Baum, J. Alvarez, A. Patel, D. Chitwood, y J. L. Bowman. 2005a. Activation of *CRABS CLAW* in the nectaries and carpels of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 17, 25-36.
82. Lee, Y., S. F. Baum, S. H. Oh, C. Jiang, C. Chen y J. L. Bowman. 2005b. Recruitment of *CRABS CLAW* to promote nectary development within the eudicot clade. **Development**. 132: 5021-5032.
83. Li, D., C. Blakey, C. Dewald y S. Dellaporta. 1997. Evidence for a common sex determination mechanism for pistil abortion in maize and its wild relative *Tripsacum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 94: 4217-4222.
84. Li, Y., R. DeFatta, C. Anthony, G. Sunavala y A. De Benedetti. 2001. A translationally regulated *Tousled* kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed. **Oncogene**. 20, 726-738.
85. Lindsay, G. y E.Y. Dawson. 1952. Mammillarias of the islands off northwestern Baja California, Mexico. **Cactus and Succulent Journal (Los Angeles)**. 24, 76-84.
86. Little, H., E. Papadopoulou, S. Hammar y R. Grumet. 2007. The influence of ethylene perception on sex expression in melon (*Cucumis melo* L.) as assessed by expression of the mutant ethylene receptor, *At-etr1-1*, under the control of constitutive and floral targeted promoters. **Sexual Plant Reproduction**. 20, 123-136.

87. Lockshin, R. A. y Z. Zakeri. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 36, 2405–2419.
88. Malcomber, S. y E. Kellogg. 2006. Evolution of unisexual flowers in grasses (Poaceae) and the putative sex-determining gene *TASSELSEED2* (*TS2*). **New Phytologist**. 170, 885-899.
89. Marsch-Martinez, N., R. Greco, J. Becker, S. Dixit, J. Bergervoet, A. Karaba, S. de Folter y A. Pereira. 2002. *BOLITA*, an *Arabidopsis* AP2/ERF-like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. **Plant Molecular Biology**. 62, 825-843.
90. Matsunaga, S. y S. Kawano. 2001. Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. **Plant Biology**. 3, 481-4888.
91. Matsunaga, S., S. Kawano, H. Takano, H. Uchida, A. Sakai y T. Kuroiwa. 1996. Isolation and developmental expression of male reproductive organ-specific genes in a dioecious campion, *Melandrium album* (*Silene latifolia*). **The Plant Journal**. 10, 679-689.
92. Mauseth, J. D. 1988. Plant anatomy. Benjamin/Cummings, California, USA.
93. McCabe P.F. y Leaver C.J. 2000. Programmed cell death in cell cultures. **Plant Molecular Biology**, 44, 359–368.
94. Meikrantz, W. y R. Schlegel. 1995. Apoptosis and the cell cycle. **Journal o Cell Biochemistry**. 58: 160-174.
95. Meister, R., H. Oldenhof, J. Bowman y C. Gasser. 2005. Multiple protein regions contribute to differential activities of YABBY proteins in reproductive development. **Plant Physiology**. 137, 651-662.
96. Mibus, h. y T. Tatlioglu. 2004. Molecular characterization and isolation of the *F/f* gene for femaleness in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**. 109, 1669-1676.
97. Mitchell, C. y P. Diggle. 2005. The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. **American Journal of Botany**. 92, 1068-1076.
98. Mittler R, y Lam E. 1997. Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. **Plant Molecular Biology**, 34, 209–221.
99. Moore, R., O. Kozyreva, S. Lebel-Hardenack, J. Siroky, R. Hobza, B. Vyskot y S. Grant. 2003. Genetic and functional analysis of *DD44*, a sex-linked gene from the dioecious plant *Silene latifolia*, provides clues to early events in sex chromosome evolution. **Genetics**. 163, 321-334.
100. Nemhauser, J. L., L. J. Feldman y P. C. Zambryski. 2000. Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. **Development**. 127, 3877-3888.
101. Nicolas, M., G. Marais, V. Hykelova, B. Janousek, V. Laporte, B. Vyskot, D. Mouchiroud, I. Negrutiu, D. Charlesworth y F. Monéger. 2005. A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. **PLoS Biology**. 3, 47-56.
102. Papadopoulou, E., H. Little, S. Hammar y R. Grumet. 2005. Effect of modified endogenous ethylene production on sex expression, bisexual flower development and fruit production in melon (*Cucumis melo* L.). **Sexual Plant Reproduction**. 18, 131-142.
103. Paponov, I. A., M. Paponov, W. Teale, M. Menges, S. Chakrabortee, J. A. H. Murray y K. Palme. 2008. Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**. 1, 321-337.
104. Renner, S. y Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. **American Journal of Botany**. 82, 596-606.
105. Richie, C. y A. Golden. 2005. Chromosome segregation: Aurora B gets Tousled. **Current Biology**. 15, R379-R382.
106. Roe, J., C. Rivin, R. Sessions, K. Feldmann y P. Zambryski. 1993. The *Tousled* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. **Cell**. 75, 939-950.
107. Roe, J., J. Nemhauser y P. Zambryski. 1997. *TOUSLED* participates in apical tissue formation during gynoecium development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. 9, 335-353.
108. Rogers, H. J. 2005. Cell death and organ development in plants. **Current Topics in Developmental Biology**. 71: 225–261.
109. Rudich, J., A.H. Halevy y N. Kedar. 1972. Ethylene evolution from cucumber plants as related to sex expression. **Plan Physiology**. 49, 998-999.

110. Saito, S., N. Fujii, Y. Miyazawa, S. Yamasaki, S. Matsuura, H. Mizusawa, Y. Fujita y H. Takahashi. 2007. Correlation between development of female flower buds and expression of the CS-ACS2 gene in cucumber plants. **Journal of Experimental Botany**. 58, 2897-2907.
111. Sakata, T., T. Oshino, S. Miura, M. Tomabechi, Y. Tsunaga, N. Higashitani, Y. Miyazawa, H. Takahashi, M. Watanabe y A. Higashitani. 2010. Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 107, 8569-8574.
112. Salman, A., A. Levi, S. Wolf y T. Trebitsh. 2008. ACC synthase genes are polymorphic in watermelon (*Citrullus* spp.) and differentially expressed in flowers and in response to auxin and gibberellin. **Plant and Cell Physiology**. 49, 740-750.
113. Sarojam, R., P. G. Sappl, A. Goldshmidt, I. Efroni, S. K. Floyd, Y. Eshed y J. L. Bowman. 2010. Differentiating Arabidopsis shoots from leaves by combined YABBY activities. **Plant Cell**. 22, 2113-2130.
114. Sather, D., A. York, K. Pobursky y E. Golenberg. 2005. Sequence evolution and sex-specific expression patterns of the C class floral identity gene, *SpAGAMOUS*, in dioecious *Spinacia oleracea* L. **Planta**. 222, 284-292.
115. Sawa, S., I. Ito, Y. Shimura y K. Okada. 1999. *FILAMENTOUS FLOWER* controls the formation and development of Arabidopsis inflorescences and floral meristems. **Plant Cell**. 11, 69-86.
116. Sessions, R. y P. Zambryski. 1995. Arabidopsis gynoeceum structure in the wild type and in *ettin* mutants. **Development**. 121, 1519-1532.
117. Shi, L., I. Miller y R. Moore. 1993. Immunocytochemical localization of indole-3-acetic acid in primary roots of *Zea mays*. **Plant, Cell & Environment**. 16: 967-973.
118. Shishkova, S. y J. G. Dubrovsky. 2005. Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran desert Cactaceae. **American Journal of Botany**. 92: 1590-1594.
119. Siegfried, K., Y. Eshed, S. Baum, D. Otsuga, G. Drews y J. Bowman. 1999. Members of the YABBY family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. **Development**. 126, 4117-4128.
120. Smyth, D., J. Bowman y E. Meyerowitz. 1990. Early flower development in Arabidopsis. **The Plant Cell**. 2, 755-767.
121. Sohlberg, J., M. Myrenas, S. Kuusk, U. Lagercrantz, M. Kowalczyk, G. Sandberg y E. Sundberg. 2006. *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoeceum. **The Plant Journal**. 47, 112-123.
122. Soltis, P. S., S. F. Brockington, M. Yoo, A. Piedrah, M. Latvis, M. J. Moore, A. S. Chanderbali y D. E. Soltis. 2009. Floral variation and floral genetics in basal angiosperms. **American Journal of Botany**. 96, 110-128.
123. Ståldal V., J. Sohlberg, D. Eklund, K. Ljung y E. Sundberg. 2008. Auxin can act independently of *CRC*, *LUG*, *SEU*, *SPT* and *STY1* in style development but not apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoeceum. **New Phytologist**. 180, 798-808.
124. Strittmatter, L. I., V. Negrón-Ortiz y R. J. Hickey. 2006. Comparative microsporangium development in male-fertile and male sterile flowers of *Consolea* (Cactaceae): When and how does pollen abortion occur. **Grana**. 45, 81-100.
125. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. 24, 1596-1599.
126. Thompson, J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22, 4673-4680.
127. Trigueros, M., M. Navarrete-Gómez, S. Sato, S. K. Christensen, S. Pelaz, D. Weigel, M. F. Yanofsky y C. Ferrándiz. 2009. The *NGATHA* genes direct style development in the Arabidopsis gynoeceum. **The Plant Cell**. 21, 1394-1409.
128. Trebitsh, T., J. Rudich y J. Rivov. 1987. Auxin, biosynthesis of ethylene and sex expression in cucumber (*Cucumis sativus*). **Plant Growth Regulation**. 5, 105-113.
129. Trebitsh, T., J. Staub y S. O'Neill. 1997. Identification of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the female (F) locus that enhances female sex expression in cucumber. **Plant Physiology**. 113, 987-995.
130. Toriba, T., K. Harada, A. Takamura, H. Nakamura, H. Ichikawa, T. Suzaki y Y. Hirano. 2007. Molecular characterization the YABBY gene family in *Oryza sativa* and expression analysis of *OsYABBY1*. **MGG Molecular Genetics and Genomics**. 277, 457-468.

