



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

TEMA:

**PROTEÍNAS ASOCIADAS A SPATULA, EN BUSCA DE NUEVAS
VÍAS DE REGULACIÓN DEL DESARROLLO DEL GINECEO Y
FRUTO EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

JULIA PAULINA GARCÍA GONZÁLEZ

TUTOR:

**TUTOR INTERNO: DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN
TUTOR EXTERNO: DR. HUMBERTO HERRERA UBALDO**





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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi familia, a mi mamá por escucharme, apoyarme y su amor incondicional, a mi papá por seguirme apoyando y ayudando a lo largo de mi larga carrera educativa. A mi Hermaniki Betty por preocuparse por mí y por ser un buen ejemplo. A mi Hermaniki Iván por seguir jugando conmigo y por sus abrazos. A todos ustedes gracias por tolerarme en mis momentos de estrés. Se que he tardado más de lo planeado y les agradezco su paciencia.

Le agradezco a mis amigos, Luz gracias por los ánimos, aventuras, por apoyarme en todo y por creer en mí. Miguel gracias por escucharme, hacerme reír siempre, estar al pendiente de mí y aceptarme como soy. También quiero agradecer a mis amigos de la universidad en especial a Ana Karen y Uriel que durante toda la carrera me acompañaron y apoyaron.

Quiero agradecer al Doctor Stefan de Folter por permitirme trabajar en su laboratorio Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas en el Cinvestav, UGA-Langebio. A Humberto Herrera por ser mi tutor, guía, mentor y primer colega del laboratorio, por la oportunidad de aprender de ti y compartir tu experiencia conmigo. Ambos son muy buenos jefes y de grande quiero ser como ustedes. Gracias también al resto de mis amigos, colegas y compañeros del laboratorio.

A mis profesores de la carrera por enseñarme, por compartir conmigo su amor por la ciencia, por su disponibilidad y por impulsarme a vivir nuevas cosas y aventuras que me han ayudado a seguir desarrollándome en lo académico y personal.

Agradezco al CONACyT por la financiación del proyecto CB-2017-2018-A1-S-10126.

Por todo y a todos les agradezco infinitamente.

Índice	
RESUMEN	5
ABREVIATURAS	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN	6
Desarrollo de la flor en <i>Arabidopsis</i>	6
Factores de transcripción, participan en el desarrollo del gineceo y del fruto de <i>Arabidopsis</i>	7
Efecto de la luz en el desarrollo reproductivo de <i>Arabidopsis</i>	9
Interactores de SPT en las redes de regulación genética	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPÉCIFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Clasificación de las proteínas que interactúan físicamente con SPATULA	15
Material vegetal	15
Condiciones de crecimiento	15
Germinación <i>in vitro</i>	15
Mediciones de hipocótilos	16
Análisis en flores y frutos	16
Análisis histológicos	16
Medición de frutos	17
RESULTADOS	18
Los interactores de SPATULA participan en procesos biológicos diversos	19
Efecto de la luz roja y roja lejana en plántulas	20
Desarrollo sincronizado de gineceos	22
Desarrollo del gineceo en condiciones de luz roja y roja lejana	24
Desarrollo del gineceo en la mutante <i>spt-2</i> en condiciones de luz roja y roja lejana	29
DISCUSIÓN	30
Una herramienta para el estudio del desarrollo del gineceo	30
Efecto de la luz roja en el desarrollo reproductivo masculino	31
La respuesta de las auxinas a la luz	33
El efecto de la luz sobre las ramificaciones de la planta	35
CONCLUSIONES	37

PERSPECTIVAS	38
REFERENCIAS	39

Índice de tablas

Tabla 1. Interactores de SPATULA con mayor abundancia en los datos de IP/MS-MS. ...	18
---	----

Índice de figuras

Figura 1. Morfología y desarrollo de la flor de Arabidopsis thaliana.	7
Figura 2. Señales ambientales que perciben los fotorreceptores y su respuesta. ...	10
Figura 3. Los interactores de SPT participan en procesos relacionados con la respuesta a luz.....	20
Figura 4. Respuestas morfológicas de hipocótilos en respuesta a luz..	21
Figura 5. Diferentes tipos de luz afectan la elongación de los hipocótilos de Arabidopsis.	22
Figura 6. Desarrollo de la línea de sincronización..	23
Figura 7. Desarrollo floral en las líneas Col-0 y pAP1::AP1:GR ap1 cal..	24
Figura 8. La luz roja afecta el desarrollo reproductivo masculino.	25
Figura 9. Luz roja afecta la estructura del polen.	26
Figura 10. La luz roja afecta la ramificación de las inflorescencias.....	27
Figura 11. El desarrollo del gineceo de spt-2 se ve afectado por la luz.....	28
Figura 12. Formación de semillas en plantas mutantes spt-2 bajo distintos tratamientos con luz.....	29

RESUMEN

La parte femenina de la flor de la *Arabidopsis* se le conoce como gineceo. SPATULA es un factor de transcripción de la familia bHLH que participa en el correcto desarrollo del gineceo. La actividad de los factores de transcripción, incluyendo a SPATULA, puede ser afectada por interacciones proteína-proteína y la formación de complejos proteicos. En este trabajo se inició el estudio de proteínas asociadas a SPATULA. Algunas de estas proteínas están relacionadas con las respuestas a luz; por lo que se analizó cómo es que la luz afecta el desarrollo de gineceos y frutos. Se demostró que la luz roja afecta el desarrollo de *Arabidopsis*, en la elongación de hipocótilos, ramificaciones y frutos. Así mismo la hercogamia fue mayor en las plantas expuestas a luz roja.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo de la flor en *Arabidopsis*

Las plantas angiospermas son aquellas plantas que tienen flores. La flor es la estructura más compleja de la planta (Alvarez-Buylla et al., 2010), y está compuesta por sépalos, pétalos, estambres, y el gineceo (Figura 1A).

El desarrollo de la flor de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha dividido en 20 etapas (Figura 1B) y empieza con la formación del primordio floral en las etapas 1 y 2. Durante la etapa 3 los primordios de los sépalos son visibles; en la etapa 4 los sépalos siguen desarrollándose sobre el meristemo de la flor.

Los primordios de pétalos y estambres se vuelven visibles en la etapa 5. Al llegar a la etapa 6 los sépalos cubren el meristemo floral y el gineceo empieza a formarse. Los órganos continúan su desarrollo en las siguientes etapas.

Los primordios de estambres continúan su desarrollo durante la etapa 7. En la etapa 8 los lóculos aparecen en los estambres. Para la etapa 9 la longitud de los pétalos alcanza la de los estambres cortos, mientras que el gineceo continúa alargándose como un tubo ovalado hueco.

Durante la etapa 10 aparecen las papilas estigmáticas y en la etapa 11 estas papilas cubren el estigma. Los estambres presentan una elongación lenta cuando el botón de la flor se encuentra en las etapas 10-11, mientras que cuando la flor se empieza a abrir la elongación es más rápida.

Cuando los pétalos y los estambres tienen una longitud parecida puede decirse que la flor está en etapa 12; además, el gineceo está listo para fertilizarse y las valvas, sus márgenes, replum y estilo son totalmente distinguibles morfológicamente.

En la etapa 13 se realiza la fertilización, la flor está abierta y los pétalos son visibles. Las etapas posteriores describen el desarrollo del fruto. En la etapa 14, las anteras son más largas que el estigma, llegando a su longitud final, siendo más largos que los pistilos (Tashiro et al., 2009).

Cuando el estigma se extiende por encima de las anteras largas es la etapa 15. En la etapa 16 los pétalos y sépalos empiezan a marchitarse. Terminando de marchitarse en la etapa 17.

Las silicuas se vuelven verdes durante la etapa 18. Al llegar a la etapa 19 las valvas de las silicuas secas se separan y en la etapa 20, que es la última, las semillas son liberadas (Alvarez-Buylla et al., 2010; Smyth et al., 1990).

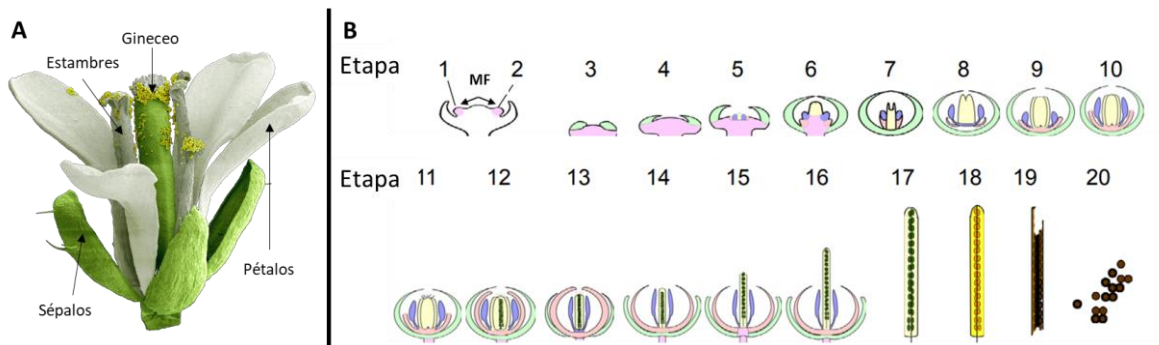


Figura 1. Morfología y desarrollo de la flor de *Arabidopsis thaliana*. A) Partes de la flor de *Arabidopsis thaliana*. B) 20 etapas del desarrollo de la flor empezando por el meristemo floral hasta la liberación de las semillas. Meristemo floral (MF), rosa; sépalos, verde; pétalos, rosa brillante; estambres, azul; gineceo, amarillo; óvulos, verde oscuro; semillas, anaranjado y café. Imagen modificada de Alvarez-Buylla et al., 2010.

La silicua es el fruto que se forma a partir de la flor de *Arabidopsis*; es el ovario maduro con una estructura especializada cuya función es proteger las semillas hasta que terminen de desarrollarse y después facilitar su dispersión. Como ya se describió; el fruto comienza a formarse una vez que el gineceo es fertilizado en la etapa 13; cada óvulo fertilizado dará origen a una semilla (Moubayidin and Østergaard, 2017).

El desarrollo del gineceo abarca de la etapa 6 a la 12. La comprensión de los procesos moleculares que dirigen el desarrollo del gineceo es de gran importancia, ya que es el origen de la formación de los frutos y las semillas (Roeder and Yanofsky, 2006), siendo estas una de las mayores fuentes de alimentos (Reyes-Olalde et al., 2017).

Factores de transcripción, participan en el desarrollo del gineceo y del fruto de *Arabidopsis*

El desarrollo de la flor, la identidad de los órganos que la conforman, así como su posterior transformación en un fruto, depende de redes de regulación genética complejas. Uno de los principales componentes de estas redes son los factores de transcripción, que regulan la expresión de los genes (Chávez Montes et al., 2015; Herrera-Ubaldo et al., 2014).

Los factores de transcripción y las hormonas guían el desarrollo de los tejidos del fruto, así como las respuestas de defensa y estrés. En *Arabidopsis* aproximadamente 1500 genes son factores de transcripción (FT) (Shiu et al., 2005), actualmente se han reportado 2296 FT (Jin et al., 2017) los cuales pertenecen a las familias bHLH, bZIP (Vinson et al., 1989), Homeobox (Hackbusch et al., 2005), MADS-box (de Folter et al., 2005), Teosinte Branched 1 en *Zea mays*, CYC en *cycloidea* y Factores de proliferación celular 1 y 2 (PCF1 y PCF2, por sus siglas en inglés) en *Oryza sativa* (TCP)

(Danisman et al., 2013), Dedos de zinc, ARR (Dortay et al., 2008) y ARF (Nanao et al., 2014; Reyes-Olalde et al., 2013).

Los tejidos que se desarrollan a partir del meristemo del margen del carpelo (CMM), cuya actividad depende de factores de transcripción como SHOOT MERISTEMLESS (STM), cotiledón en forma de copa (CUC, por sus siglas en inglés), SPATULA (SPT) y ETTIN (ETT). En la formación del tracto de transmisión participan (NTT, por sus siglas en inglés) (Crawford et al., 2007), las proteínas HECATE (HEC1, HEC2 y HEC3) (Gremski et al., 2007), SPT, medio lleno (HAF), expresión mejorada por brasinosteroides 1 y 3 (BEE1, BEE3, por sus siglas en inglés) y los factores de respuesta a auxinas 6 y 8 (ARF6 y ARF8, por sus siglas en inglés) (Crawford and Yanofsky, 2011).

Para la formación de la valva los márgenes de la valva y el replum se requiere de los factores del dominio medio y lateral, como: hojas asimétricas 1 y 2 (AS1, AS2, por sus siglas en inglés), dentado (JAG, por sus siglas en inglés), flor filamentosa (FIL, por sus siglas en inglés), parloteo 3 (YAB3 por sus siglas en inglés) y FRUITFULL (FUL).

En la formación del dominio medio también participan NTT (Marsch-Martínez et al., 2014), BREVIPEDICELLUS (BP), SHOOT MERISTEMLESS (STM) y REPLUMLESS (RPL) (Roeder et al., 2003). Mientras que en las últimas etapas de la formación del gineceo los involucrados en la formación de los márgenes de las valvas son SHATTERPROOF 1 y 2 (SHP1, SHP2), ALCATRAZ (ALC), INDEHISCENT (IND) y SPT (Herrera-Ubaldo et al., 2018; Reyes-Olalde et al., 2013; Roeder and Yanofsky, 2006).

En el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana* el factor de transcripción SPATULA (SPT) de la familia bHLH juega un papel muy importante ya que es requerido para el desarrollo de los márgenes del carpelo, tejidos como estigma, estilo y tracto de transmisión (Heisler et al., 2001; Zúñiga-Mayo et al., 2019).