131. Tsuchisaka, A. y A. Theologis. 2004. Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. **Plant Physiology**. 136, 2892-3000.
132. Ullah, H., J. G. Chen, B. Temple, D. C. Boyes, J. M. Alonso, K. R. Davies, J. R. Ecker y A. M. Jones. 2003. The  $\beta$ -subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. **The Plant Cell**. 15: 393-409.
133. Valiente, A., A. Rojas, M. del Coro y P. Dávila. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. **American Journal of Botany**. 84, 452-455.
134. van Doorn, W. G. y E. J. Woltering. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **TRENDS in Plant Science**. 10, 117-122.
135. Vicient, C. M. y M. Delseny. 1999. Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. **Analytical Biochemistry**. 268, 412-413.
136. Vogler, D.W. y S. Kalisz. 2001. The flowers: the distribution of plant mating systems. **Evolution**. 55, 202-204.
137. Vroemen, C. W., A. P. Mordhorst, C. Albrecht, M. A. C. J. Kwaaitaal y S. C. de Vries. 2003. The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in Arabidopsis. **The Plant Cell**. 15, 1563-1577.
138. Wang, Y., J. Liu, R. Xia, J. Wang, J. Shen, R. Cao, X. Hong, J. K. Zhu y Z. Gong. 2006. The protein kinase TOUSLED is required for maintenance of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. **EMBO Reports**. 8, 77-83.
139. Watanabe, K. y K. Okada. 2003. Two discrete *cis* elements control the abaxial side-specific expression of the *FILAMENTOUS FLOWER* gene in Arabidopsis. **Plant Cell**. 15, 2592-2602.
140. Weiblen, G., R. Oyama y M. Donoghue. 2000. Phylogenetic analysis of dioecy in monocotyledons. **The American Naturalist**. 155, 46-58.
141. Weigel, D. y E. M. Meyerowitz. 1994. The ABCs of floral homeotic genes. **Cell**. 78, 203-209.
142. Wellmer, F., J. Riechmann, M. Alves y E. Meyerowitz. 2004. Genome-wide analysis of spatial gene expression in Arabidopsis flowers. **The Plant Cell**. 16, 1314-1326.
143. Wu, H. M. y A. Y. Cheng. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. **Plant Molecular Biology**. 44, 267-281.
144. Wu, T., Z. Qin, X. Zhou, Z. Feng y Y. Du. 2010. Transcriptome profile analysis of floral sex determination in cucumber. **Journal of Plant Physiology**. 167, 905-913.
145. Wu, X., S. Knapp, A. Stamp, D. Stammers, H. Jörnvall, S. Dellaporta y U. Oppermann. 2007. Biochemical characterization of TASSELSEED 2, an essential plant short-chain dehydrogenase/reductase with broad spectrum activities. **FEBS Journal**. 274, 1172-1182.
146. Yamamoto, Y., F. Girard, B. Bello, M. Affolter y W.J. Gehring. 1997. The *cramped* gene of *Drosophila* is a member of the *Polycomb*-group, and interacts with *mus209*, the gene encoding Proliferating Cell Nuclear Antigen. **Development**. 124, 3385-3394.
147. Yamasaki, S., N. Fujii y H. Takahashi. 2003. Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants. **Sexual Plant Reproduction**. 16, 103-111.
148. Yan, J., X. Cai, J. Luo, et al. 2010. The *REDUCED LEAFLET* genes encode key components of the *trans*-acting small interfering RNA pathway and regulate compound leaf and flower development in *Lotus japonicas*. **Plant Physiology**. 152, 797-807.
149. Yanofsky, M. F. H., J. Bowman, K. Feldmann y E. Meyerowitz. 1990. The protein encoded by the Arabidopsis gene *agamous* resembles transcription factors. **Nature**. 346: 35-39.
150. Yin, T. y J. Quinn. 1995. Test of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). **American Journal of Botany**. 82: 1537-1546.
151. Zarembinski, T. y A. Theologis. 1994. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. **Plant Molecular Biology**. 26, 1579-1597.
152. Zhao, Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**. 61: 49;64.
153. Zhao, W., H. Y. Su, J. Song, X. Y. Zhao y X. S. Zhang. 2006. Ectopic expression of *TaYAB1*, a member of YABBY gene family in wheat, causes the partial abaxialization of the adaxial epidermises of leaves and arrests the development of shoot apical meristem in Arabidopsis. **Plant Science**. 170, 364-371.

154. Zhu, Y., J. Fu, J. Zhang, T. Liu, Z. Jia, J. Wang, Y. Jin, Y. Lian, M. Wang, J. Zheng, W. Hou y G. Wang. 2009. Genome-wide analysis of gene expression profiles during ear development of maize. **Plant Molecular Biology**. 70, 63-77.
155. Zluvova, J., M. Nicolas, A. Berger, I. Negrutiu y F. Monéger. 2006. Premature arrest of the male flower meristem precedes sexual dimorphism in the dioecious plant *Silene latifolia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 103, 18854-18859.

# Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*

Gregorio Orozco-Arroyo · Sonia Vázquez-Santana ·  
Aldebaran Camacho · Joseph G. Dubrovsky ·  
Felipe Cruz-García

Received: 6 December 2011 / Accepted: 26 January 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** In *Opuntia stenopetala*, flowers initiate as hermaphrodite; however, at maturity, only the stamens in male flowers and the gynoecium in female flowers become functional. At early developmental stages, growth and morphogenesis of the gynoecium in male flowers cease, forming a short style lacking stigmatic tissue at maturity. Here, an analysis of the masculinization process of this species and its relationship with auxin metabolism during gynoecium morphogenesis is presented. Histological analysis and scanning electron microscopy were performed; auxin levels were immunoanalyzed and exogenous auxin was applied to developing gynoecia. Male flower style-tissue patterning revealed morphological defects in the vascular bundles, stylar canal, and transmitting tissue. These features are similar to those observed in

*Arabidopsis thaliana* mutant plants affected in auxin transport, metabolism, or signaling. Notably, when comparing auxin levels between male and female gynoecia from *O. stenopetala* at an early developmental stage, we found that they were particularly low in the male gynoecium. Consequently, exogenous auxin application on male gynoecia partially restored the defects of gynoecium development. We therefore hypothesize that, the arrest in male flower gynoecia patterning could be related to altered auxin homeostasis; alternatively, the addition of auxin could compensate for the lack of another unknown factor affecting male flower gynoecium development.

**Keywords** Auxin · Dioecy · Floral development · Gynoecium development · Reproductive biology · Unisexuality

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00425-012-1602-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. Orozco-Arroyo · F. Cruz-García (✉)  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Av. Universidad 3000. Col. Universidad Nacional  
Autónoma de México, 04510 Mexico, D.F., Mexico  
e-mail: fcg@unam.mx

S. Vázquez-Santana · A. Camacho  
Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Av. Universidad 3000. Col. Universidad Nacional  
Autónoma de México, 04510 Mexico, D.F., Mexico

J. G. Dubrovsky  
Departamento de Biología Molecular de Plantas,  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

## Introduction

The physical proximity of sexual organs in hermaphrodite flowers represents a self-pollination problem, which many species have solved by developing physical, physiological or genetic barriers to encourage out-crossing (for a review see Barret 2002). One of these strategies comprises the separation of male and female reproductive organs into different unisexual flowers, which may occur in the same (monoecy) or in different (dioecy) individuals (Delph 2009). Most dioecious species go through a hermaphroditic stage early in flower development, where the floral meristem contains both the stamen and carpel primordia (Ainsworth 2000; Mitchell and Diggle 2005). However, at more advanced stages, one of the sexual organs arrests its development before the other matures (Mitchell and Diggle 2005). Under this scenario, species with unisexual flowers

develop male flowers with rudiments of the gynoecium and female flowers with rudimentary stamens. Organ degeneration occurs at a precise and species-dependent developmental stage (Balk and Leaver 2001; Caporali et al. 2003; Coimbra et al. 2004), probably as a consequence of an alteration in the genetic pathway that regulates the molecular control of either gynoecium, or androecium growth and/or differentiation. Molecular control of flower development has been extensively studied, primarily in *A. thaliana*. Several mutations affecting *A. thaliana* gynoecium development have been described. Some of these affect gynoecium organ identity and others gynoecium tissue patterning, including marginal tissues as septum, placenta, ovules, style, and stigma. The plant hormone auxin has been revealed as an essential factor in the control of flower development, especially during gynoecium development, as demonstrated when polar auxin transport (PAT) or auxin signaling is inhibited (Okada et al. 1991; Bennett et al. 1995; Sessions et al. 1997; Zhao 2010). Nemhauser et al. (2000) demonstrated that when PAT is impaired, several structural defects, including those in the apical and basal regions of the gynoecium, emerge.

In angiosperms, unisexuality seems to have evolved independently in different lineages (Renner and Ricklefs 1995). In the Cactaceae family, to date, there are 26 reported species, distributed among three of the four subfamilies, which develop unisexual flowers (Table S1). Most of these show non-functional vestiges of the opposite sex at anthesis (Lindsay and Dawson 1952; Bravo-Hollis 1978; Kimmach 1982; Leuenberger 1986; Del Castillo and González 1988; Hoffman 1992; Fleming et al. 1994; Valiente-Banuet et al. 1997; Strittmatter et al. 2002). The study of the mechanisms involved in unisexuality in Cactaceae species is an attractive model system because early evolutionary stages of the unisexuality process can be observed, probably due to the relatively recent origin of this family (Hershkovitz and Zimmer 1997; Nyffeler 2002; Edwards et al. 2005). Most of the previous work on unisexuality has focused on ecological aspects (Del Castillo 1986; Fleming et al. 1994) and embryological studies of dioecious species are scarce. In fact, only the subdioecious cactus *Consolea spinosissima* has been studied at morphological and embryological level (Strittmatter et al. 2002, 2008). Natural populations of *C. spinosissima* display three floral morphs: male, female, and weak hermaphrodite (morphologically hermaphrodite flowers in which ovules at anthesis are papery). All morphs start their development as a hermaphrodite, although at maturity only the male and female morphs are differentiated as unisexual individuals (Strittmatter et al. 2002). Regardless of this valuable information, more physiological and developmental information is needed to elucidate the evolutive forces that lead to unisexuality in Cactaceae.

In this work we report the early stages of male flower development in the dioecious cactus *O. stenopetala* Englem and their relationship with auxin homeostasis. The data showed an arrest in gynoecium morphogenesis that leads to a decrease in ovary size, ovule abortion, and a lack of stigmatic tissue formation, which together lead to the loss of the female function. The male flower gynoecium exhibits poor differentiation in vascular bundles and a diminished amount of both transmitting tissue and stylar canal. These defects are commonly observed in mutant plants defective in auxin homeostasis. Indeed, quantification by immunodetection of the main auxin, indole-3-acetic acid (IAA), revealed that at a stage prior to stigma formation, IAA content was greater in female than in male gynoecia. Furthermore, exogenous application of auxin to male flower developing gynoecia promoted stigmatic tissue formation, reverting some morphogenetic defects in the stylar structure and stimulating ovule development in ovaries of male flowers. Our data indicate that gynoecium developmental arrest in male flowers may be a consequence of lower auxin levels, which concomitantly affect gynoecium patterning and morphogenesis.

## Materials and methods

### Plant material

*Opuntia stenopetala* plants were sampled in Querétaro, Mexico. An area of 8,000 m<sup>2</sup> was analyzed and 98 plants in bloom were found. All flowering individuals were sexed at anthesis based on the terminology of Sakai and Weller (1999). In brief, plants were considered male when bearing staminate flowers, and female when bearing pistillate flowers. At anthesis staminate flowers were recognized because its gynoecium presents no stigmatic lobes and a reduced/absent ovary. The ovary filled with ovules and the presence of a multi-lobed stigma was used to recognize female flowers. At least three flowers per individual were analyzed to determine its gender. Based on the length of the floral bud, three main stages of development were defined: (1) buds from 7 to 9.5 mm were defined as early development, (2) buds from 14 to 17.5 mm as middle development, and (3) floral anthesis as the mature development stage.

### Histology and scanning electron microscopy

Flowers and floral buds at different developmental stages were fixed in FAA (formalin:acetic acid:50% alcohol 1:2:17) for light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Plant material was dehydrated in an ascending series of ethanol and embedded in either Paraplast plus (Leica) or LR-White resin (Electron Microscopy Sciences).

The Paraplast sections were 7–12  $\mu\text{m}$  thick, and the LR-White sections were 1–2  $\mu\text{m}$  thick. Both section types were stained with safranin and fast-green, or with 0.01% toluidine blue. Histological analysis was performed in at least five gynoecia per gender. For the SEM studies, buds and flowers at anthesis were dissected to expose the sexual organs. Fixed material was dehydrated to critical point by an ethanol series and  $\text{CO}_2$ , mounted, coated with gold and observed in either a Jeol JSM-5310LV or Hitachi S-2460N scanning electron microscope. For clarity, digital images were artificially colored using Adobe Photoshop Version 10 (Adobe Systems Inc.).

#### Indole-3-acetic acid (IAA) immunodetection

Male and female floral buds from different developmental stages and flowers at anthesis were fixed for 4 h at 4°C with aqueous 3% (w/v) *N*-(3-dimethylethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide-HCl (Sigma) and then with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After dehydration in a graded series of ethanol, the tissues were embedded in Paraplast, sectioned at 10  $\mu\text{m}$  thickness and mounted on Superfrost microscope slides (Fisher). The sections were dewaxed in SlideBrite (Biocare Medical), hydrated in a decreasing ethanol series and rinsed in PBS. The sections were incubated in blocking solution (3% bovine albumin serum, 0.1% Triton X-100, in PBS) for 4 h at 4°C and then, incubated for 16 h with the monoclonal anti-IAA antibody (Sigma) at a 1:50 dilution. Indole 3-acetic acid was detected with secondary antibodies labeled with Alexa 568 (Invitrogen). Control sections were prepared following the same procedure, although either the primary antibody, the secondary antibody or both antibodies were omitted. Immunofluorescence was analyzed by a confocal laser-scanning microscope (Olympus FV-1000). For each analyzed stage, three male and three female flowers from three different plants were used to perform the IAA immunolocalization and the result of one representative experiment is shown. The fluorescence intensity of the IAA signal was measured using Macnification software, version 1.7.1 (Orbicule). From each analyzed gynoecium, three apical, three medial, and three basal areas were selected. Fluorescence intensity values were averaged and standardized to the corresponding female flowers gynoecia sections.

#### Local auxin applications

Micro-applications of auxin were performed as described by Reinhardt et al. (2000). In brief, 100  $\mu\text{M}$  1-naphthaleneacetic acid (NAA; Sigma) prepared from a DMSO-based stock solution was diluted in pre-warmed (50°C) lanolin containing 2.5% paraffin to reach final concentrations of 5 and 25  $\mu\text{M}$  NAA in a resulting lanolin paste.

1-naphthaleneacetic acid was preferred over other synthetic or natural auxin molecules because of its membrane diffusion properties (Delbarre et al. 1996), which make it more suitable to use on the thick cuticle of cacti epidermal cells. The negative control treatment was performed only with the lanolin/paraffin mixture supplemented with DMSO concentrations corresponding to those in lanolin paste. Male and female plants with floral buds at the middle development stage, growing in natural populations, were selected and buds were partially dissected to expose the styler and stigmatic tissues. The lanolin paste was manually administered to the apical ends of the developing gynoecia with a micro spatula. The buds were then covered with the tissue that was previously removed. Stems carrying the treated floral buds were removed from the plant, and then transferred to and maintained under greenhouse conditions. After 7 days, gynoecia were dissected and prepared for SEM analysis or histological sections as described above. The 5- and 25- $\mu\text{M}$  NAA applications were performed in 14 and 22 male floral buds, respectively.

Injections with 50  $\mu\text{l}$  of 5 or 25  $\mu\text{M}$  NAA at the base of the ovary were performed in 23 and 41 male floral buds, respectively, from male plants with an incomplete ovule development. The NAA treatments were injected to out-of-sight ovaries and ovules at middle stage of floral development. After 7 days, the ovaries were dissected and prepared for SEM analysis.

## Results

### *Opuntia stenopetala* sexual dimorphism in natural populations

The cactus *O. stenopetala* produces male and female flowers in separate individuals, thus forming dioecious populations (Fig. 1a). To determine the gender distribution in the field, the *O. stenopetala* population was sexed. A total of 60 male and 38 female plants were counted. Female plants produced only pistillate flowers (Fig. 1b), and presented a gynoecium with a style bearing between 6 and 12 stigmatic lobes, which are covered with multiple stigmatic papillae at the top. In these flowers, the gynoecium is situated above the non-functional stamens, which lack pollen grains. Only female plants were capable of setting fruit. Male individuals only produced staminate flowers (Fig. 1c) that possessed an androecium with viable pollen grains. The gynoecium was positioned under the stamens and displayed a reduced style without any stigmatic lobes or stigmatic papillae.

As many species that develop unisexual flowers (Mitchell and Diggle 2005), male and female flower buds of *O. stenopetala* initiate their development with both stamen and carpel primordia. In early developmental stages, female and male



**Fig. 1** *Opuntia stenopetala*. **a** Plant in natural population. **b** Apical view of a female flower. **c** Lateral view of a male flower

buds were very similar to each other (Fig. 2a, b, respectively) with stamen primordia surrounding carpel primordia. However, later in development, although the androecium was morphologically similar in both types of flowers, the gynoecium showed considerable differences. In female flowers, we observed that the apex of the carpel primordia fused to form the style, and cell division occurred in the uppermost region to form the stigmatic tissue with papillary cells (Fig. 2c). In contrast, carpel fusion was incomplete in the apical region of the gynoecium of male flowers; instead, slight bifurcations were detected in the style apex (Fig. 2d). At anthesis, female flowers possessed a conspicuous stigma (Fig. 2e); however, in all of the male flowers analyzed ( $n \approx 500$ , Fig. 2f), the gynoecium was reduced and the stigma was absent (Fig. 3f–h). Regarding the androecium, at anthesis male flower anthers (Fig. 2f) produced pollen, although anthers of female flowers did not and appear to have collapsed.

Female flowers presented just one morph, characterized by a well-developed gynoecium (Fig. 3a, e, i) and collapsed anthers without pollen (Fig. 3e). In male flowers, three floral morphs could be distinguished, although only one type of floral morph was produced per male plant (Fig. 3b–d). When compared with the female flower (Fig. 3i), the predominant male floral morph ( $\sim 60\%$  of individuals) was characterized by a considerably reduced ovary with a small number of incompletely developed ovules at its base (Fig. 3j). A second male flower morph ( $\sim 30\%$  of individuals) presented empty ovaries (Fig. 3k); while the remaining male individuals ( $\sim 10\%$ ) exhibited a greatly reduced ovary with a very slim crack instead (Fig. 3l).

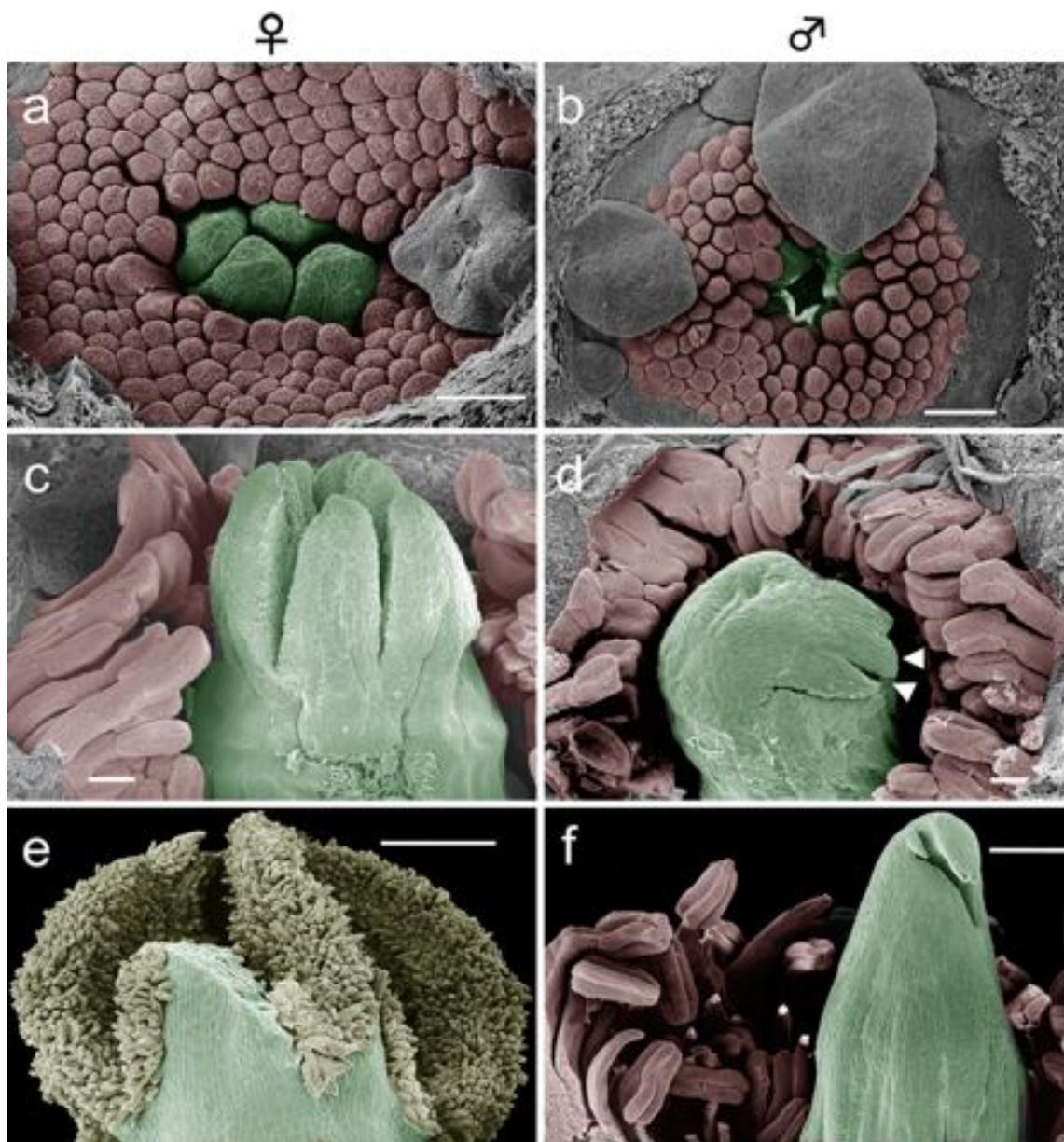
#### Sexual differentiation of style-tissue patterning and structure