Durante el desarrollo del gineceo el perfil de expresión de SPT es un indicador de los procesos en que participa, en la etapa 6 se expresa en el primordio del gineceo; en la etapa 8 se expresa en la región interna media del septum, en la parte superior del gineceo para el desarrollo de estilo y estigma; en la etapa 11, se expresa en el septum y tracto de transmisión, así como en los primordios de óvulos; en la etapa 13 en las valvas y en la 17 en los márgenes de las valvas (Roeder and Yanofsky, 2006).

Las plantas mutantes para *spt* presentan defectos en la fusión de los carpelos, en la formación del estilo así como ausencia del tracto de transmisión (Albertos et al., 2019; Alvarez and Smyth, 1999), también la silicua de la mutante *spt-2* es más corta que de la silvestre (Heisler et al., 2001).

Efecto de la luz en el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*

Las plantas al ser organismos sésiles están expuestas a diferentes factores ambientales, que pueden afectar su crecimiento. Así mismo, deben ser capaces de percibir y responder a las señales, dichas señales les permitirán desarrollarse y reproducirse.

La luz es un elemento del ambiente necesario para la producción fotosintética, que puede afectar el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Las plantas son capaces de detectar la luz gracias a los fotorreceptores, como los fitocromos, los cuales son cromoproteínas codificadas por una familia de genes, en la planta *Arabidopsis thaliana*. Existen 5 fitocromos (fitocromos A, B, C, D y E), pero el presente trabajo solo se enfoca en el fitocromo B (PhyB, por sus siglas en inglés), punto que se desarrollará más adelante (Al-Sady et al., 2006; Paik and Huq, 2019).

Algunos de los procesos regulados por la luz son: 1. La germinación; en la que se ha observado que la luz roja promueve la síntesis de ácido giberélico; hormona promotora de la germinación (Yamaguchi et al., 1998), 2. En la de-etiolación; al detectar la luz se inducen cambios morfológicos y genéticos (fotomorfogénesis) (Xu et al., 2015), 3. Respuestas a la evitación de la sombra; elongando rápidamente el hipocótilo o por hiponastia de las hojas; y 4. El tiempo de floración; induciendo o reprimiendo la floración (Paik and Huq, 2019; Song et al., 2015).

En primera instancia, la luz es percibida por los fotorreceptores; estos son capaces de detectar una longitud de onda diferente, el fitocromo B (*PHYB*) percibe la luz roja y roja lejana (600-750 nm); la cual hace que el fitocromo cambie de un estado inactivo (Pr) a un estado activo (Prf) y movilizarse al núcleo, donde puede interactuar con múltiples proteínas así como con factores de transcripción de la familia basic helix-loop-helix (bHLH) como los PHYTOCHROME INTERACTION FACTOR (PIF), controlando la transcripción (Foreman et al., 2011).

Mientras que PIF3, PIF4, PIF6 y PIF7 son capaces de unirse directamente al fitocromo (Leivar et al., 2008), los phyA-phyE interactúan con factores de transcripción de la familia bHLH (como SPT); los cuales inducen cambios en la expresión de los genes objetivo mediante PIF3 (Al-Sady et al., 2006).

Los PIF y CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1/SUPPRESSOR OF PHYA-105 (COP1/SPA) trabajan juntos para reprimir las señales luminosas en la oscuridad (Xu et al., 2014). Como se muestra en la Figura 2; la percepción de la luz por los fitocromos modula la respuesta de las plantas con ayuda del complejo de E3 ligasa COP1-SPA, así como de los factores de transcripción PIF, HY5 y HFR1. Cuando los reguladores negativos de la señalización luminosa se inactivan, COP1-SPA y PIF se inactivan los fotorreceptores e inician cambios en la expresión génica, seguido de esto se estabilizan los factores de transcripción: HY5 y HFR1, permitiendo así tener un mayor número de genes objetivo (Lee et al., 2007; Paik and Huq, 2019).

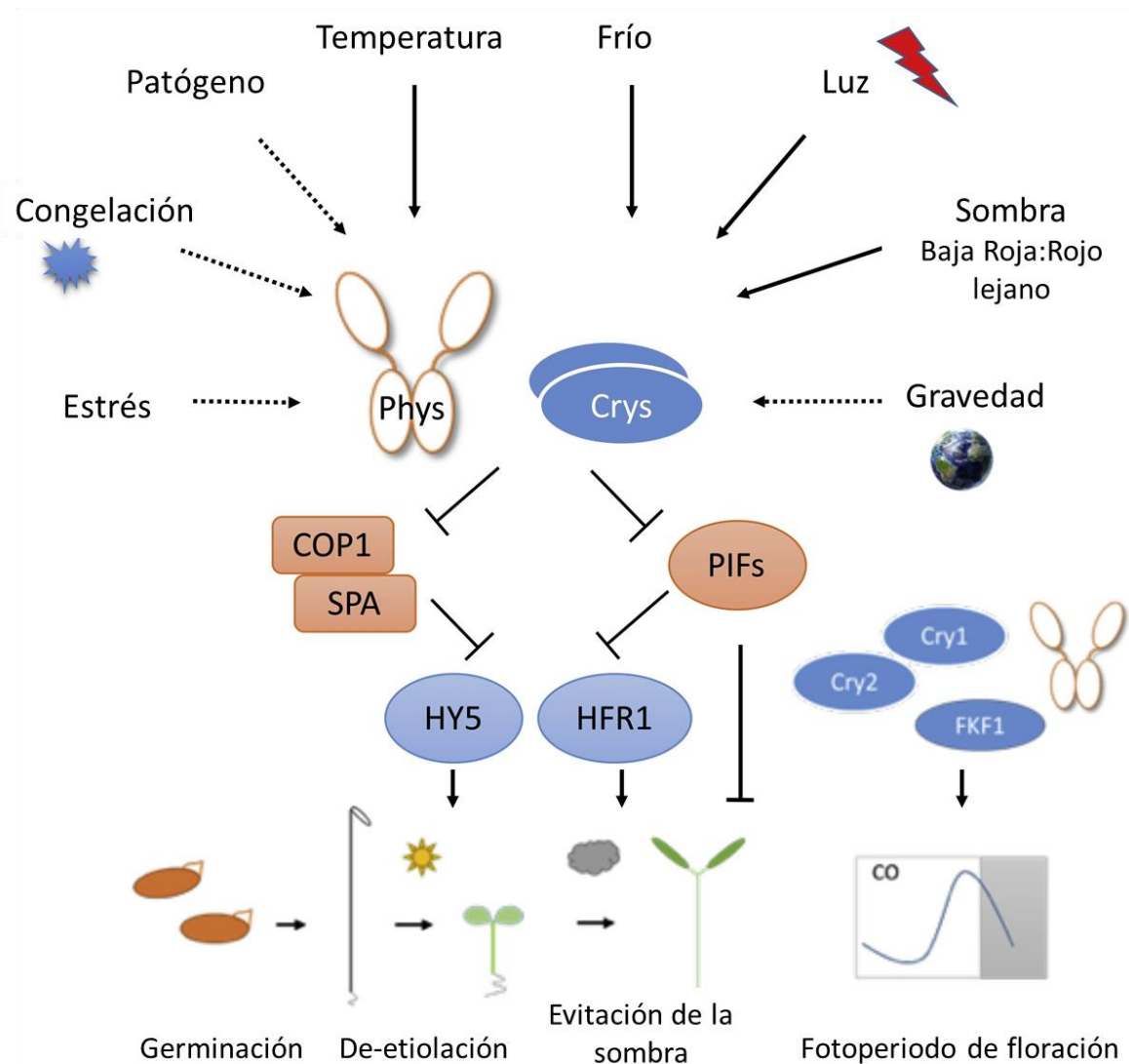


Figura 2. Señales ambientales que perciben los fotorreceptores y su respuesta. Los fitocromos perciben la luz y la información térmica para que así la planta genere una respuesta acorde, sea a estrés biótico y abiótico, gravitropismo y transiciones del desarrollo. Los fotorreceptores trabajan con el complejo E3 ligasa COP1-SPA, factores de transcripción PIF (Factores de interacción al fitocromo), HY5 y HFR1. Al inactivar a COP1-SPA y PIF los fotorreceptores inician cambios masivos en la expresión génica en respuesta a la luz. Los factores de transcripción HY5 y HFR1 tienen un mayor número de genes objetivo cuando son estabilizados por los fotorreceptores. Dichas regulaciones por parte de los fotorreceptores permiten optimizar el crecimiento y rendimiento. Modificado de Paik and Huq, 2019.

Se ha descrito que SPT y otros miembros de esta familia (bHLH) participan en la regulación del desarrollo en conjunto con la luz (Heisler et al., 2001). Esto es interesante ya que se ha visto que las mutantes de *spt-2* y *spt-11* son capaces de recuperar parcialmente el fenotipo silvestre externo al ser expuestas a luz roja, presentando una correcta fusión de los carpelos en la parte apical del gineceo.

Los resultados del trabajo de Reymond (Reymond et al., 2012) indican que SPT evolucionó a partir de un factor de transcripción similar a un PIF, sufriendo una pérdida del dominio APB, dicha pérdida fue necesaria para que SPT pudiera tener función sobre el desarrollo en los carpelos y estar asociado con la evitación de la sombra de forma independiente a la luz, promoviendo la respuesta a la evitación de la sombra en órganos vegetativos. Además; dado que SPT es un factor de transcripción, algunos de sus genes blanco que participan en la evitación de la sombra están regulados en el gineceo por la calidad de la luz, tal evitación se lleva a cabo a través de PHYB, PIF4 y PIF5. Esto permiten especular acerca del rol de los mecanismos regulados por luz en los órganos de la planta. La fusión de los carpelos en la parte apical parece ser regulada en paralelo por SPT y una ruta alternativa que es fomentada bajo la luz roja y roja lejana.

En otro estudio se probó la función de SPT durante la formación del gineceo dependiente del fitocromo, mostrando que la función de SPT es dependiente de phyB. La mutación de *phyB* es capaz de recuperar la función de SPT sólo en etapas de desarrollo tardías, esto cuando el eje apico-basal del gineceo está bien definido (Foreman et al., 2011).

La luz provoca cambios en la estructura de la planta, lo que ayuda a la planta a buscar una mejor recepción de luz necesaria para el crecimiento y desarrollo; estos mecanismos dependen de cambios en la expresión génica (Sessa et al., 2005). En el trabajo de Sessa et al. (2005) se mostró una relación entre la regulación (activación o represión) de genes por la respuesta a la evitación de la sombra en *Arabidopsis*. Un miembro de la familia bHLH, al exponerse a R/FR es capaz de desencadenar la rápida inducción de otros genes reguladores (Sessa et al., 2005).

El impacto de la luz en tejidos florales ha sido poco estudiado por lo que hay pocos estudios reportando las respuestas de estos tejidos a las diferentes calidades de luz. Sin embargo, se ha reportado que la luz altera la expresión de genes al degradar los factores de transcripción de la familia bHLH (Liu et al., 2017; Quail, 2002). SPATULA (SPT) es un factor de transcripción de bHLH y pertenece a la sub-familia de los similar a los factores de interacción al fitocromo (PIF-Like, PIL. por sus siglas en inglés), los miembros de la familia PIF participan en procesos relacionados con la respuestas a luz (Foreman et al., 2011; Heisler et al., 2001; Toledo-Ortiz et al., 2003).

Interactores de SPT en las redes de regulación genética

Los factores de transcripción son capaces de interactuar físicamente para formar complejos proteicos (Herrera-Ubaldo et al., 2014); la composición de dicho complejo proteico determinará sus funciones. Es necesaria una combinación específica de proteínas para llevar a cabo las diferentes funciones. Se han descrito algunas redes de regulación que conducen a la formación de los diferentes órganos o tejidos (Chávez Montes et al., 2015). Un ejemplo de complejos de factores de transcripción es SEU-LUG-FIL-ANT; el cual controla la parte adaxial en el gineceo (Azhakanandam et al., 2008), otro caso es el complejo para el desarrollo del estilo ETT-IND-BP-RPL (Simonini et al., 2018). Como ya

se ha mencionado a lo largo del desarrollo del gineceo son necesarias interacciones proteína-proteína específicas (Chávez Montes et al., 2015).

Las interacciones físicas reportadas para SPT se establecen con INDEHISCENT (IND) y HECATEs (HEC1, HEC2 y HEC3), estos interactores actúan en conjunto como un complejo para el correcto desarrollo del gineceo (Gremski et al., 2007; Moubayidin and Østergaard, 2014; Zúñiga-Mayo et al., 2019). Datos recientes no publicados de de Folter et al., (2018) obtenidos de una inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas revelaron que SPT interactúa con proteínas de diferentes funciones.

Este trabajo se inició con la caracterización de proteínas asociadas a SPATULA, a las que llamaremos interactores. Un análisis de la función descrita reveló que muchas de ellas se relacionan con procesos de percepción, señalización y respuesta a luz. Se desarrolló un sistema de exposición que usa LEDs (Light Emission Diodes) que emiten luz roja y roja lejana para el estudio del efecto de la luz roja en el desarrollo de la planta *Arabidopsis thaliana*. En general, el papel protagónico de SPATULA durante el desarrollo del gineceo y fruto de *Arabidopsis* puede llevarse a cabo mediante la formación de complejos con proteínas clave. Estas asociaciones no están descritas a detalle, sin embargo, pueden revelar mecanismos moleculares novedosos para el desarrollo reproductivo en *Arabidopsis*.

HIPÓTESIS

SPATULA es importante para el desarrollo del gineceo porque participa en diferentes complejos de proteínas que se involucran en diferentes procesos biológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana* en el contexto de las proteínas que interactúan con el factor de transcripción SPATULA.

OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

1. Curar datos de IP-MS y seleccionar interactores.
2. Conocer la función de los interactores con SPATULA durante el desarrollo de *Arabidopsis* y en particular durante el desarrollo del gineceo.
3. Estudiar el desarrollo de *Arabidopsis* con un enfoque en los interactores de SPATULA y determinar sus posibles efectos sobre el desarrollo del gineceo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clasificación de las proteínas que interactúan físicamente con SPATULA

Se usó una base de datos construida de los datos obtenidos del ensayo de inmunoprecipitación del botón de *Arabidopsis*, con SPATULA (SPT) como carnada (de Folter et al., no publicados). Se seleccionaron las proteínas más abundantes con base en los valores obtenidos con el estadístico Perseus software - t-test FDR: 0.01. Los loci ID de estas proteínas se utilizaron para buscar información sobre ellos en la página de The *Arabidopsis* Information Repository (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>). Las proteínas que interactúan con SPT se clasificaron de acuerdo con su función principal.

Material vegetal

Para el estudio del efecto de la luz en el desarrollo de la planta en general se usaron las líneas Col-0 y *spt-2* (Alvarez and Smyth, 1999). Para el estudio del efecto en desarrollo reproductivo se usó también la línea de sincronización floral *pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5* (Nakamura et al., 2014). La línea de sincronización floral obtuvo de Richard Immink/Gerco Angenent (Wageningen University & Research) y *spt-2* (con fondo genético *Ler*) por el SALK Institute.

Condiciones de crecimiento

Todas las plantas fueron cultivadas en ciclos de 16/8 h luz/oscuridad (a no ser que se indiquen otras condiciones). El sustrato utilizado fue una mezcla de vermiculita (Hortiperl/SABSA) y peat moss (Sunshine/SABSA) (1:3). La temperatura de las cámaras de crecimiento fue de 22 °C, mientras en el invernadero la temperatura osciló entre 22 y 26 °C.

Los experimentos de exposición de flores en etapa 6 a diferentes condiciones de luz se realizaron en cabinas equipadas con LEDs de luz roja (660nm, 24,600 Lx) y roja lejana (740nm, 35,300 Lx) con ciclos de 16/8 h luz/oscuridad durante 10 días. Las condiciones de los controles fueron, para el control positivo las condiciones de luz del invernadero (luz natural, 37,300 Lx) y para el control negativo total oscuridad, cubriendo las macetas con cajas privándolas de la luz.

Germinación *in vitro*

Los experimentos de elongación de hipocótilos inducidos por luz roja y roja lejana se realizaron con plantas cultivadas *in vitro*. Se usó medio sólido Murashige-Skoog (Murashige and Skoog, 1962). El medio se preparó con 2.215 g/L de medio MS (Caissson Labs), 8 g/L de Agar (PhytoTech Labs) y 5 g/L de sacarosa; Se ajustó el pH a 5.9 con KOH 10 M antes de la adición del agar y se esterilizó en autoclave durante 60 minutos a una presión de 15 lb/in².

Previo a su cultivo en medio MS las semillas se esterilizaron con una solución de etanol al 70% durante 5 min, después un lavado con cloro al 20% durante 5 min. y 3 enjuagues de 7 min. con agua MiliQ estéril. Una vez colocadas las semillas en medio MS se llevaron a estratificación (4 °C por 48 horas), posteriormente se transfirieron a cámara o a la cabina con las condiciones de crecimiento previamente descritas. Después de 6 días se expusieron a los tratamientos de luz; para las

condiciones de luz blanca fueron llevadas al invernadero, en el caso de luz roja y roja lejana se llevaron a cámaras equipadas con LEDs (con una distancia de 21.5 cm entre LED y caja Petri) y para oscuridad las cajas Petri fueron colocadas dentro de una caja de cartón sin que pudieran recibir luz en el invernadero. En cada caso las cajas Petri se colocaron de manera vertical.

Mediciones de hipocótilos

Las plántulas crecidas en caja Petri durante 6 días en la cámara de crecimiento se movieron a luz roja, roja lejana, luz normal y oscuridad por 10 días dependiendo del tratamiento. Los hipocótilos fueron fotografiados con una cámara EOS Rebel T3 (CANON) las fotografías se guardaron en archivos JPG. La medición de la longitud de hipocótilos se realizó con la ayuda del software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los archivos se importaron a ImageJ, se calibró su escala y se tomaron las mediciones. El hipocótilo se midió desde el primer cotiledón a la raíz, donde empieza la parte blanca. Se midió un mínimo de 5 plántulas por tratamiento y genotipo, con al menos 3 repeticiones biológicas.

Análisis en flores y frutos

Para tener un mejor control sobre los tiempos de exposición a las distintas condiciones de luz se usó la línea de sincronización floral (*pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5*), con esta línea se puede lograr que todas las flores de una inflorescencia se desarrollen de manera sincronizada y estén en el mismo estadio de desarrollo del gineceo (etapa 6). Cuando los tallos de las plantas alcanzaron una altura de 4 cm, se removió el tallo principal para inducir la emergencia de ramificaciones secundarias de las plantas y tener un mayor número de brotes sincronizados. Después de 10 días los brotes de las ramificaciones secundarias emergieron y se prosiguió con la inducción del desarrollo floral. Se aplicaron 5 gotas de Dexametasona (Dex, 10mM) y Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock) al 0.1% a cada meristemo para inducir el desarrollo de los meristemas florales. Una vez que las flores alcanzaran la etapa 6, caracterizada por la presencia de sépalos se transfirieron a los tratamientos de luz.

Cuando cierto porcentaje de las flores (5, 50 ú 80 %) se encontraron en etapa 6 se expusieron a las condiciones de luz roja ya mencionadas. Después de los 10 días de tratamiento en las diferentes condiciones se retiraron de los LEDs y se expusieron a las condiciones del invernadero (luz ambiental, temperatura 22-26 °C). Se colectó tejido y se fijó en solución FAE (formaldehído 5%, etanol 50% y ácido acético 10%, aforado con agua destilada). Se colectaron 2 inflorescencias en etapa 11 de cada muestra (5, 50 y 80 %) y se fijaron en FAE durante 16 horas.

Análisis histológicos

Posterior a la fijación en FAE; las muestras se deshidrataron usando soluciones de etanol 20, 40, 60 % por dos horas cada paso hasta llegar a etanol 80 % en la que se mantuvieron durante 16 horas a 4 °C. Se siguió la deshidratación con etanol al 100 % y después etanol al 100 % más solución básica

(1:1) del kit Technovit 7100 (Heraeus/Kulzer), las muestras fueron tratadas con la solución de infiltración del mismo kit. Se almacenaron las muestras a 4 °C.

Para la elaboración de bloques de histología se usó el kit Technovit® 7100. Las muestras se colocaron de manera vertical en el molde y, usando la solución de infiltración y Hardener II (15:1) se cubrió el material vegetal. Posteriormente se colocó el soporte a los cassetes de histología y se agregó más solución de infiltración y Hardener II (15:2) hasta cubrir el soporte. La reacción de polimerización duró 16 horas. Se aplicó una capa de Technovit 2030 para dar soporte al bloque.

Los cortes se realizaron con un microtomo (Leica RM 2035 BioCut Manual Microtome). Se obtuvieron secciones de un grosor de 12-18 µm. Las muestras se colocaron en un portaobjetos y fueron teñidas con Azul de Toluidina al 0.02% durante 3 minutos. Posterior a su tinción, las muestras se secaron a temperatura ambiente durante una hora. Los portaobjetos se cubrieron con una capa de Cytoseal (Electron Microscopy Sciences CytoSeal™) y se les colocó un cubreobjetos.

Las fotografías se obtuvieron con un microscopio estereoscópico Leica EZ4 D.

Medición de frutos

Se colectaron los frutos al término de los tratamientos con luz que se encontraban en la parte más apical de la ramificación (con mayor tiempo a exposición a luz roja) y se obtuvieron las fotografías con un microscopio estereoscópico (EZ4 D/Leica) en formato TIF. La medición de la longitud de frutos se realizó con la ayuda del software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los archivos TIF fueron importados al software ImageJ, se calibró la escala y se realizaron las mediciones. Un aproximado de 3 frutos por planta. Después de medir los gineceos se disectaron para analizar el desarrollo de las semillas y se fotografiaron.

Para calcular el número de granos de polen afectados por el tratamiento de la luz roja se usó la siguiente fórmula: $\frac{\text{Granos de polen tratados con luz roja}}{\text{Granos de polen tratados con luz blanca}} * 100$.

RESULTADOS

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el desarrollo del gineceo a partir de los interactores reportados por De Stefan (2018) y de SPATULA. Se estudió el desarrollo del gineceo con tratamiento de luz roja en plantas silvestres y mutantes de SPT (*spt*), se encontró que los estambres de las plantas expuestas a la luz roja son más cortos y con menos polen que las expuestas a luz blanca. La fecundación y formación de semillas también se vio afectada.

De los interactores de los complejos proteicos de SPATULA (SPT) de tejido de brotes florales cerrados de las líneas *pSPT::SPT:YFP* de *Arabidopsis*, se seleccionaron 10 con base en su abundancia en los datos de la cromatografía líquida a nanoescala acoplada a la espectrometría de masas en tándem (nano LC-MS / MS), separados en un Thermo EASY NanoLC, MS con un espectrómetro de masas Q Exactive Orbitrap FTMS. Entre ellos con alta y baja abundancia de acuerdo con el estadístico usado de Perseus software - t-test FDR: 0.01. Los primeros 6 interactores de la Tabla 1 cuentan con una alta abundancia (Tabla 1). Los otros 4 interactores presentaron baja abundancia, pero se seleccionaron por su expresión en tejidos femeninos (carpelos).

Tabla 1. Interactores de SPATULA con mayor abundancia en los datos de IP/MS-MS.

ID	Nombre	Descripción
At5g46070	GBPL3 GUANYLATE-BINDING PROTEIN-LIKE 3	Proteína con actividad de GTPasa.
At1g01620	PIP1;3 PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;3	Proteína que se localiza en la membrana plasmática. Interactúa con transportadores de auxinas y enzimas de biosíntesis.
At3g04120	GAPC1 GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT	Enzima que cataliza D-gliceraldehído 3-fostato (G3P) en 3-fosfo-D-gliceroil fosfato paso de la glucólisis. Propiedades <i>moonlighting</i> en respuesta a cambios ambientales.
At2g18790	PHYB PHYTOCHROME B	Fotorreceptor para luz roja/roja lejana. Se acumula en el núcleo después de la exposición a la luz roja lejana.
At2g19480	NAP1;2 NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1	Proteína capaz de modular la estructura de la cromatina mediante la regulación del ensamblaje/desensamblaje de nucleosomas.

At5g23680	SAM8 STERILE ALPHA MOTIF (SAM) domain-containing protein	Proteína con dominio SAM regulado por luz de una manera dependiente de COP1. Relacionado con LEAFY
At3g22380	TIC TIME FOR COFFEE	Proteína reguladora del reloj circadiano. Participa en el mantenimiento de la homeostasis metabólica.
At2g33610	SWI3B Switch subunit 3	Componente del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP. Participa en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva del desarrollo.
At2g16365	PCH1 PHOTOPERIODIC CONTROL OF HYPOCOTYL 1	Proteína de la familia F-box. Se une y estabiliza la forma activa del fitocromo B.
At5g25350	EBF2 EIN3-binding F box protein 2	Subunidad del complejo de ligasa de ubiquitina SCF. Interactúa con PIF3.

Los interactores de SPATULA participan en procesos biológicos diversos

Los 10 interactores se clasificaron de acuerdo con su función molecular. Las proteínas clasificadas dentro de la categoría “Respuestas a luz” son 5 proteínas: Proteína 2 de la caja F de unión a EIN3 (EBF2, por sus siglas en inglés), relacionadas con factores de interacción con los fitocromos. Control fotoperiódico del hipocótilo 1 (PCH1, por sus siglas en inglés), con regulación del fotoperiodo. Fitocromo B (PHYB), de los fotorreceptores. Motivo alfa estéril 8 (SAM8, por sus siglas en inglés), la cual es una proteína regulada por luz dependiente de la vía COP1. Hora del café (TIC, por sus siglas en inglés), proteína reguladora del ciclo circadiano.

En la categoría de “Metabolismo” entran 2 enzimas: la proteína similar a la unión de guanilato 3 (GBPL3, por sus siglas en inglés) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa C subunidad 1 (GAPC1, por sus siglas en inglés).

Se encontraron 2 proteínas clasificadas dentro de la categoría “Transcripción”: la proteína de ensamblaje de nucleosomas (NAP1;2, por sus siglas en inglés) relacionada con las histonas, y el interruptor de la subunidad 3 (SWI3B, por sus siglas en inglés) el cual es un remodelador de la cromatina.

Por último, la categoría “Membrana” tiene un interactor relacionado con proteínas de la membrana, la proteína intrínseca 1;3 de la membrana plasmática (PIP1;3, por sus siglas en inglés) (Figura 3).