To determine the differences in style-tissue pattern and structure between mature male and mature female flowers, histological sections of the basal, middle, and apical

regions of the style were analyzed in mature flowers. At the base of the style in female flowers, the outermost layer corresponded to an epidermis, followed by a subepidermal layer and the cortical parenchyma, which contained vascular bundles (Fig. 4a). At the center, a group of small cells form the transmitting tissue that defines the stylar canal, which was barely open at this level. In the cortex, a few cells with presumably mucilaginous content, characterized by a dense staining, could be observed. In male flowers, the basal region of the style was composed of the same cell strata observed in the female flower style but with conspicuous differences (Fig. 4d). Most of the cells in the cortex were filled with mucilage, and were larger than those observed in styles of the female flowers. Transmitting tissue and vascular bundles were not easy to identify because they were reduced and not fully differentiated (arrowheads in Fig. 4d). In contrast, vascular bundles were formed at the periphery of the transmitting tissue, i.e., closer to the style center than those in female flowers.

Sections from the middle region of the style showed that in female flowers, the stylar canal had reached its maximum area and was lined by an epidermis and a well-developed transmitting tissue characterized by small, tightly packed cells (Fig. 4b). Within the stylar canal, the epidermal cells were intensely stained, resembling stigmatic papillae. In male flowers, median region sections of the style (Fig. 4e) showed maintenance of an organization very similar to that observed in the basal sections (Fig. 4d), exhibiting transmitting tissue and vascular bundles that remained difficult to distinguish.

The apical part of the female flower style diverged to form the stigmatic lobes, where epidermal cells gave rise to stigmatic papillae, which were intensely stained (Fig. 4c). In contrast, transverse sections of the style apex in male flowers revealed that the carpels did not fully fuse at this point and the stigmatic tissue was not formed (Fig. 4f).



**Fig. 2** Flower development in *O. stenopetala*. **a, b** Early flower development. **a** The female floral bud. The stamen (red) and carpel (green) primordia are initiated. **b** The male floral bud showing the stamen primordia (red), which surround the central and incompletely unfused carpel primordia (green). **c, d** The middle stage of flower development. **c** The female floral bud. The style has branched at the apex to form the stigmatic lobes (green). **d** The male floral bud. The

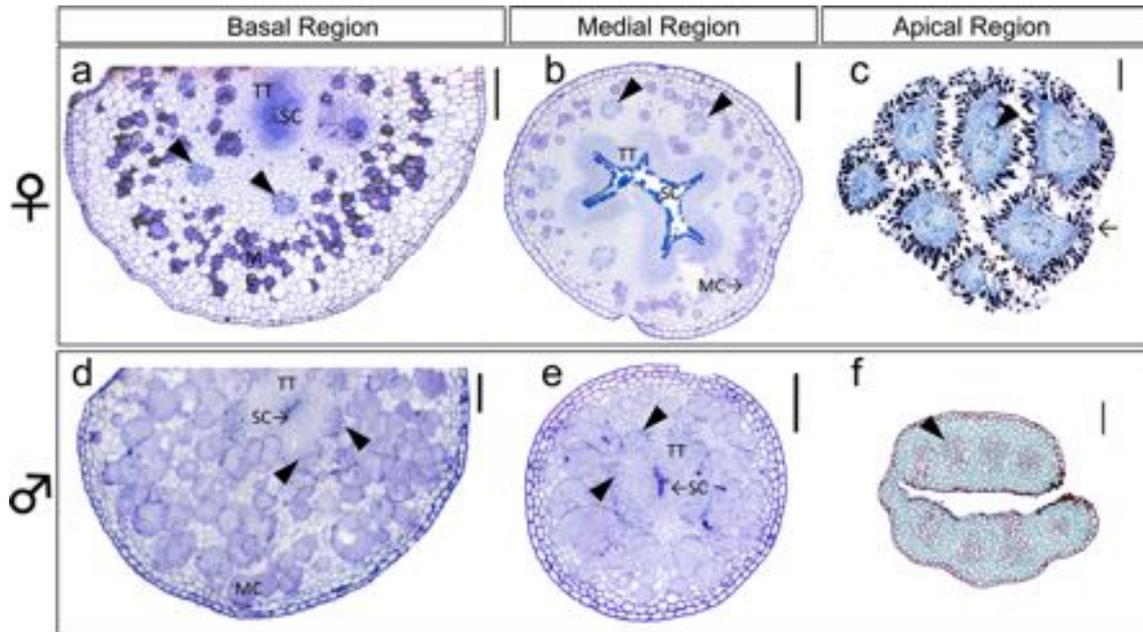
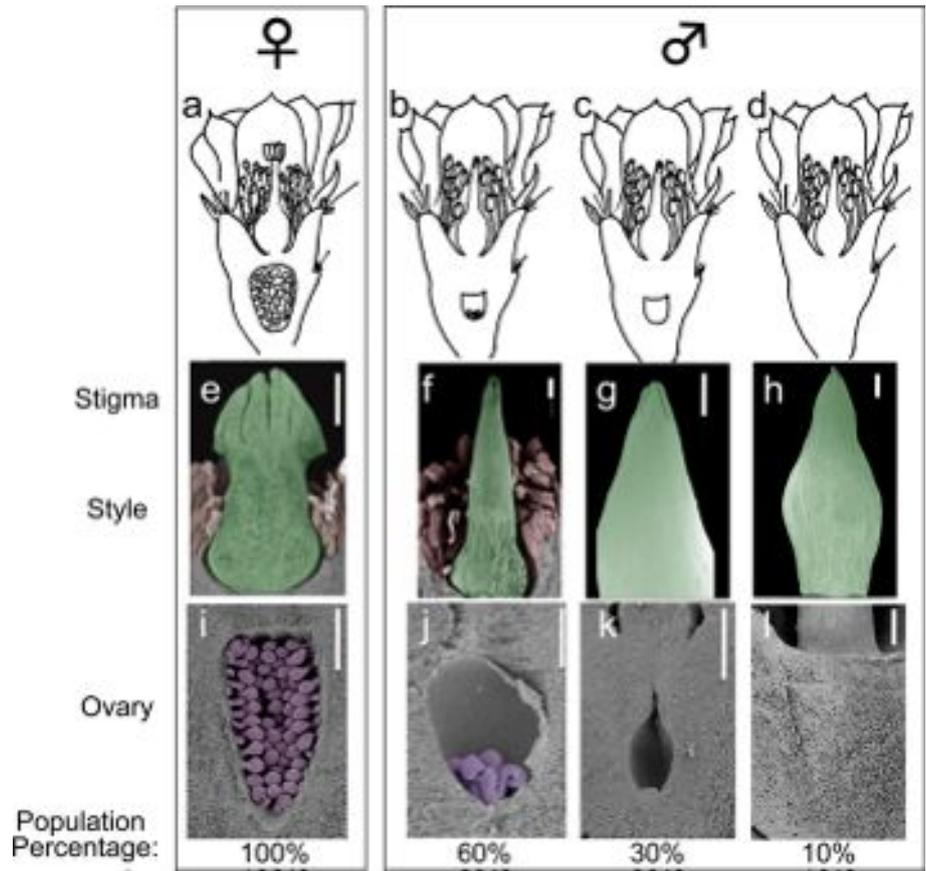
stigmatic tissue is not developed, instead, slight bifurcations (arrow-head) are observed at the apex. **e, f** The apical region of mature flower gynoecia. **e** The female flower gynoecium. The style (green) branches to produce stigmatic tissue (yellow). **f** The male flower gynoecium. The style (green) has arrested its development, and no stigmatic tissue is visible. The stamens (red) are fully developed. Bars 100  $\mu\text{m}$  (**a–d**), 500  $\mu\text{m}$  (**e, f**)

#### Ovule development in *O. stenopetala*

In the female flowers, small protuberances arise from the placentae arranged in a double row (Fig. 5a). The growth of these nucelli results in its bending, at the time that the outer and inner integuments start to differentiate (Fig. 5b). Later in development, the funiculus begins to encase the ovule (Fig. 5c) until completely enclosed it (Fig. 5d). At maturity,

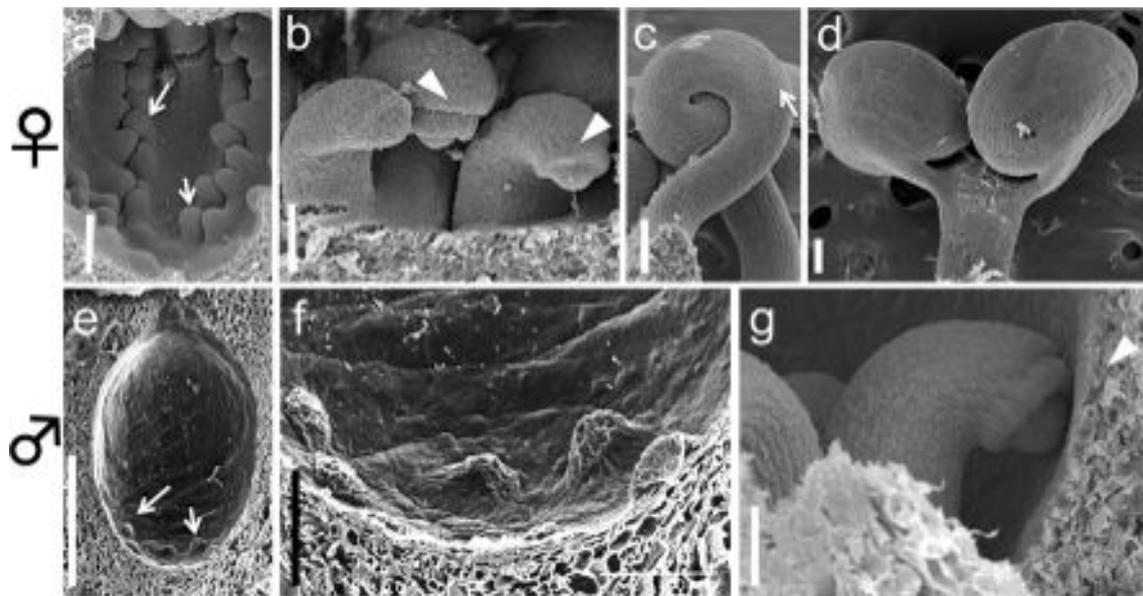
female flower ovules are campylotropous. In male flowers that develop ovules, few protuberances, nucellus-like, emerge only at the base of the ovary (Fig. 5e, f). These ovule primordia remain undifferentiated until anthesis (Fig. 6c). Notably, after analyzing around 50 mature male flowers from different plants, we found the formation of the integuments in the ovule primordia in only two individual plants (Fig. 5g). No further stages of development were detected.