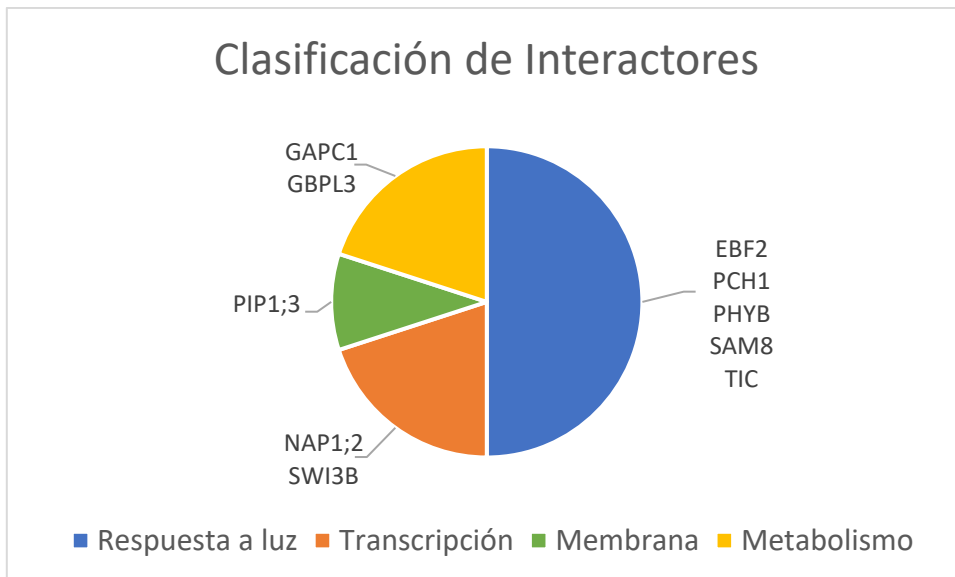


Figura 3. Los interactores de SPT participan en procesos relacionados con la respuesta a luz. Los interactores de SPT identificados mediante IP-MS fueron clasificados; de acuerdo con su función molecular. EBF2, proteína 2 de la caja F de unión a EIN3; PCH1, control fotoperiódico del hipocótilo 1; PHYB, fitocromo B; SAM8, motivo alfa estéril 8; TIC, hora del café; NAP1;2, proteínas de ensamblaje de nucleosomas 1; SWI3B, interruptor de la subunidad 3; GAPC1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa C subunidad 1; GBPL3, proteína similar a la unión de guanilato 3; y PIP1;3, proteína intrínseca 1;3 de la membrana plasmática.

Asumiendo que la luz tiene un efecto sobre SPT, o las vías de respuesta a luz se conectan con las vías mediadas por SPT; el efecto podría deberse a una interacción, pero aún no se sabe si esas interacciones son directas o indirectas con los interactores mencionados. En resumen, la mayoría de los interactores se relaciona con la respuesta a luz; que en conjunto podrían tener un papel importante en el desarrollo del gineceo y al ser PhyB uno de los interactores, se incluyeron experimentos para estudiar el efecto de la luz roja y roja lejana en el desarrollo reproductivo.

Efecto de la luz roja y roja lejana en plántulas

Una vez que se identificó la respuesta a luz como principal función de los interactores, los siguientes experimentos se basaron en la luz, por lo que se propuso usar luz roja y roja lejana para ver el efecto en el desarrollo del gineceo.

El uso de LEDs permitió generar la luz deseada. Para comprobar que los LEDs emitían la luz requerida, se expusieron plántulas de los ecotipos Col-0 y Ler crecidas en medio MS con ciclos de luz roja (660 nm) y roja lejana (730 nm) de 16/8 h luz/oscuridad, Figura 4 D-I. Como control luz blanca y oscuridad (Figura 4 A-C y J-L respectivamente). Ambos ecotipos presentaron una elongación de hipocótilos al ser expuestas a luz roja lejana.

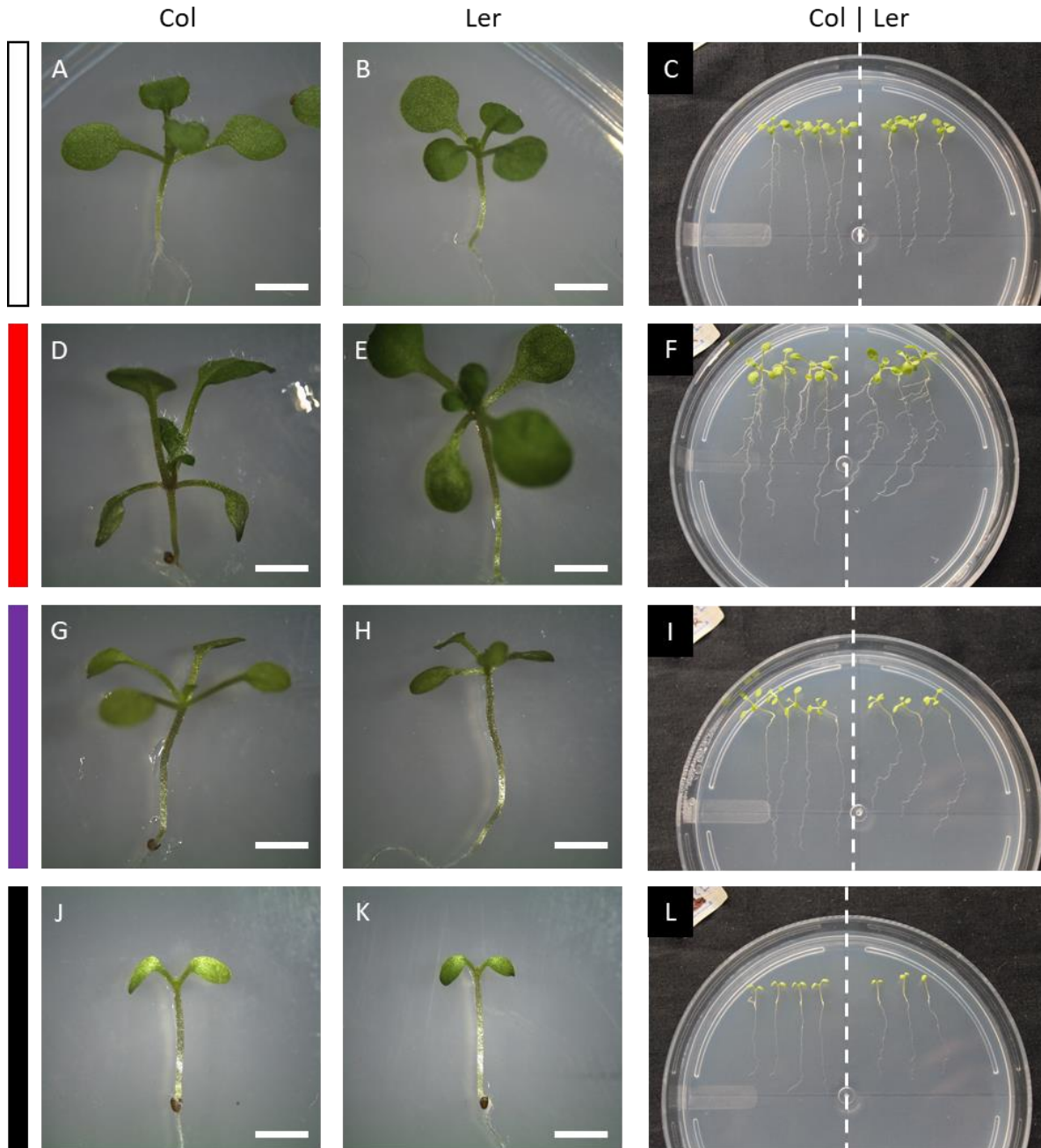


Figura 4. Respuestas morfológicas de hipocótilos en respuesta a luz. Plantas de 4 días de edad (ecotipos Col-0 y Ler) crecidas en medio MS-agar, fueron sometidas a distintos tratamientos con luz/oscuridad en regímenes 16/8 h; (A-C), luz blanca; (D-F), luz roja (660 nm); (G-I), luz roja lejana (730 nm); (J-L), oscuridad. Se evaluó la elongación de los hipocótilos luego de 10 días de tratamiento. Barra de escala= 2mm.

Las plántulas del ecotipo Col-0 crecidas bajo diferentes tipos de luz presentaron distintas longitudes de hipocótilos. Los hipocótilos expuesto a la luz roja lejana presentaron una elongación 2 veces mayor comparada con la elongación producida por la luz blanca. La elongación de hipocótilos por

roja lejana fue de 0.61 cm mientras que en la luz blanca fue de 0.29 cm. La elongación por luz roja resultó ser igual a la de luz blanca. La elongación por oscuridad fue 1.5 veces mayor que la luz blanca (5. A).

En plántulas del ecotipo Ler la elongación de los hipocótilos por luz roja lejana fue 1.4 veces mayor a la de la luz blanca. La elongación por luz roja fue 1.2 veces mayor a la luz blanca. La elongación de los hipocótilos producida por la oscuridad fue 1.3 veces mayor a la luz blanca (5 B).

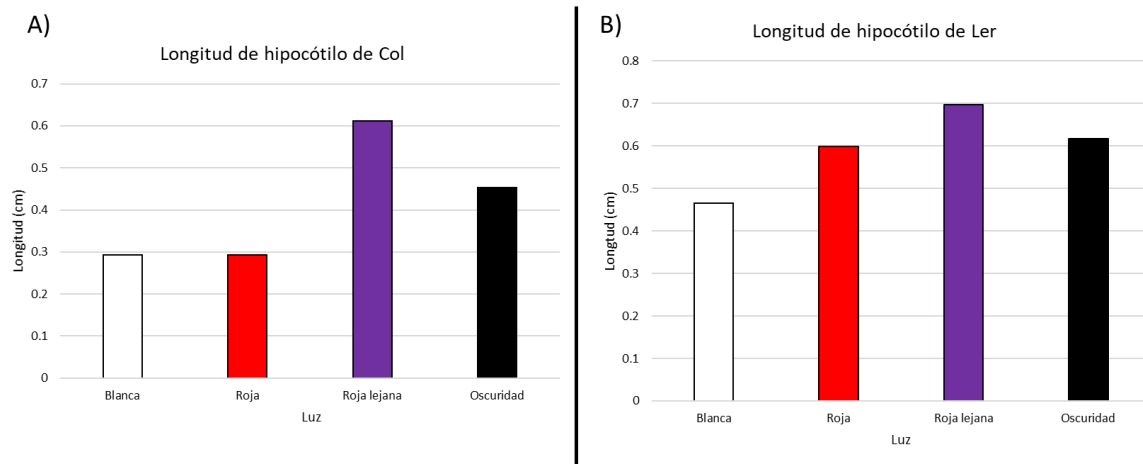


Figura 5. Diferentes tipos de luz afectan la elongación de los hipocótilos de *Arabidopsis*. Plántulas del ecotipo Col-0 y Ler expuestas durante 10 días a de ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h; se midió la longitud de hipocótilos con el software ImageJ para el ecotipo Col-0 (A) y Ler (B). Col-0 n= 12 y Ler n= 9.

Los hipocótilos tuvieron una mayor elongación en respuesta a los LEDs de luz roja y roja lejana en comparación de los controles (luz blanca y oscuridad). Las respuestas obtenidas coincidieron con las reportadas por Holalu & Finlayson (2017). Afirmando que los LEDs funcionan correctamente emitiendo la luz deseada y generando las respuestas fisiológicas previamente descritas en plántulas.

Desarrollo sincronizado de gineceos

Para estudiar el efecto de la luz en una etapa específica del desarrollo del gineceo es necesario contar con muchas plantas, ya que en una planta no hay suficientes gineceos en la misma etapa. Debido a esto se recurrió a la línea de sincronización floral (*pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5*).

El funcionamiento de la línea de sincronización floral tiene como elemento principal al gen APETALA1 (AP1), el cual controla el inicio del desarrollo de la flor, el exón final de este gen fue fusionado traduccionalmente al dominio de unión a hormonas del receptor de glucocorticoides de rata (GR). El transgén AP1 PRO:AP1-GR resultante media la expresión de la proteína de fusión AP1-GR en un dominio que se parece al del gen AP1 endógeno. Para lograr la inducción floral se combina el transgén AP1 PRO:AP1-GR con plantas doble mutantes para AP1 y el parálogo CAULIFLOWER (CAL).

Durante la formación de flores en las plantas *ap1-1 cal-1* al estar bloqueada durante un periodo de tiempo generan una sobreproliferación de meristemos similares a inflorescencias. Cuando son tratadas con Dexametasona (Dexa) conduce a la liberación de la proteína, del citoplasma al núcleo, transformando los meristemos en yemas florales, estando en pausa el desarrollo floral permite sincronizarlo una vez que se aplica Dexa (sobre el meristemo hasta que estos se tornen de color verde oscuro), ya que reactiva el desarrollo (Figura 6 A-D). Las flores después del tratamiento con Dexa se parecen mucho a las plantas de tipo silvestre. Esta característica da pauta para que en una misma planta se tenga un mayor número de gineceos en la etapa deseada.

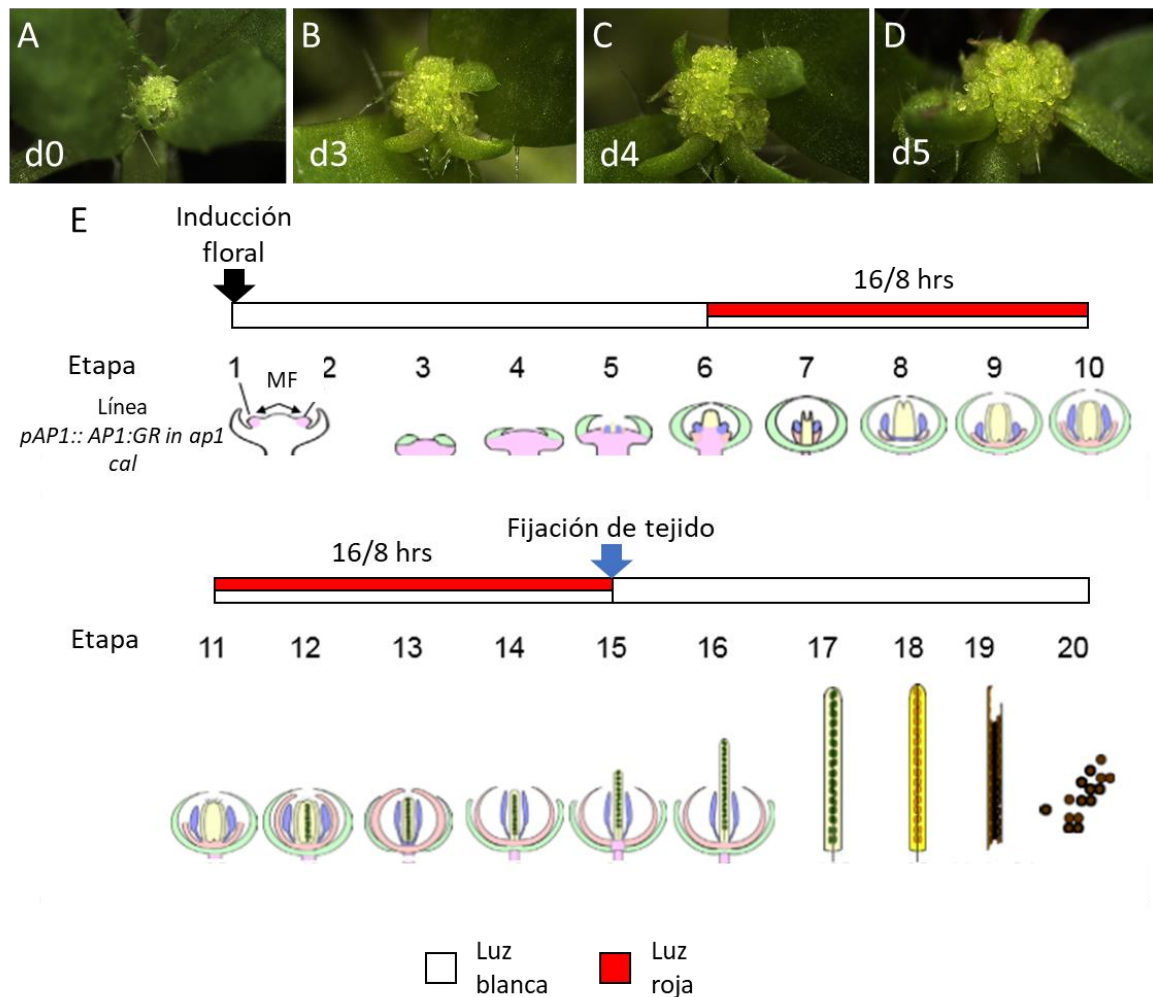


Figura 6. Desarrollo de la línea de sincronización. (A-D) desarrollo de la misma inflorescencia de la línea de sincronización floral después de ser inducida con Dexametasona [10 mM]. El día es representado por d y el número es el día después de la inducción, por ejemplo: d5, 5 días después de la aplicación de Dexa. (E) Esquema experimental de la exposición de flores en etapa 6 a luz blanca y roja con fotoperiodos de 16/8 h luz/oscuridad, durante 10 días. Después fueron pasados a luz blanca. La flecha azul indica cuando el tratamiento con luz roja concluyó y la etapa en la que se colectaron inflorescencias para ser fijadas en FAE. (E) modificado de Alvarez Buylla et al., 2010.

Una prueba sólida de la sincronización fueron los cortes histológicos realizados a inflorescencias fijadas en formaldehído. Naturalmente los gineceos varían en la etapa que se encuentran, El desarrollo normal de las flores en Col-0 no es sincronizado (Figura 7A), contrario a ello la línea de sincronización floral, el cual presenta un desarrollo sincronizado (Figura 7B).

En los cortes se puede apreciar que el desarrollo esta sincronizado presentando un mayor número de gineceos en la etapa 11 (Figura 7B) en comparación con el ecotipo Col-0 que sus gineceos varían de la etapa 5 a la 12 (Figura 7A). Con base en ello la línea permite tener una muestra más grande.

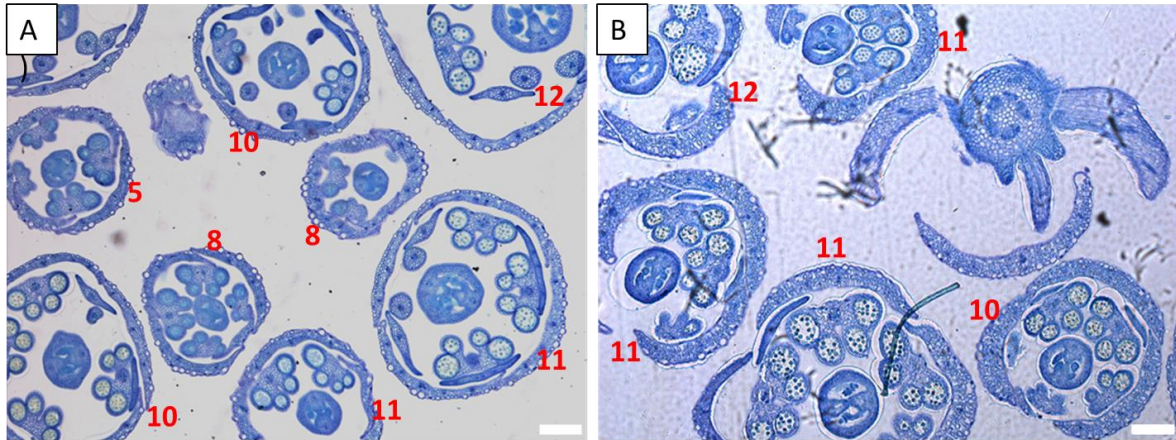


Figura 7. Desarrollo floral en las líneas Col-0 y pAP1::AP1:GR ap1 cal. Cortes transversales de inflorescencias fijadas en FAE teñidos con azul de toluidina, mostrando la etapa de desarrollo de gineceos de líneas (A) Col-0 y (B) pAP1::AP1:GR ap1 cal, (sincronización floral). (A) El ecotipo Col-0 presenta gineceos en etapas que van desde la 5 hasta la 12, mientras que en la línea pAP1::AP1:GR in ap1 cal (B) abarca etapas de la 10 a la 12. Cada número en rojo representa la etapa de desarrollo del gineceo. Barra de escala== 1 mm.

Desarrollo del gineceo en condiciones de luz roja y roja lejana

Una vez determinado que la línea de sincronización floral permite obtener gineceos en etapas específicas y en mayor número, se expusieron estas plantas a los distintos tratamientos con luz.

Después de los 10 días de tratamiento con luz roja las plantas en etapa 12 se transfirieron a luz blanca para continuar con su desarrollo.

Se encontró que las plantas tratadas con luz roja tenían menos polen y sus estambres eran más cortos en comparación con los expuesto a luz blanca (Figura 8 A y C). La luz roja afecta el desarrollo reproductivo masculino reduciendo el número de granos de polen en aproximadamente un 80% en comparación con el control. La longitud de los estambres fue reducida en todas las flores expuestas a luz roja.

La distancia entre la parte apical de los gineceos y la parte apical de las anteras es mayor en el tratamiento con luz roja (Figura 8 B y D). En el tratamiento con luz blanca las anteras alcanzaron la

misma longitud del gineceo, mientras que en el tratamiento con luz roja las anteras solo llegaban al 50 % de la longitud del gineceo.



Figura 8. La luz roja afecta el desarrollo reproductivo masculino. Plantas de la línea pAP1::AP1:GR ap1 cal (sincronización floral), se sometieron a tratamientos con luz blanca (círculo blanco) o luz roja (círculo rojo) durante 10 días. A) muestra las inflorescencias expuestas a luz blanca. B) inflorescencias expuestas a luz roja. C) desarrollo normal y distancia entre el gineceo y las anteras de una flor expuesta a luz blanca. D) flor expuesta a luz roja y la distancia entre el gineceo y las anteras. La elongación de los estambres se ve afectada en el tratamiento con luz roja. Las flechas indican la distancia entre gineceo y antera. ANT: anteras, GIN: gineceo, los asteriscos: polen en la parte apical del gineceo.

Además de la inspección externa se realizó un análisis de las estructuras internas mediante histología. En las láminas se pudieron apreciar cortes transversales de anteras, mostrando los granos de polen de la línea de sincronización floral tratada y no tratada con luz roja. Las anteras expuestas a luz roja presentaron reducción en el tamaño de la antera, mayor tinte con azul de toluidina del endotecio, bandas de fibra y capa intermedia tapetum de las anteras y de granos de polen. Con base a la

comparación de los granos de polen de los expuestos a luz roja contra los no expuestos, en la Figura 9 se aprecia que la estructura de los expuestos es irregular, lo que podría ser solo un retraso en la formación correcta.

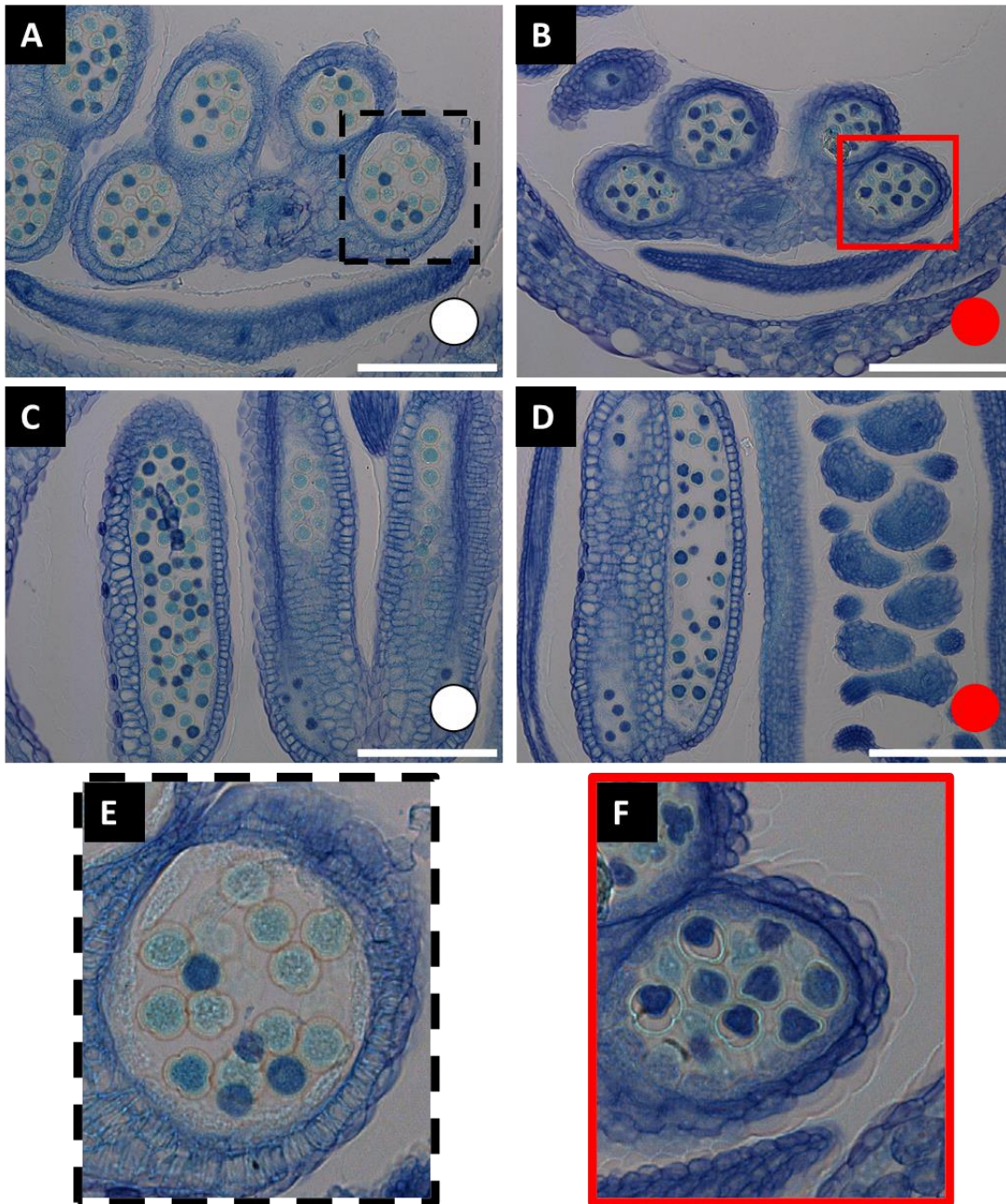


Figura 9. Luz roja afecta la estructura del polen. Cortes transversales de anteras de la línea de pAP1::AP1:GR ap1 cal, tratadas con luz blanca (A), (C) y (E) y luz roja (B), (D) y (F). (A) y (B) corte transversal de antera. (C) y (D) corte longitudinal de antera. (E) y (F) acercamientos de las zonas señaladas de (A) y (B). (E) corte transversal de saco polínico de la antera con granos de polen dentro. (F) corte transversal de saco polínico de una antera expuesta a luz roja. (A) - (F) fijadas en FAE y teñidas con azul de toluidina. Tratamiento con luz blanca, círculo blanco; tratamiento con luz roja, círculo rojo. Barra de escala== 2mm.

Los cortes transversales de las anteras se pueden apreciar en la Figura 9 A y B, los incisos C y D son cortes longitudinales. Los granos de polen expuestos a luz blanca presentan una forma más redonda a comparación de los tratados con luz roja, en los que su estructura es irregular (Figura 9 E y F). La luz roja afectó el desarrollo de los granos de polen de la planta. No podemos descartar que los granos de polen no sean funcionales, ya que si se produjeron algunas semillas.



Figura 10. La luz roja afecta la ramificación de las inflorescencias. Inflorescencias en etapa 12-15 después de 10 días de ser expuesta a luz blanca (A) y luz roja (B). Plantas de sincronización floral después de 30 días de ser expuestas a luz blanca, previamente expuestas a (C) luz blanca y (D) luz roja por 10 días. Barra de escala == 2 cm.

La luz roja puede afectar el desarrollo de los frutos. Las plantas bajo el tratamiento de luz roja presentaron una disminución del número de ramificaciones, reduciendo a un 60 % en comparación con el control (Figura 10 C y D). Una vez que los estambres resultaron afectados, se analizaron los frutos. La respuesta obtenida podría afectar el desarrollo de frutos y la formación de semillas, provocando la aborción de semillas.