**Fig. 3** Floral morphs in a natural population of *O. stenopetala*. **a–d** A schematic representation of the female (**a**) and the three male (**b–d**) floral morphs. **e–l** SEM images of the female morph showing the style and stigma (**green**) and stamens (**red**, **e**) and male morph showing the style without stigma (**f–h**). The ovary in female flowers is filled with ovules (**violet**, **i**). The size of the ovaries in male flowers is different in the three floral morphs: a reduced ovary with few, non-functional ovules at the base (**violet**, **j**), a reduced empty ovary (**k**) or no ovary (**l**). The percentage of plants bearing each morph is indicated. Bars 1 mm (**e**, **i**), 200  $\mu$ m (**f–h**), 500  $\mu$ m (**j–l**)



**Fig. 4** Tissue patterning differences between styles in male and female flowers. **a–c** The style in female flowers. **a** In the basal region. *Arrow* mucilage cells. **b** The median region is almost identical to the basal one. **c** In apical region. *Arrow* stigmatic papillae. **d–f** The style in male flowers. **d** In the basal region

**(e)** in the medial style region **(f)** and in the apical region. *Arrowheads* indicate the position of vascular bundles in **(a)–(f)**. *SC* stylar canal, *TT* transmitting tissue, *MC* mucilage cell. Bars 100  $\mu$ m (**c**, **f**), 200  $\mu$ m (**a**, **b**, **d**, **e**)



**Fig. 5** Ovule development in *O. stenopetala*. **a–d** Ovule development in female flowers. **a** Emergence of several nucellus (arrows) from the placentae. **b** Inner and outer integument (arrowheads) development in ovule primordia. **c** Funiculus (arrow) starts to grow and covers the rest of the ovule. **d** Mature ovules with encasing

funiculus. **e–g** Ovule development in male flowers. **e** Emergence of some nucellus (arrows) only at the base of the ovary. **f** Close-up of (e). **g** At anthesis ovules in few flowers have integuments primordia (arrowhead). Bars 100  $\mu\text{m}$  (a, c, d, f), 50  $\mu\text{m}$  (b, g), 500  $\mu\text{m}$  (e)

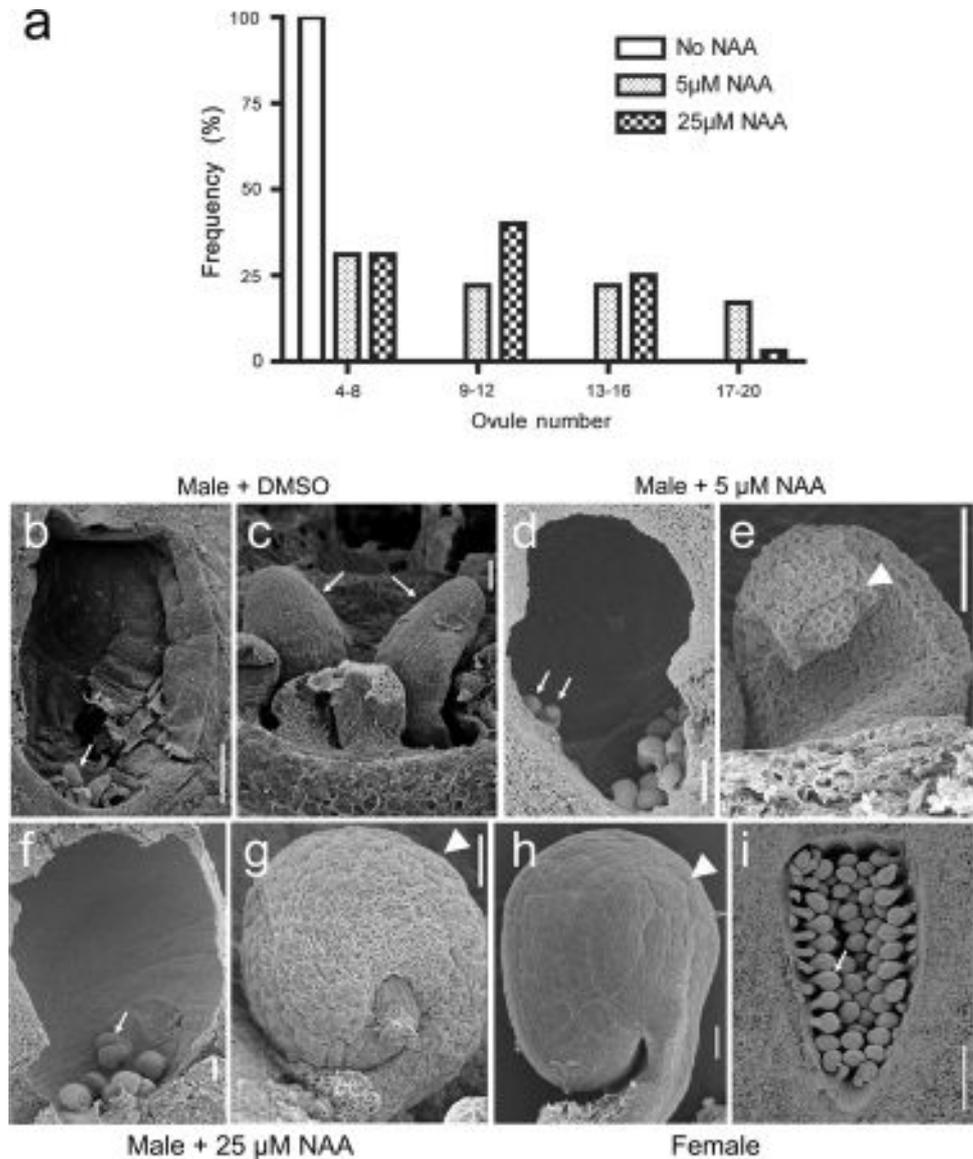
Endogenous IAA content at an early developmental stage is greater in the gynoecium of female flowers than in male flowers

Our histological analysis demonstrated that the flower style radial patterning is essentially similar in both female and male flowers; however, marginal tissues (i.e., style and stigma) within the male flower gynoecium did not fully undergo differentiation. Nemhauser et al. (2000) described similar gynoecium malformations in *A. thaliana* plants, where PAT was chemically inhibited. To investigate the possible role of auxin in the masculinization process in *O. stenopetala*, we analyzed the endogenous levels of IAA in gynoecia and correlated them with the male or female flower phenotypes. Thus, we hypothesized that if auxin has a preponderant role in *O. stenopetala* gynoecium development, as it does in *A. thaliana*, changes in auxin homeostasis could be associated with the gynoecium arrest of differentiation in male flowers. To test if IAA was actually involved in the masculinization process of *O. stenopetala* flowers, IAA was quantified by immunodetection (Avsian-Kretchmer et al. 2002; Sakata et al. 2010). When carpel primordia were close to fusing, female floral buds (Fig. 7a) showed a slightly stronger IAA signal than the male floral buds (Fig. 7b). In a more advanced developmental stage, the situation becomes more pronounced because the gynoecia in female flowers showed a considerable increase in IAA signal compared with the sterile gynoecia in the male

flowers (Fig. 7c, d, respectively). Therefore, these data indicate differences in the auxin levels between gynoecia of male and female flowers at early developmental stages when the styles of female flowers have initiated stigmatic tissue differentiation. However, at the middle stage of development, the intensity and distribution of the IAA immunofluorescence signal was similar in female and male gynoecia (Fig. 7e, f). Similar results were observed in gynoecia at a mature stage (Fig. 7g, h). Control male and female tissue sections were prepared but omitted either the use of the primary antibody (Fig. 7i), the use of the secondary antibody (Fig. 7j) or of both (Fig. 7k). None of these tissue sections showed IAA signal. Quantification of the IAA signals in these images clearly demonstrates that only at early developmental stage the IAA content in male flower gynoecia is significantly reduced (45% lower, Fig. 7l) if compared with the female flower gynoecium.

The lower auxin amount in early stages of male flower gynoecia compared to those of female flowers in *O. stenopetala*, might be the consequence of upstream mutations that affect biosynthesis-related genes such as *STYLISH1* (*STY1*), a *SHORT INTERNODES* (*SHI*) genic family member (Kuusk et al. 2002). Although our molecular data are still in progress, we have evidence that *OstSRS* (*O. stenopetala* *SHI* RELATED SEQUENCE), a putative homologue of *A. thaliana* *STY1*, shows a lower level of expression in the gynoecia of male flowers of *O. stenopetala* compared with female flowers (Fig. S1).