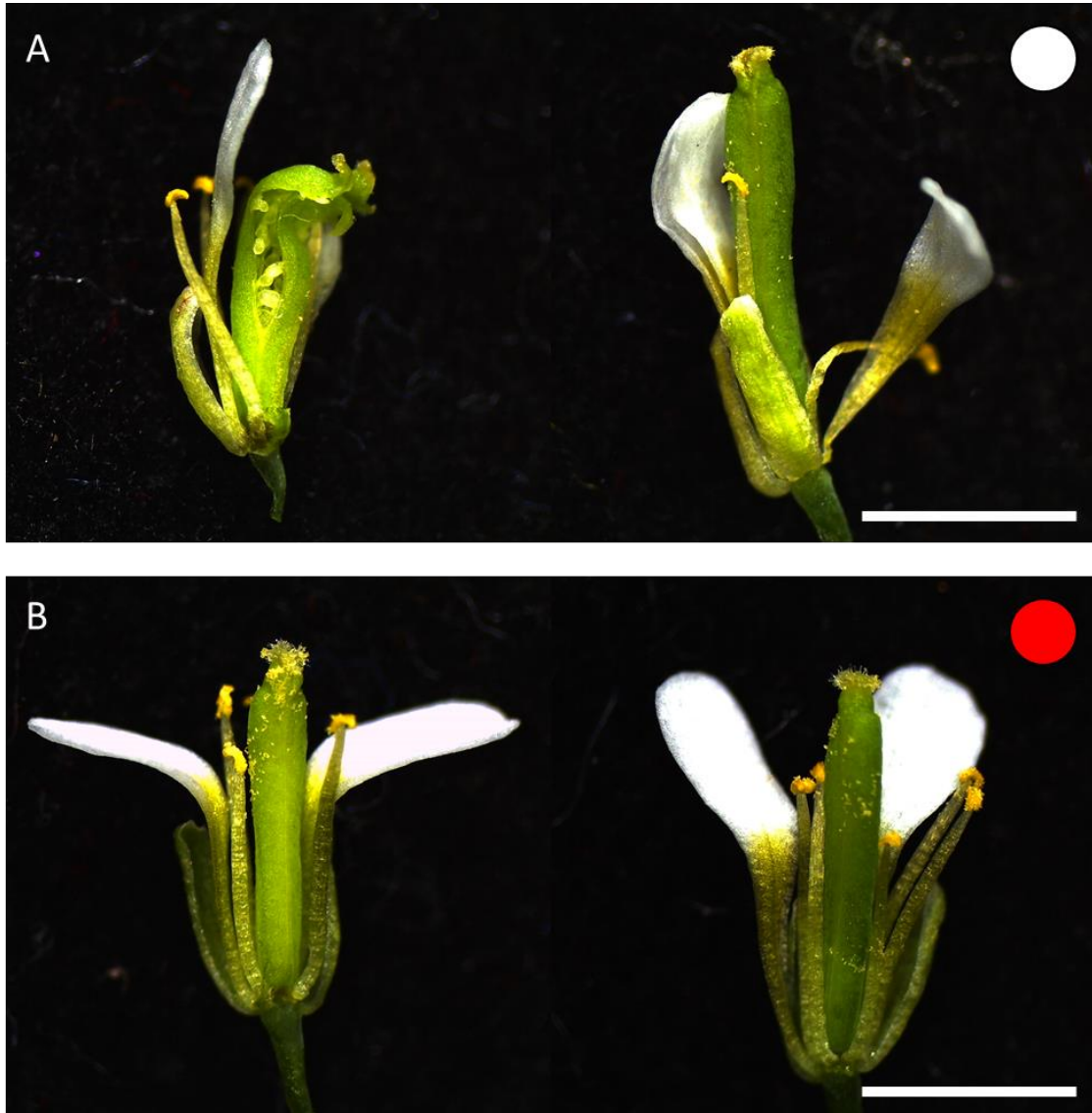


Figura 11. El desarrollo del gineceo de *spt-2* se ve afectado por la luz. Plantas *spt-2* después de ser expuestas por 10 días a ciclos de 16/8 h luz/oscuridad, (A) luz blanca y (B) luz roja. Círculo blanco: luz blanca, el círculo rojo: luz roja. Barra de escala== 2 mm.

Desarrollo del gineceo en la mutante *spt-2* en condiciones de luz roja y roja lejana

Para esto no solo nos interesaba tener una muestra grande con gineceos en la misma etapa, sino determinar si la luz roja es capaz de recuperar el fenotipo de la mutante *spt-2*, en la cual el gineceo no tiene un buen desarrollo, ya que no hay una buena fusión de carpelos.

El fenotipo de la línea mutante *spt-2* consiste en silicuas, donde el desarrollo del septum ocurre solo hasta la mitad de ésta y las semillas son contenidas en la parte apical de la silicua (Groszmann, Paicu & Smyth, 2008). Dicho fenotipo es producto de un cambio conservado de arginina por lisina en el codón 209 dentro del dominio bHLH.

El tratamiento y los ciclos de luz (16/8 h luz/oscuridad) para *spt-2* fueron los mismos, con excepción de que los cortes histológicos, no se pudieron llevar a cabo por causas de fuerza mayor no atribuibles al laboratorio.

El 80 % de las mutantes *spt-2* expuestas a la luz blanca y roja fueron capaces de recuperar el fenotipo silvestre (una correcta fusión de carpelos), mientras que las expuestas a luz blanca expresaron el fenotipo mutante (carpelos sin fusionar), además de una morfología de flor completa bien desarrollada como la de Col-0 (Figura 11). Después se analizaron las semillas comparando las expuestas a luz blanca y la luz roja. Se encontró que el número de semillas obtenidas del tratamiento con luz roja fue 1.5 veces mayor al de la luz blanca. En promedio para la luz blanca se obtuvieron 6 semillas y para luz roja 9 (Figura 12).

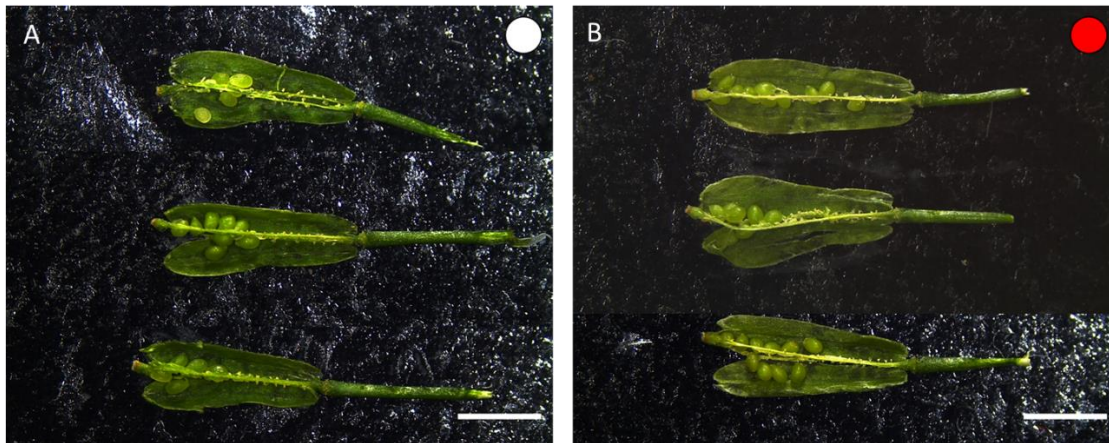


Figura 12. Formación de semillas en plantas mutantes *spt-2* bajo distintos tratamientos con luz. Frutos de *spt-2* después de ser tratados por 10 días con ciclos de 16/8 h de luz/oscuridad. Tratamiento con (A) luz blanca y (B) con luz roja. Círculo blanco: luz blanca, círculo rojo: luz roja. Barra de escala== 2 mm..

DISCUSIÓN

Una de las respuestas a la luz roja lejana es el aumento de la longitud del hipocótilo como se observa en las plántulas de Col-0 indicando la viabilidad del sistema que se implementó. Las plántulas presentaron la respuesta clásica a la luz roja lejana, los hipocótilos tuvieron una mayor elongación en respuesta a los LEDs de luz roja y roja lejana en comparación con el control, lo cual confirmó el funcionamiento correcto de la iluminación LED utilizada. Dichas respuestas concuerdan con las respuestas en plántulas de tomate donde la luz roja y roja lejana inducen la elongación del hipocótilo en un 20% a comparación del control (Chia and Kubota, 2010).

Falcioni (2020) mostró cómo plántulas de tomate crecidas bajo distintas calidades de luz afecta la elongación de los hipocótilos y el espesor de la pared celular, bajo luz roja lejana y oscuridad la pared celular es más delgada, mientras que para la luz roja no parece afectar a la pared celular (Falcioni et al., 2020). La exposición a LEDs por una semana con ciclos de 16/8 h luz/oscuridad es suficiente para lograr respuestas ya reportadas por otros autores acerca de la luz roja y la elongación de hipocótilos.

Esto es interesante ya que, en este trabajo, la longitud de los hipocótilos del ecotipo *Ler* expuestos a luz roja lejana presentan una mayor elongación que el ecotipo Col-0. Sin embargo, estos resultados son opuestos al estudio de Koornneef (1980) donde se muestra que los hipocótilos de las plántulas del ecotipo *Ler* son afectadas negativamente por los diferentes tipos de luz, siendo la luz roja lejana el de mayor efecto inhibitorio en la elongación (Koornneef et al., 1980). Estas diferencias pueden ser debido a que en el estudio de Koornneef no se usaron LEDs.

Es importante destacar que el efecto de la luz sobre la elongación no solo se ha observado en hipocótilo. Otro tejido afectado fue el tubo polínico, al exponer plantas de *Arabidopsis* a luz roja se obtuvo una mayor elongación del tubo polínico de las flores (Chhabra and Malik, 1978). La observación de estos fenotipos sugiere que la luz no sólo es capaz de inducir la elongación de los hipocótilos, sino que a la vez elonga otros tejidos como el tubo polínico e incluso las anteras.

Una herramienta para el estudio del desarrollo del gineceo

La línea de sincronización nos permite tener un mayor número de gineceos en la etapa deseada. La línea *pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5* es confiable para estudiar la correlación entre las firmas metabólicas y el desarrollo (Bellaire et al., 2014). Además permite el análisis de la expresión génica en las primeras etapas del desarrollo de la flor (Wellmer et al., 2006); así como la obtención del perfil de glicerolípidos durante el desarrollo de la flor de *Arabidopsis* (Nakamura et al., 2014), pero no se ha usado en experimentos relacionados con gineceo-fruto o con experimentos relacionados con luz. Encontramos que los gineceos de la línea de sincronización floral presentan el mismo efecto de la luz roja que los gineceos silvestres.

En los cortes realizados de los tejidos fijados se puede apreciar que el desarrollo de las inflorescencias está sincronizado, presentando un mayor número de gineceos en una etapa específica (en este caso etapa 11) en comparación con el ecotipo Col-0, que en los gineceos varían de la etapa 5 a la 12. Se ha reportado que esta línea cumple con el desarrollo normal de una flor después de ser inducidas con Dexametasona (Bellaire et al., 2014; Nakamura et al., 2014). Por ello la línea *pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5* permite tener una muestra más grande en etapas de interés, demostrando una vez más que es una línea confiable para hacer experimentos a gran escala.

Es importante destacar que es la primera vez que se usa la línea *pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5* en este tipo de experimentos y la primera vez que se usa la línea en el laboratorio, además se observa que esta línea es capaz de responder a la luz roja, dando pauta para seguir trabajando con ella para este tipo de experimentos.

Efecto de la luz roja en el desarrollo reproductivo masculino

Una vez abierta la flor se encontró que las plantas expuestas a luz roja tenían menos polen y sus estambres era más cortos que los expuestos a luz blanca. Aunque la línea *pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5* puede llegar a carecer de estambres individuales en condiciones de crecimiento normales, se observó que la luz roja provocaba una reducción en la longitud de los estambres desarrollados (Bellaire et al., 2014).

La luz roja afecta la elongación de los estambres ya que los fitocromos son capaces de modificar la morfología de órganos como son los casos de *A. thaliana* y *B. rapa*, que al exponerse a luz roja y roja lejana los pistilos redujeron su elongación (Brock and Weinig, 2007; Weinig, 2002). Los experimentos de Brock y Weinig (2007) reportan el efecto de las distintas relaciones de luz roja y roja lejana sobre los estambres (Brock and Weinig, 2007).

El fitocromo B interactúa directamente con las proteínas AUX/IAA, al percibir la luz roja suprime la señalización de auxinas, reprimiendo la respuesta a auxinas por la degradación de AUX/IAA (Xu et al., 2018). Por lo que la luz es capaz de controlar la elongación de los estambres. Cuando la luz es percibida por criptocromos y fitocromos es por medio de COP1 que se modula la señalización de auxinas (ARF8.2 y ARF8.4) a través de HY5, HYH y sus genes diana como IAA19, vía relacionada con las auxinas (Marzi et al., 2020), como se ha reportado en los hipocótilos (Mao et al., 2020). Por lo que la variación de elongación entre los estambres expuestos a luz blanca y luz roja puede ser debida en la inhibición de la señalización de las auxinas.

El número reducido de granos de polen dentro del gineceo, que más tarde pasa a ser el fruto (silicua), podría deberse a que los estambres son cortos teniendo una baja posibilidad de alcanzar al gineceo, produciendo gineceos con menor número de semillas.

Con base en la comparación de los granos de polen de las plantas expuestos a luz roja contra los no expuestos se aprecia que la estructura de los expuestos a la luz es irregular esto podría ser solo un retraso en la formación correcta. Esta afectación puede ser debida a que las condiciones ambientales durante el desarrollo de las anteras afecta la composición química del polen (Delph et al., 1997), cambiando así su estructura.

De acuerdo con Weinig (2002) el efecto de la luz roja y roja lejana puede afectar la producción de frutos de la flor ya que en algunas especies el estigma y las posiciones de los filamentos pueden afectar la dispersión del polen, afectando así la autopolinización (Weinig, 2002). De nuevo, la luz roja podría estar cambiando la respuesta de las auxinas, ya que las auxinas regulan la morfogénesis de los estambres y un cambio en su síntesis puede llegar a provocar un efecto negativo en la dehiscencia de las anteras y maduración del polen (Cecchetti et al., 2008; Ghelli et al., 2018).

Se ha identificado que ARF8 regula la lignificación del endotecio (Ghelli et al., 2018), por lo que la exponerse a luz roja la lignificación no ocurra de manera normal, además provocando cambios en la correcta maduración del polen (Cecchetti et al., 2017). En la caracterización realizada por Bellaire (2014) de la línea *pAP1:: AP1-GR ap1-1 cal-5* describen un desarrollo de flores con semillas fértiles, asegurando así que el polen y óvulos se desarrollan de forma normal en condiciones normales de crecimiento (Bellaire et al., 2014), afirmando que el efecto observado en los granos de polen es debido a la luz roja.

El cambio en la estructura del polen podría ser solo un posible retraso en su formación ya que la planta al ser capaz de producir semillas habla de su viabilidad; aunque no se realizó una prueba de Alexander para confirmar que los granos de polen se vieran afectados a nivel fertilidad, pero en el estructural si tiene un efecto evidente.

En este estudio no se hicieron mediciones de la longitud de los tubos polínicos; sin embargo, se observó que las anteras contenían un menor número de granos de polen, los cuales tenían una forma poco uniforme a comparación del polen de las plantas control. Una vez que los gineceos fueron abiertos para analizar el interior se observó que las semillas no tuvieron un desarrollo correcto, resultando incluso abortadas, esto puede ser un efecto de que el polen no es viable, ya que es posible que los granos de polen de las plantas, incubadas con a luz roja se vieran afectadas por la luz.

La variación en la forma esférica del polen puede deberse al estrés por las condiciones de iluminación (Cucinotta et al., 2020). Además, para determinar los sitios de iniciación del óvulo y la identidad del óvulo es necesaria la comunicación entre los factores de transcripción y las hormonas (Cucinotta et al., 2014).

La relevancia del control de agua en el desarrollo floral parece ser un punto importante en el desarrollo de la planta. El contenido relativo de agua de las células del polen podría correlacionar

con la madurez del polen (Pacini and Franchi, 2020), ya que afecta la viabilidad y eficiencia del transporte de polen de la antera al estigma, aunque aún no es muy claro cómo los factores ambientales afectan el polen y sus mecanismos reproductivos (Cortez et al., 2021).

Un estudio mostró que COP1 controla la elongación de los filamentos de los estambres a través de HY5, ya que las mutantes *cop1-4* y *cop1-6* presentaron estambres cortos. Este control por parte de COP1 involucra a IAA19, donde HY5 y HYH regulan la expresión de IAA19 (Marzi et al., 2020). Como recordaremos SPT es capaz de interactuar con SAM8, proteína regulada por luz de manera dependiente de COP1 (Ma et al., 2002).

En estudios posteriores será necesario comprobar la viabilidad del polen, un experimento sencillo podría ser tomar polen de las plantas expuestas a luz roja y polinizar con él manualmente una planta no tratada y observar si estas pueden llevar a cabo la fecundación y producción de semillas viables.

Este efecto no parece tener relación con SPT ya que no se ha reportado que SPT tenga expresión durante el desarrollo de óvulos, la expresión de SPT abarca solo los tejidos de las valvas, los márgenes de las valvas, por lo que se cree que SPT no tenga control sobre dicha respuesta a menos que lo haga en conjunto con otros genes, hasta el momento no hay reporte de dichas interacciones que lo confirmen.

Un estudio enfocado en HEC-SPT mostró que estos son capaces de heterodimerizar y así ambas proteínas interactúan controlando el desarrollo del gineceo, expresando HEC en el septum, tracto de transmisión y estigma. HEC también presenta expresión en los óvulos (HEC1 y HEC2) y en el funículo del óvulo (HEC3) (Gremski et al., 2007). Se ha reportado que SPT promueve la formación de los márgenes del carpelo y facilita el desarrollo del tabique y el óvulo (Cucinotta et al., 2014), su mutante *spt-2* tiene un menor número de óvulos que las silvestres (Nahar et al., 2012). La interacción entre SPT y HEC puede estar afectando debido a la luz, por lo que la transición de óvulo a semillas puede verse truncado por la luz y SPT y no por el grano de polen, provocando una producción pobre de semillas.

Además, la vía de citoquininas está conectada con la vía de las auxinas, donde la señalización de las citoquininas es dependiente de SPT, ya que ambas citoquininas y SPT activan la biosíntesis de auxina y sus respectivos genes de transporte, aunque esta activación sucede en el dominio medio del gineceo. De acuerdo con el modelo de formación de óvulos a partir del dominio del meristemo, la interacción auxinas-citoquininas inician el desarrollo del óvulo desde el dominio medio del meristemo (Galbiati et al., 2013) Sehra 2015.

La respuesta de las auxinas a la luz

Se sabe que las hormonas auxinas son uno de los principales reguladores del desarrollo de las plantas, por ello no es sorpresa que las respuestas observadas en este trabajo están relacionadas con las auxinas, y más cuando el transporte de auxinas es regulada por la evitación de la sombra

(detección de luz roja y roja lejana) (Keuskamp et al., 2010). Los cambios provocados por luz están relacionados con otras señales ambientales, por lo que esta vía de señalización está interconectada con otras vías para regular la fisiología y desarrollo de las plantas, incluyendo vías hormonales (Paik and Huq, 2019).

El transporte de auxinas y la señalización luminosa se relacionan con el desarrollo de plántulas, comunicación entre brotes y raíces y control de la ramificación (Foreman et al., 2011). De acuerdo con el trabajo de Halliday et al. (2009) la relación entre la luz y las auxinas controlan los niveles, el transporte y la capacidad de respuesta de las auxinas.

La relación de luz roja y roja lejana induce a la señalización por auxinas, los recursos se enfocan en la elongación del hipocótilo por lo que la ramificación se ve comprometida (Carabelli et al., 2007), cambios en el transporte de auxinas es lo que regula la elongación (Cecchetti et al., 2008; Keuskamp et al., 2010). Esta coordinación impulsa respuestas en los tejidos de brotes y raíz; afectando la arquitectura de la planta en asociación con las auxinas (Halliday et al., 2009).

Existe una relación entre la luz y las auxinas; la luz es capaz de regular el flujo de auxinas mediante un mecanismo de comunicación entre tallo y raíz. Esta comunicación permite un desarrollo coordinado de ambas estructuras. Ya que la luz modifica la distribución de auxinas sincronizando el crecimiento y desarrollo de ambas. Además, la luz modera la sensibilidad a la auxina dentro de la célula (Halliday et al., 2009).

Se sabe que otros factores de transcripción miembros de la familia bHLH, como HFR1, PIL1, PIL5, PIL6, PIF3 y PIF4 tienen un rol principal en las cascadas de transcripción de la señalización por luz (Huq and Quail, 2002; Huq et al., 2004; Kim et al., 2003). El factor de transcripción SPT de igual forma pertenece a la misma familia, además puede heterodimerizar con un amplio rango de factores de transcripción de la familia bHLH, estas dimerizaciones estabilizarían ambos interactores, logrando así la inducción de genes relacionados con la sombra.

En mutantes de *spt* los fenotipos de gineceo, silicua y el área de semillas fueron restaurados por la mutación nula de PHYB, sugiriendo una relación entre SPT y PHYB durante el desarrollo del gineceo (Foreman et al., 2011).

SPT es considerado un similar factor de interacción al fitocromo (PIL, por sus siglas en inglés), por lo que la relación anterior tiene sentido. Los resultados de Wu et al., (2018) sugieren que en *Arabidopsis* SPT está involucrado en la fotomorfogénesis de una manera dependiente de PHYB (Wu et al., 2018). La vía de la luz y las auxinas comparten objetivos, especialmente durante la respuesta a la evitación de la sombra, efecto producido por la luz roja lejana, por ello la abundancia de transcritos de genes que responden a auxinas aumenta rápidamente en respuesta a la luz con una relación baja de luz roja y roja lejana.

La luz controla el desarrollo de *Arabidopsis* y coordina otras vías celulares, siendo un posible interruptor para el desarrollo, especialmente la luz roja y roja lejana (Xu et al., 2015). No se ha identificado los puntos exactos de interacción entre la señalización de phyB y SPT que controlan la distribución del gradiente de auxinas dentro del gineceo. Nuestros resultados concuerdan con la información reportada de elongación por la luz roja sobre los estambres, resaltando que esta línea es apta para experimentos con luz.

Como ya se ha mencionado para el correcto desarrollo de los tejidos que da el meristemo marginal del carpelo, las hormonas son un factor importante, como las auxinas, ya que estas pueden estar controlando las diferentes regiones del gineceo (Reyes-Olalde et al., 2013).

Un estudio previo demostró que la señalización luminosa puede controlar el flujo de auxinas en la plántula a través de las proteínas PIN1, PIN2 y PIN7 (Laxmi et al., 2008), otro estudio (Halliday et al., 2009) mostró que la luz es clave en el control de la distribución intracelular de PIN2, ya que mantiene su localización en la membrana plasmática y reduciendo sus objetivos vacuolares en el intercambio de proteínas.

Toda esta regulación parece estar mediada por el factor de transcripción de la familia bZIP, ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), el cual pertenece a la vía del receptor de la luz azul, sugiriendo que la regulación del desarrollo por luz es mediante el cambio de la distribución intracelular de las proteínas PIN (Friml et al., 2002). De igual forma podría estar actuando el factor de transcripción SPT, pero participando en la vía del receptor de la luz roja teniendo como objetivo otras proteínas PIN. Aún se desconoce si los diferentes fotorreceptores se dirigen a distintos subconjuntos de proteínas PIN (Halliday et al., 2009).

Se ha reportado que PHYB interactúa con proteínas ARF6 para inhibir el alargamiento de los hipocótilos lo cual es inducido por las auxinas (Mao et al 2019). Recordemos que SPT es un PIL, parecido a un PIF, el cual es capaz de regular de manera dependiente de HY5 la biosíntesis de antocianinas; por lo que se podría esperar que SPT trabaje en conjunto con HY5 para regular positivamente otro proceso como lo es el orquestado de las auxinas (Mao et al., 2020; Sehra and Franks, 2015).

Las respuestas a R:FR puede estar mediada por cambios por otras hormonas principalmente auxinas y SPT pudiera estar participando en el control de los transportadores PIN para modificar la distribución de auxinas.

El efecto de la luz sobre las ramificaciones de la planta

Las plantas bajo el tratamiento de luz roja presentaron una disminución en la ramificación y desarrollo de frutos; así como defectos en la formación de semillas. Al colocar la línea de sincronización floral en las cámaras y exponerlas a luz (blanca y roja) se encontró que las plantas expuestas a luz roja presentaban una menor ramificación en comparación de las plantas control.

La ramificación es afectada negativamente por la luz roja y roja lejana; ambas la inhiben ya que la señalización de auxinas se promueve. Otra respuesta a la luz roja y roja lejana es que son capaces de controlar la arquitectura de la planta como la ramificación (Leduc et al., 2014). Una de las razones por las cuales incrementa la ramificación en una planta es debido a que la planta detecta vecinos cerca, para lo que en una densidad de siembra alta la ramificación se ve reducida (Aguilar-Martínez et al., 2007; Casal et al., 1986).

No obstante, en este experimento a pesar de que las plantas no tenían competencia debido a que en las cámaras se colocaron 2 plantas por tratamiento, por lo que esta respuesta no es debido a competencia con sus vecinos, sino al efecto generado por los LEDs.

Otra de las razones por las cuales hay mayor ramificación es debido al efecto negativo de las mutaciones en el fitocromo B y la relación R:FR en la ramificación se debe a la reducción de la capacidad del crecimiento de yemas; afectando el número de hojas y yemas disponibles para la ramificación (Finlayson et al., 2010).

Esto podría deberse a una menor capacidad de la exportación de auxinas ya que en la mutante de phyB se observa que los brotes presentan una menor capacidad de exportar la auxina en comparación con las plantas silvestres; sugiriendo que phyB suprime la señalización de auxinas para promover la ramificación (Reddy and Finlayson, 2014).

Cabe recalcar que las plantas de la línea *pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5* fue decapitada al principio para romper con la dominancia apical y generar entre 2 y 4 ramificaciones, un estudio reportó que la luz roja y roja lejana sobre plantas decapitadas forman ramas más largas, respuesta provocada por cambios de ABA en los brotes mediada por la señalización de auxinas (Holalu, S. V.; Finlayson, 2017).

Esto concuerda con el estudio en plántulas de *Arabidopsis* donde se mostró que la luz R/FR baja es capaz de inducir el alargamiento de hipocótilos y a su vez detiene el crecimiento del primordio de la hoja, esto permite que los recursos se usen para la elongación, disminuyendo la ramificación. La baja relación de R/FR reduce rápidamente la división de células foliares, probablemente debido a que el gradiente de auxinas es afectado (Carabelli et al., 2007).