**Fig. 6** Auxin promotes ovule development in male floral buds. **a** Frequency percentage of ovule emergence induction after treatment with 5  $\mu$ M ( $n = 24$  ovaries) and 25  $\mu$ M ( $n = 18$  ovaries) NAA compared with control ovaries ( $n = 50$ ). **b–i** SEM images of ovaries and ovules. **b** Control treatment without NAA. **c** Close-up of (**b**). **d** Treated ovary with 5  $\mu$ M NAA. *Arrows* indicate ovules growing from lateral wall of the ovary. **e** Close-up of (**d**). **f** Treated ovary with 25  $\mu$ M NAA. **g** Close-up of (**f**) showing that funiculus (*arrowhead*) almost envelops the ovule. Close-up of an ovule (**h**) and an ovary (**i**) from a typical mature female flower. Twenty-three ovaries were treated with 5  $\mu$ M NAA and 12 presented a positive effect. Forty-one ovaries were treated with 25  $\mu$ M NAA and 24 presented a positive effect. *Arrows* ovules. *Bars* 200  $\mu$ m (**b**, **c**, **e**), 50  $\mu$ m (**d**, **f**, **g**, **h**), 1 mm (**i**)

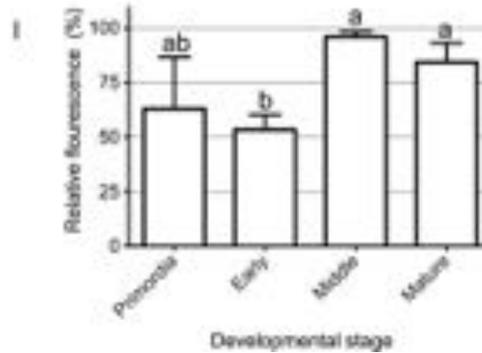
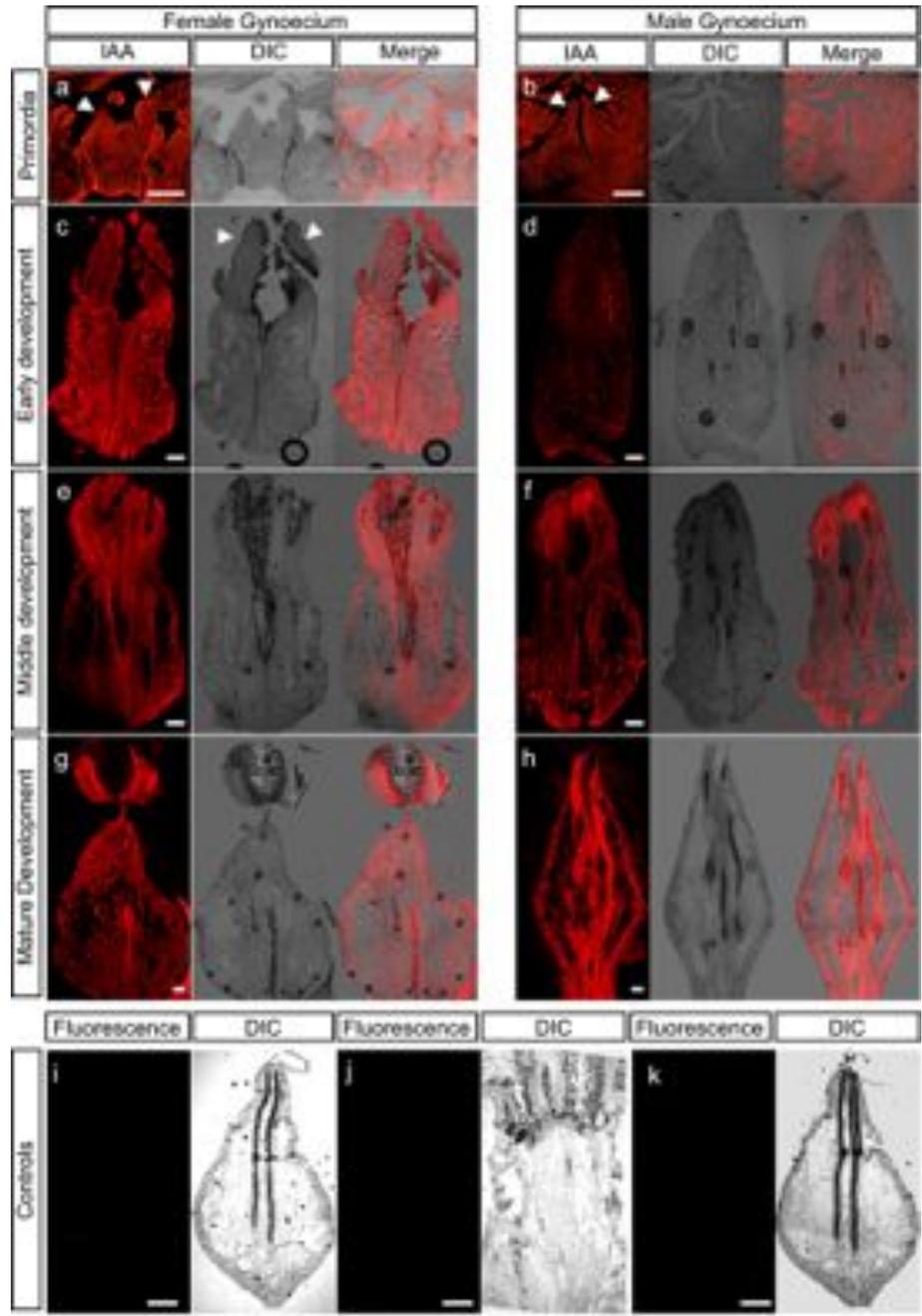


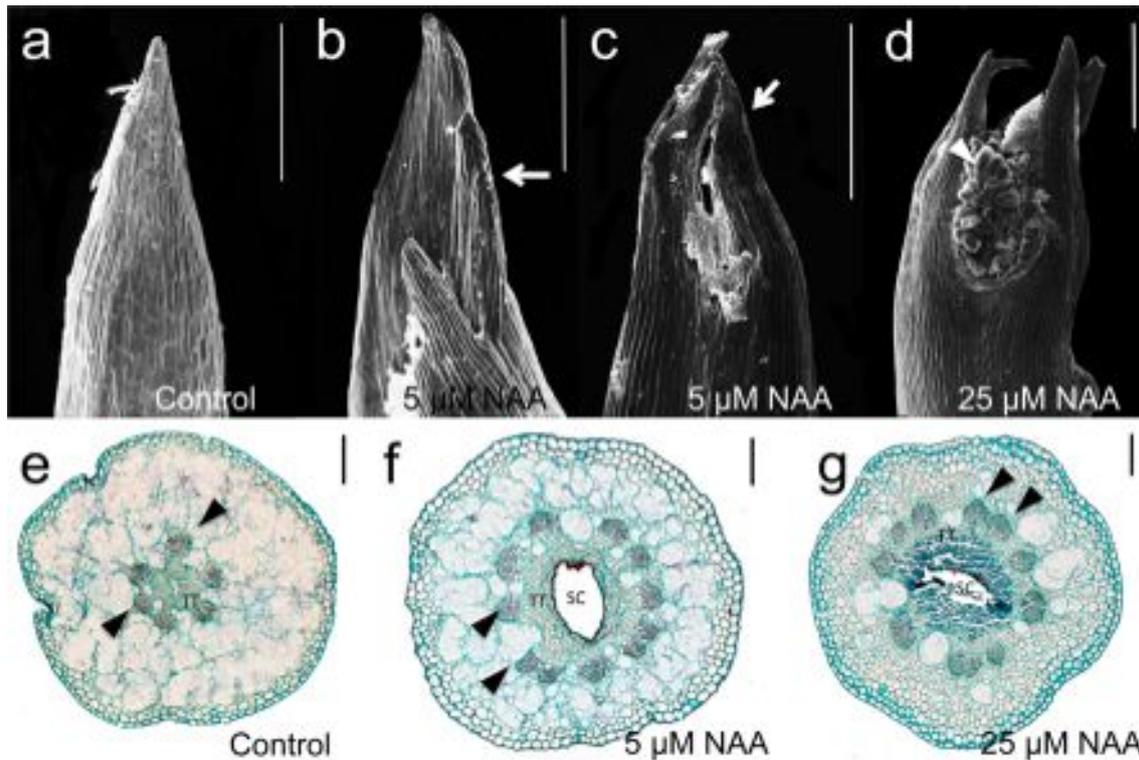
Exogenous auxin application partially reverted the male flower gynoecium defects

Even though the difference in auxin concentration between male and female gynoecia cannot be accurately quantified from the above results, this outcome suggests that at an early developmental stage, a larger amount of auxin is present in the gynoecia of female flowers. This could be related to their successful gynoecium morphogenesis, whereas the lower auxin amount in the gynoecia of male flowers could cause its developmental arrest. If so, a local auxin application to early developing gynoecia of male flowers could be sufficient for, or at least would assist in, proper morphogenesis. To test this possibility, apical regions of male flower gynoecia at an early stage of

development were externally treated with NAA. Auxin applications in carpel primordia were technically impossible. Styles with the control treatment (lanolin paste without NAA) retained the stigmaless phenotype of male flowers (Fig. 8a). Notably, the addition of 5  $\mu$ M NAA induced a slight branching in the apex of the style (Fig. 8b, c). When applying 25  $\mu$ M NAA, a prominent phenotype was observed with the formation of structures similar to the stigmatic lobes of female flower gynoecia (Fig. 8d). In some styles treated with 25  $\mu$ M NAA, a partial restoration of the apical tissues occurred due to the development of cells that resembled the stigmatic papillae of female flower gynoecia (arrowhead in Fig. 8d). These stigmatic-like tissues were formed in patches arising at the center of the style, in the middle of the recently formed stigmatic lobes.

**Fig. 7** The immunodetection of IAA reveals differences between gynoecia of male and female flowers during stigma development. **a, b** Carpel primordia. **a** Female floral bud with carpel primordia (*arrowheads*) prior to fusing. **b** Male floral bud, carpel primordia (*arrowheads*) are about to fuse. **c, d** The early stage of development. **c** The gynoecium in female flower, note the formation of stigmatic tissue at the apex (*arrowheads*). **d** The gynoecium in male flowers, the immunofluorescence signal intensity is decreased when compared with the gynoecium in female flowers. **e, f** Gynoecia at the middle developmental stage, **e** of the female flower and **f** of the male flower. **g, h** Gynoecia at mature stage (anthesis), **g** of the female flower and **h** of the male flower. **i–k** Control sections. **i** The gynoecium of the male flower, which the antibody against IAA, **j** secondary antibody or **k** both, were omitted. **l** Relative fluorescence of the IAA signal intensity at different stages of development. Female flower gynoecia IAA intensity values were taken as a 100% of fluorescence; the corresponding values of the male flowers gynoecia were plotted as a relative fluorescence. *Error bars* indicate standard error. Values followed by different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) when compared with female flower gynoecium sections. Analysis was made by a Tukey multiple comparison test after a one-way ANOVA ( $n = 3$ ). *Bars* 200  $\mu\text{m}$  (**a–h**), 500  $\mu\text{m}$  (**i–k**)





**Fig. 8** Exogenous auxin application partially reverts the stigmaless male flower phenotype and promotes gynoeceium tissue patterning of the female type. **a–d** SEM images of the apical region of the style in male flower. **a** The control treatment with no NAA. **b–d** Treatments with 5  $\mu$ M NAA (**b, c**); note a slight ramification (*arrows*) of the apex (**d**). Treatment with 25  $\mu$ M NAA induces the ramification of the

stigma and production of stigmatic cells (*arrowhead*). **e–g** Transverse sections of the median region of the styles in male flowers. **e** Control treatment without NAA. In styles treated with 5  $\mu$ M NAA (**f**) and 25  $\mu$ M NAA (**g**), *arrowheads* vascular bundles. Bars 500  $\mu$ m (**a, d**), 400  $\mu$ m (**b, c**), 200  $\mu$ m (**e–g**)

Histological sections revealed that some defects in the medial style of male flowers were also partially reverted when exogenous auxin was applied. The tissue patterning and external appearance of styles after the control treatment (Fig. 8e) was similar to those from untreated styles (Fig. 4e). However, styles in male flowers treated with 5 and 25  $\mu$ M NAA (Fig. 8f, g, respectively) showed histological features that resembled female flower styles, including the presence of intensely stained cells around the stylar canal. In treated styles, the transmitting tissue increased in area and exhibited a more delineated tissue pattern, as well as a greater number of vascular bundles (arrowheads in Fig. 8f, g), which had differentiated to a more advanced stage, when compared to untreated styles of male flowers. However, no changes were observed in the ovary morphology after auxin application on the apical part of the style (data not shown). To eliminate the possibility that auxin application on the style apex had only a local effect; a direct injection of NAA to developing ovaries of male and female floral buds was carried out. To determine the precise NAA effect in ovule development, male flowers with an ovary that presented a low number of ovules in its

base and an arrest in their development, were selected (Fig. 3j). When NAA was injected to ovaries from male flowers, a slight increase in the number of ovules and in the ovary size was observed after 5- and 25- $\mu$ M NAA applications with respect to untreated control ovaries (Fig. 6a). These additional ovules developed from the lateral walls of the ovary (Fig. 6d) and show further development as an inner integument emerged surrounding the nucellus (Fig. 6e). Remarkably, when 25  $\mu$ M NAA was applied, a considerable improvement in ovule development was observed and the amount of ovules also increased (Fig. 6f). Under this treatment, the funiculus was enlarged and almost enveloped the rest of the ovule (Fig. 6g). Its external morphology resembled that observed in mature ovules of female flowers (Fig. 6h, i), even though the ovule number in female flowers remains larger (Fig. 6i). In male flowers, ovaries and ovules injected with DMSO suffered neither morphological change nor was the ovule number increased (Fig. 6b, c).

These experiments showed that local auxin treatment was able to restore some of the morphogenetic defects in the male flower gynoeceium.

## Discussion

### Sexual dimorphism in flower development in *O. stenopetala*

We described the gynoecium morphogenesis in male and female flowers of *O. stenopetala*. Male flowers in this dioecious species are formed by the cessation of gynoecium development, which occurs during late flower development. A similar situation is also observed in male and female flowers of the subdioecious *C. spinosissima*, where there is cease of development of the alternative sex whorl at a late stage of development, leaving non-functional sex organs (Strittmatter et al. 2002). In *O. stenopetala*, these events involved failures of the differentiation processes within the male flower gynoecium tissues, resulting in a lack of stigmatic tissue. In addition, male flowers exhibited a range of defects in ovary and ovule development, which resulted from variation in the degree of cessation of differentiation. These phenotypic variations suggest that in *O. stenopetala*, even when functional dioecism is established, the ovaries in male flowers could be in transition to loss the ovary cavity to reinforce the loss of female function and behave as a male flower. In contrast, the presence of a style without a stigma in male flowers is already a stable trait because of its consistency in all of the three morphs described. In Cactaceae, the developmental pattern that produces unisexual flowers in *C. spinosissima* and *O. stenopetala* has significant differences. In *C. spinosissima* and five other species of the genus *Consolea*, male flowers present a well-developed stigma, style and ovary; the female sterility is attributable to ovule abortion (Strittmatter et al. 2002, 2008). In contrast, in *O. stenopetala* the inability of male flowers to set fruits is clearly due to the incomplete ovule development or the total absence of ovules, in combination with the lack of stigma and stylar defects.

### Hormones and sex determination processes in angiosperms

In angiosperm species whose male flowers present a vestigial gynoecium, female sterility has been associated with morphological defects that could be due to the absence or malformation of the stigma, the style or the ovules. These developmental failures in male flowers have been clarified in some unisexual species as maize (Cheng et al. 1983; Dellaporta and Calderon-Urrea 1993; Chuck et al. 2007) and in some Cucurbitaceae species such as *Cucumis sativus* (Chuck 2010).

Flowers in maize initiate as hermaphrodites, but later in flower development, one sexual whorl undergoes abortion. Male flowers originate when the initial gynoecium cells

disintegrate after become highly vacuolated (Cheng et al. 1983). Calderon-Urrea and Dellaporta (1999) demonstrated that the gynoecium cell death is a developmentally programmed cell process where nuclear fragmentation is involved. This masculinization process in maize is partially under the control of *tasselseed1* (*ts1*) and *ts2* genes (Irish et al. 1994). *ts1* encodes a lipoxygenase apparently involved in the jasmonic acid biosynthesis pathway (Acosta et al. 2009); meanwhile *ts2* encodes a hydroxysteroid dehydrogenase probably implied in the biosynthetic pathway of brassinosteroids (Wu et al. 2007). Brassinosteroids could modulate the synthesis of jasmonic acid and gibberellins (Wu et al. 2007), both of which have been shown to be involved in programmed cell death (Hoeberichts and Wltering 2003), a tightly controlled process of cell death functioning in multiple developmental programs, included unisexual flower development (*Helianthus annuus*, Balk and Leaver 2001; *Actinidia deliciosa*, Coimbra et al. 2004). Interestingly, Hartwig et al. (2011) recently demonstrated that brassinosteroids promote stamen development in male maize flowers and proposed an active role of brassinosteroids in triggering gynoecium primordia degeneration.

Similar characteristics to maize unisexual floral developmental are reported in other members of the Andropogoneae grass tribe (Le Roux and Kellogg 1999). Other Poaceae family species, meanwhile, seem to have a different mechanism of male flower development, as noted in *Zizania aquatica* (Zaitchik et al. 2000) and *Bouteloua dimorpha* (Kinney et al. 2008), therefore a single developmental pattern of masculinization could not been established for grasses.

Cucurbitaceae is another plant family with multiple species bearing unisexual flowers. In monoecious cucumber (*Cucumis sativus*), treatment with ethylene causes a feminizing effect (Perl-Treves 1999). Interestingly, ethylene up-regulates the *CS-ACS* (1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid synthase) genes, involved in the ethylene biosynthetic pathway (Oeller et al. 1991) in monoecious and gynodioecious plants, but not in andromonoecious species (Kamachi et al. 1997; Yamasaki et al. 2003). Furthermore *CS-ACS2* mRNA accumulation closely correlates with female flower expression in the cucumber (Kamachi et al. 1997). However, the feminizing effect of ethylene is not universal to all the unisexual cucurbits, because in watermelon (*Citrullus* spp.) ethylene has a masculinizing effect (Salman-Minkov et al. 2008).

In several plants, hormones are clearly involved in sex determination processes; accordingly, the sex determining genes could be involved in both of their biosynthetic pathways or in a variety of other signaling pathways influenced by hormones.

Auxin and masculinization in *O. stenopetalata*

Our results in *O. stenopetalata* suggest that the male flower gynoecium exhibits a reduction in auxin concentration at early developmental stages that may contribute to disrupting its tissue patterning. Nemhauser et al. (2000) proposed a model that considers that auxin biosynthesis occurs at the gynoecium apical region and is transported basipetally throughout the gynoecium. It is thought that the formation of this gradient promotes regional patterning in gynoecium development: high auxin levels will induce style and stigma differentiation, while lower auxin levels will be critical for the normal development of the ovary and the gynophore. Moreover, the formation and maintenance of this gradient will depend on the auxin synthesis rate, its conjugation, and its active polar transport (Alabadí et al. 2009). Our data support the key role of auxin in sustaining gynoecium development although we have no evidence of the establishment and maintenance of an auxin gradient.

Our preliminary results suggest that a putative auxin-related biosynthesis gene, *OstSRS*, could be related with the masculinization process in *O. stenopetalata*. Our working hypothesis is that this diminished *OstSRS* mRNA level could be linked to the lower auxin content detected by immunohistochemistry at an early developmental stage. Since molecular studies in *O. stenopetalata* are difficult, until now, we could not gain deeper insight into the molecular processes that control auxin biosynthesis in this species. *OstSRS* is a homolog of *A. thaliana* *STY1*, this is very relevant since Ståldal et al. (2008) suggest that *STY1* acts as a transcriptional activator of *YUCCA4* (*YUC4*), a homolog of *YUC1*, which is a gene involved in auxin biosynthesis (Marsch-Martinez et al. 2002; Kuusk et al. 2006; Sohlberg et al. 2006; Eklund et al. 2010; Stepanova et al. 2011). If *OstSRS* accomplish a similar function as *STY* during *O. stenopetalata* gynoecium development remains to be proven. Interestingly, exogenous auxin application restores the style phenotype of *A. thaliana* *sty1-1 sty2-1* double mutants, suggesting that mutant plants exhibit a reduction in the auxin synthesis (Ståldal et al. 2008). Exogenous auxin application to apical parts of the gynoecium significantly promoted stigmatic tissue formation and reverted some of the defects in the median style structure observed in the *O. stenopetalata* male flower gynoecium. Presumably, with a more accurate auxin delivery method (e.g., inoculation) at earlier stages of development, it would be possible to allow a full recovery of style and stigma formation in male gynoecia. Our results indicate that auxin either acts as a factor that regulate style and stigma differentiation for male flower gynoecia development or that it compensates for another factor with similar role.

Apical auxin applications did not restore neither ovary nor ovule development, suggesting that male gynoecium cells could also be defective in auxin transport. However, further research must be performed to get a deeper insight about this possibility. Yet, we know that in male flowers, ovaries with a reduced number of ovules respond to direct auxin application at early developmental stages, even when only 50% of the treated ovaries reassumed ovule development. This low percentage could be a partial consequence of technical difficulties that did not allow the accurate delivery of NAA into the ovary chamber. Taken together, these results suggest that cells in male-flower ovaries have the ability to respond to auxin, reassuming ovule development. Even when auxin partially recovers male flower style and ovule development, none of the separate treatments was effective in restoring fertility. However, a combinatory auxin application with a less-invasive method, on both ovules and style, might reestablish female fertility on male flowers.

The central role of auxin in gynoecium development is undeniable; however, other molecules could act in parallel with auxin to specify the different apical–basal regions of the gynoecium. Østergaard (2009) hypothesized that cytokinin could form a gradient with the maximum peak at the bottom of the *A. thaliana* gynoecium, specifying ovary and gynophore formation. Evidence that supports the importance of cytokinins in *A. thaliana* gynoecium development has been provided by Bartrina et al. (2011) who demonstrated that cytokinins regulate the final gynoecium size and participate in ovule primordia formation. Subsequent work must be performed to shed light on the dynamics of these hormones (and others, such as the gibberellins) in the regulatory pathways required for development of specific tissues (Sundberg and Ferrándiz 2009) and whether they are associated with unisexual flower developmental programs.

Here we show a connection between auxin and the formation of unisexual flowers, and propose that auxin metabolism has played an important role in the evolution of unisexuality in *O. stenopetalata*. Thus, future work should be focused on accurately quantifying differences in auxin levels between male and female gynoecia at early developmental stages and linking these hormone alterations with mutations of auxin biosynthesis genes, such as *STY*-like genes, *YUCCA* (Zhao 2010), *NGATHA* (Trigueros et al. 2009), etc., or other gynoecium development-related genes in male flowers, such as *TOUSLED* (Roe et al. 1993), *SPATULA* (Heisler et al. 2001) or *HECATE* (Gremski et al. 2007), which are essential for cell proliferation and differentiation of the marginal tissues (i.e., transmitting tract, style, stigma, and placentae). This information will contribute importantly to the understanding of the mechanisms involved in dioecious evolution in angiosperms.

**Acknowledgments** The authors are grateful to Silvia Espinosa and Berenit Mendoza for SEM work, to Laurel Fábila for greenhouse assistance, to Javier Andres Juárez-Díaz, Florencia García-Campusano and Andrew Beacham for assistance in preparing the manuscript. This work was supported by Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM (Grant Numbers IN216105, IN226808, IN205009) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant Numbers 101771, 81968).

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Acosta IF, Laparra H, Romero SP, Schmelz E, Hamberg M, Mottinger JP, Moreno MA, Dellaporta SL (2009) *tasselseed1* is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science* 323:262–265
- Ainsworth C (2000) Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. *Ann Bot* 86:211–221
- Alabadi D, Blázquez MA, Carbonell J, Ferrándiz C, Pérez-Amador MA (2009) Instructive roles for hormones in plant development. *Int J Dev Biol* 53:1597–1608
- Avsian-Kretschmer O, Cheng JC, Chen L, Moctezuma E, Sung ZR (2002) Indole acetic acid distribution coincides with vascular differentiation pattern during Arabidopsis leaf ontogeny. *Plant Physiol* 130:199–209
- Balk J, Leaver CJ (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *Plant Cell* 13:1803–1818
- Barret SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nat Rev Genet* 3:274–284
- Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schmülling T (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:69–80
- Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR (1995) Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 8:505–520
- Bravo-Hollis H (1978) Las Cactáceas de México. vol 1, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico
- Calderon-Urrea A, Dellaporta SL (1999) Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. *Development* 126:435–441
- Caporali E, Spada A, Marziani G, Failla O, Scienza A (2003) The arrest of development of abortive reproductive organs in the unisexual flower of *Vitis vinifera* ssp *silvestris*. *Sex Plant Reprod* 15:291–300
- Cheng PC, Greyson RI, Walden DB (1983) Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea mays*. *Am J Bot* 70:450–462
- Chuck G (2010) Molecular mechanisms of sex determination in monoecious and dioecious plants. *Adv Bot Res* 54:53–83
- Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S (2007) The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*. *Nat Genet* 39:1517–1521
- Coimbra S, Torrão L, Abreu I (2004) Programmed cell death induces male sterility in *Actinidia deliciosa* female flowers. *Plant Physiol Biochem* 42:537–541
- Del Castillo R (1986) La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia robusta*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México, p 133
- Del Castillo RF, González M (1988) Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* 71:185–196
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198:532–541
- Dellaporta SL, Calderon-Urrea A (1993) Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5:1241–1251
- Delph LF (2009) Sex allocation: evolution to and from dioecy. *Curr Biol* 19:R249–R251
- Edwards EJ, Nyffeler R, Donoghue MJ (2005) Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *Am J Bot* 92:1177–1188
- Eklund DM, Staldal V, Valsecchi I, Cierlik I, Eriksson C, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Sundstro JF, Thelander M, Ezcurra I, Sundberg E (2010) The *Arabidopsis thaliana* STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulating auxin biosynthesis. *Plant Cell* 22:349–363
- Fleming TH, Maurice S, Buchmann SL, Tuttle MD (1994) Reproductive biology and the relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Am J Bot* 81:858–867
- Gremski K, Ditta G, Yanofsky MF (2007) *HECATE* genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134:3593–3601
- Hartwig T, Chuck GS, Fujioka S, Klempien A, Weizbauer R, Potluri DPV, Choe S, Johal GS, Schulz B (2011) Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proc Natl Acad Sci* doi: 10.1073/pnas.1108359108
- Heisler MGB, Atkinson A, Bylstra YH, Walsh R, Smyth DR (2001) *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* 128:1089–1098
- Hershkovitz MA, Zimmer EA (1997) On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon* 46:217–232
- Hoerberichs FA, Wltering EJ (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays* 25:47–57
- Hoffman MT (1992) Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios and geographic range of floral dimorphism. *Am J Bot* 79:1382–1388
- Irish EE, Langdale JA, Nelson TM (1994) Interactions between *Tassel Seed* genes and other sex determining genes in maize. *Dev Genet* 15:155–171
- Kamachi S, Sekimoto H, Kondo N, Sakai S (1997) Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Physiol* 38:1197–1206
- Kinnach M (1982) *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies. *Cactus Succul J US* 54:3–7
- Kinney MS, Columbus JT, Friar EA (2008) Unisexual flower, spikelet, and inflorescence development in monoecious/dioecious *Bouteloua dimorpha* (Poaceae, Chloridoideae). *Am J Bot* 95:123–132
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Long JA, Fridborg I, Sundberg E (2002) *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during *Arabidopsis* gynoecium development. *Development* 129:4707–4717
- Kuusk S, Sohlberg JJ, Eklund DM, Sundberg E (2006) Functionally redundant *SHI* family genes regulate *Arabidopsis* gynoecium development in a dose-dependent manner. *Plant J* 47:99–111
- Le Roux LG, Kellogg EA (1999) Floral development and the formation of unisexual spikelets in the Andropogoneae (Poaceae). *Am J Bot* 86:354–366

- Leuenberger B (1986) *Pereskia* (Cactaceae). Mem N Y Bot Gard 41:1–141
- Lindsay G, Dawson E (1952) Mammillarias of the islands off northwestern Baja California, Mexico. Cactus Succul J US 24:76–84
- Marsch-Martinez N, Greco R, Van Arkel G, Herrera-Estrella L, Pereira A (2002) Activation tagging using the *En-1* maize transposon system in *Arabidopsis*. Plant Physiol 129:1544–1556
- Mitchell CH, Diggle PK (2005) The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. Am J Bot 92:1068–1076
- Nemhauser JL, Feldman LJ, Zambryski PC (2000) Auxin and *ETTIN* in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. Development 127:3877–3888
- Nyffeler R (2002) Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. Am J Bot 89:312–326
- Oeller P, Lu M, Taylor L, Pike D, Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science 254:437–439
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. Plant Cell 3:677–684
- Østergaard L (2009) Don't 'leaf' now. The making of a fruit. Curr Opin Plant Biol 12:36–41
- Perl-Treves R (1999) Male to female conversion along the cucumber shoot: approaches to studying genes and floral development in *Cucumis sativus*. In: Ainsworth C (ed) Sex determination in plants. Bios Scientific Publishers Oxford, pp 189–216
- Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. Plant Cell 12:507–518
- Renner SS, Ricklefs RE (1995) Dioecy and its correlates in the flowering plants. Am J Bot 82:596–606
- Roe JL, Rivin CJ, Sessions RA, Feldmann KA, Zambryski PC (1993) The *Tousled* gene in *A thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. Cell 75:939–950
- Sakai AK, Weller SG (1999) Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. In: Geber M, Dawson T, Delph L (eds) Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Springer, Germany, pp 1–31
- Sakata T, Oshino T, Miura S, Tomabeche M, Tsunaga Y, Higashitani N, Miyazawa Y, Takahashi H, Watanabe M, Higashitani A (2010) Auxins reverse plant male sterility caused by high temperatures. Proc Natl Acad Sci USA 107:8569–8574
- Salman-Minkov A, Levi A, Wolf S, Trebitsh T (2008) ACC synthase genes are polymorphic in watermelon (*Citrullus* spp.) and differentially expressed in flowers and in response to auxin and gibberellin. Plant Cell Physiol 49:740–750
- Sessions RA, Nemhauser JL, McCall A, Roe JL, Feldmann KA, Zambryski PC (1997) *ETTIN* patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. Development 124:4481–4491
- Sohlberg JJ, Myrenas M, Kuusk S, Lagercrantz U, Kowalczyk M, Sandberg G, Sundberg E (2006) *STY1* regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. Plant J 47:112–123
- Ståldal V, Sohlberg JJ, Eklund DM, Ljung K, Sundberg E (2008) Auxin can act independently of *CRC*, *LUG*, *SEU*, *SPT* and *STY1* in style development but not apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. New Phytol 180:798–808
- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM (2011) The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. Plant Cell. doi:10.1105/tpc.111.088047
- Strittmatter LI, Negrón-Ortiz V, Hickey RJ (2002) Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. Am J Bot 89:1373–1387
- Strittmatter LI, Hickey RJ, Negrón-Ortiz V (2008) Heterochrony and its role in sex determination of cryptically dioecious *Consolea* (Cactaceae) staminate flowers. Bot J Linn Soc 156:305–326
- Sundberg E, Ferrándiz C (2009) Gynoecium patterning in *Arabidopsis*: a basic plan behind a complex structure. Annu Plant Rev 38:35–69
- Trigueros M, Navarrete-Gómez M, Sato S, Christensen SK, Weigel D, Yanofsky MF, Ferrándiz C (2009) The *NGATHA* genes direct style development in the *Arabidopsis* gynoecium. Plant Cell 21:1394–1409
- Valiente-Banuet A, Rojas-Martínez A, Arizmendi MC, Dávila P (1997) Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. Am J Bot 84:452–455
- Wu X, Knapp S, Stamp S, Stammers DK, Jörnvall H, Dellaporta SL, Oppermann U (2007) Biochemical characterization of TASSEL-SEED2, an essential plant short-chain dehydrogenase/reductase with broad spectrum activities. FEBS J 274:1172–1182
- Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H (2003) Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants. Sex Plant Reprod 16:103–111
- Zaitchik BF, LeRoux LG, Kellogg EA (2000) Development of male flowers in *Zizania aquatic* (North American wild-rice; Gramineae). Int J Plant Sci 161:345–351
- Zhao Y (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annu Rev Plant Biol 61:49–64