Esta respuesta explica que en nuestras plantas expuestas a luz roja presentan un menor número de ramificaciones. Nuestros resultados concuerdan con la literatura, sugiriendo un cambio en la actividad de las auxinas como se describió en los trabajos ya mencionados. La proporción de luz roja y roja lejana altera el crecimiento de las yemas axilares Holalu et. Al. (2017). Esta relación de R:FR genera un efecto sombra, las plantas evitan la sombra a lo que se le conoce como síndrome de evitación de la sombra (*shade avoidance*), de acuerdo con los resultados de Tao et. al. (2008) las mutantes de *shade avoidance* (*sav*) (Tao et al., 2008) necesitan una vía de señalización de auxina para generar una respuesta a la evitación de la sombra, efecto generado por R:FR.

CONCLUSIONES

1. Se encontró que algunos de los interactores de SPT están relacionados con la luz, por lo que se incluyeron estudios para analizar el efecto de la luz.
2. Se comprobó el sistema de inducción por Dexametasona de la línea *pAP1::AP1-GR ap1-1 cal-5* para sincronizar el desarrollo floral, además se demostró que esta línea es útil para estudiar el desarrollo de frutos bajo luz roja y roja lejana.
3. La luz roja afecta el desarrollo del polen y anteras
4. La luz roja afecta la elongación de gineceos y anteras
5. La mutante *spt-2* al ser expuestas a luz roja es capaz de restaurar el fenotipo silvestre, presentando una correcta fusión de los carpelos en la parte apical del gineceo, lo que da pauta para seguir investigando la relación SPT y luz más a fondo.

PERSPECTIVAS

Comprobar si dichos interactores tiene una interacción directa o indirecta con SPT, mediante la técnica de levaduras de doble híbrido (Y2H, por sus siglas en inglés).

Confirmar dichas interacciones de forma *in vivo* y conocer donde está ocurriendo la interacción, mediante complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC, por sus siglas en inglés).

Para continuar con la investigación del papel que podría tener la luz sobre las interacciones físicas (con un efecto positivo o negativo) realizar un experimento de Y2H con adición de un cromóforo para así detectar la luz.

Obtener plantas de doble mutante construidas a partir de los dos interactores que tengan una interacción interesante y ver el efecto en la planta en distintas combinaciones de expresión de cada interactor.

REFERENCIAS

- Aguilar-Martínez, J. A., Poza-Carrión, C. and Cubas, P.** (2007). Arabidopsis Branched1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* **19**, 458–472.
- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schäfer, E. and Quail, P. H.** (2006). Photoactivated Phytochrome Induces Rapid PIF3 Phosphorylation Prior to Proteasome-Mediated Degradation. *Mol. Cell* **23**, 439–446.
- Albertos, P., Wagner, K. and Poppenberger, B.** (2019). Cold stress signalling in female reproductive tissues. *Plant. Cell Environ.* **42**, 846–853.
- Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, Á., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R. V., et al.** (2010). Flower Development. *Arab. B.* **8**, e0127.
- Alvarez, J. and Smyth, D. R.** (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* **126**, 2377–2386.
- Azhakanandam, S., Nole-Wilson, S., Bao, F. and Franks, R. G.** (2008). SEUSS and AINTEGUMENTA Mediate Patterning and Ovule Initiation during Gynoecium Medial Domain Development. *Plant Physiol.* **146**, 1165–1181.
- Bellaire, A., Ischebeck, T., Staedler, Y., Weinhaeuser, I., Mair, A., Parameswaran, S., Ito, T., Schönenberger, J. and Weckwerth, W.** (2014). Metabolism and development – integration of micro computed tomography data and metabolite profiling reveals metabolic reprogramming from floral initiation to silique development. *New Phytol.* **202**, 322–335.
- Brock, M. T. and Weinig, C.** (2007). PLASTICITY AND ENVIRONMENT-SPECIFIC COVARIANCES: AN INVESTIGATION OF FLORAL-VEGETATIVE AND WITHIN FLOWER CORRELATIONS. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00240.x> **61**, 2913–2924.
- Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G. and Ruberti, I.** (2007). Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev.* **21**, 1863–1868.
- Casal, J. J., Sanchez, R. A. and Deregibus, V. A.** (1986). The effect of plant density on

tillering: The involvement of R/FR ratio and the proportion of radiation intercepted per plant. *Environ. Exp. Bot.* **26**, 365–371.

Cecchetti, V., Altamura, M. M., Falasca, G., Costantino, P. and Cardarelli, M. (2008).

Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* **20**, 1760–1774.

Cecchetti, V., Celebrin, D., Napoli, N., Ghelli, R., Brunetti, P., Costantino, P. and

Cardarelli, M. (2017). An auxin maximum in the middle layer controls stamen development and pollen maturation in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **213**, 1194–1207.

Chávez Montes, R. A., Herrera-Ubaldo, H., Serwatowska, J. and de Folter, S. (2015).

Towards a comprehensive and dynamic gynoecium gene regulatory network. *Curr. Plant Biol.* **3–4**, 3–12.

Chhabra, N. and Malik, C. P. (1978). Influence of Spectral Quality of Light on Pollen Tube

Elongation in *Arachis hypogaea*. *Ann. Bot.* **42**, 1109–1117.

Chia, P.-L. and Kubota, C. (2010). End-of-day Far-red Light Quality and Dose

Requirements for Tomato Rootstock Hypocotyl Elongation. *HortScience* **45**, 1501–1506.

Cortez, P. A., dos Santos Silva, L. N. N., de Ornellas Paschoalini, G., Albuquerque-

Pinna, J., Sabinelli, V. and Melo-de-Pinna, G. F. de A. (2021). Light and electron microscopies reveal unknown details of the pollen grain structure and physiology from Brazilian Cerrado species. *Protoplasma* **2021** **1**, 1–14.

Crawford, B. C. W. and Yanofsky, M. F. (2011). HALF FILLED promotes reproductive

tract development and fertilization efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **138**, 2999–3009.

Crawford, B. C. W., Ditta, G. and Yanofsky, M. F. (2007). The NTT Gene Is Required for

Transmitting-Tract Development in Carpels of *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* **17**, 1101–1108.

Cucinotta, M., Colombo, L. and Roig-Villanova, I. (2014). Ovule development, a new

model for lateral organ formation. *Front. Plant Sci.* **5**,.

Cucinotta, M., Di Marzo, M., Guazzotti, A., de Folter, S., Kater, M. M. and Colombo, L.

(2020). Gynoecium size and ovule number are interconnected traits that impact seed

yield. *J. Exp. Bot.* **71**, 2479–2489.

Danisman, S., van Dijk, A. D. J., Bimbo, A., van der Wal, F., Hennig, L., de Folter, S., Angenent, G. C. and Immink, R. G. H. (2013). Analysis of functional redundancies within the Arabidopsis TCP transcription factor family. *J. Exp. Bot.* **64**, 5673–5685.

de Folter, S., Immink, R. G. H., Kieffer, M., Pařenicová, L., Henz, S. R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M. M., et al. (2005). Comprehensive Interaction Map of the Arabidopsis MADS Box Transcription Factors. *Plant Cell* **17**, 1424–1433.

Delph, L. F., Johannsson, M. H. and Stephenson, A. G. (1997). How Environmental Factors Affect Pollen Performance: Ecological and Evolutionary Perspectives. *Ecology* **78**, 1632.

Dortay, H., Gruhn, N., Pfeifer, A., Schwerdtner, M., Schmülling, T. and Heyl, A. (2008). Toward an Interaction Map of the Two-Component Signaling Pathway of Arabidopsis thaliana. *J. Proteome Res.* **7**, 3649–3660.

Falcioni, R., Moriwaki, T., Perez-Llorca, M., Munné-Bosch, S., Gibin, M. S., Sato, F., Pelozo, A., Pattaro, M. C., Giacomelli, M. E., Rüggeberg, M., et al. (2020). Cell wall structure and composition is affected by light quality in tomato seedlings. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **203**, 111745.

Finlayson, S. A., Krishnareddy, S. R., Kebrom, T. H. and Casal, J. J. (2010). Phytochrome regulation of branching in arabidopsis. *Plant Physiol.* **152**, 1914–1927.

Foreman, J., White, J., Graham, I., Halliday, K. and Josse, E.-M. (2011). Shedding light on flower development. *Plant Signal. Behav.* **6**, 471–476.

Friml, J., Wiřniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nat.* **2002** 4156873 **415**, 806–809.

Galbiati, F., Roy, D. S., Simonini, S., Cucinotta, M., Ceccato, L., Cuesta, C., Simaskova, M., Benkova, E., Kamiuchi, Y., Aida, M., et al. (2013). An integrative model of the control of ovule primordia formation. *Plant J.* **76**, 446–455.

Ghelli, R., Brunetti, P., Napoli, N., De Paolis, A., Cecchetti, V., Tsuge, T., Serino, G., Matsui, M., Mele, G., Rinaldi, G., et al. (2018). A newly identified flower-specific

splice variant of AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates stamen elongation and endothecium lignification in arabidopsis. *Plant Cell* **30**, 620–637.

Gremski, K., Ditta, G. and Yanofsky, M. F. (2007). The HECATE genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **134**, 3593–3601.

Hackbusch, J., Richter, K., Müller, J., Salamini, F. and Uhrig, J. F. (2005). A central role of *Arabidopsis thaliana* ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 4908–4912.

Halliday, K. J., Martínez-García, J. F. and Josse, E. M. (2009). Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**,.

Heisler, M. G., Atkinson, A., Bylstra, Y. H., Walsh, R. and Smyth, D. R. (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development*.

Herrera-Ubaldo, H., Zanchetti, E., Colombo, L. and de Folter, S. (2014). Protein interactions guiding carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Plant Biosyst.* **148**, 169–175.

Herrera-Ubaldo, H., Campos, S. E., Luna-García, V., Zúñiga-Mayo, V. M., Armas-Caballero, G., DeLuna, A., Marsch-Martínez, N. and Folter, S. de (2018). An interaction map of transcription factors controlling gynoecium development in *Arabidopsis*. *bioRxiv* 500736.

Holalu, S. V.; Finlayson, S. A. (2017). The ratio of red light to far red light alters *Arabidopsis* axillary bud growth and abscisic acid signalling before stem auxin changes. *J Exp Bot.* **68**, 943–952.

Huq, E. and Quail, P. H. (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**, 2441–2450.

Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K. and Quail, P. H. (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH: Regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science (80-)*. **305**, 1937–1941.

- Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Kong, L., Luo, J. and Gao, G.** (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res.* **45**, D1040–D1045.
- Keuskamp, D. H., Pollmann, S., Voeselek, L. A. C. J., Peeters, A. J. M. and Pierik, R.** (2010). Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 22740–22744.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P.-S. and Choi, G.** (2003). Functional Characterization of Phytochrome Interacting Factor 3 in Phytochrome-Mediated Light Signal Transduction. *Plant Cell* **15**, 2399–2407.
- Koornneef, M., Rolff, E. and Spruit, C. J. P.** (1980). Genetic Control of Light-inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **100**, 147–160.
- Laxmi, A., Pan, J., Morsy, M. and Chen, R.** (2008). Light Plays an Essential Role in Intracellular Distribution of Auxin Efflux Carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **3**,.
- Leduc, N., Roman, H., Barbier, F., Péron, T., Huché-Théliér, L., Lothier, J., Demotes-Mainard, S. and Sakr, S.** (2014). Light Signaling in Bud Outgrowth and Branching in Plants. *Plants 2014, Vol. 3, Pages 223-250* **3**, 223–250.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. and Deng, X. W.** (2007). Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development. *Plant Cell* **19**, 731–749.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R. and Quail, P. H.** (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* **20**, 337–352.
- Liu, X., Liu, R., Li, Y., Shen, X., Zhong, S. and Shi, H.** (2017). EIN3 and PIF3 form an interdependent module that represses chloroplast development in buried seedlings. *Plant Cell* **29**, 3051–3067.
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., Zhao, H. and Deng, X. W.** (2002). Genomic

evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2383–2398.

Mao, Z., He, S., Xu, F., Wei, X., Jiang, L., Liu, Y., Wang, W., Li, T., Xu, P., Du, S., et al. (2020). Photoexcited CRY1 and phyB interact directly with ARF6 and ARF8 to regulate their DNA-binding activity and auxin-induced hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **225**, 848–865.

Marsch-Martínez, N., Zúñiga-Mayo, V. M., Herrera-Ubaldo, H., Ouwerkerk, P. B. F., Pablo-Villa, J., Lozano-Sotomayor, P., Greco, R., Ballester, P., Balanzá, V., Kuijt, S. J. H., et al. (2014). The NTT transcription factor promotes replum development in *Arabidopsis* fruits. *Plant J.* **80**, 69–81.

Marzi, D., Brunetti, P., Mele, G., Napoli, N., Calò, L., Spaziani, E., Matsui, M., De Panfilis, S., Costantino, P., Serino, G., et al. (2020). Light controls stamen elongation via cryptochromes, phytochromes and COP1 through HY5 and HYH. *Plant J.* tpj.14736.

Moubayidin, L. and Østergaard, L. (2014). Dynamic Control of Auxin Distribution Imposes a Bilateral-to-Radial Symmetry Switch during Gynoecium Development. *Curr. Biol.* **24**, 2743–2748.

Moubayidin, L. and Østergaard, L. (2017). Gynoecium formation: an intimate and complicated relationship. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **45**, 15–21.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.

Nahar, M. A. U., Ishida, T., Smyth, D. R., Tasaka, M. and Aida, M. (2012). Interactions of CUP-SHAPED COTYLEDON and SPATULA genes control carpel margin development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1134–1143.

Nakamura, Y., Teo, N. Z. W., Shui, G., Chua, C. H. L., Cheong, W.-F., Parameswaran, S., Koizumi, R., Ohta, H., Wenk, M. R. and Ito, T. (2014). Transcriptomic and lipidomic profiles of glycerolipids during *Arabidopsis* flower development. *New Phytol.* **203**, 310–322.

Nanao, M. H., Vinos-Poyo, T., Brunoud, G., Thévenon, E., Mazzoleni, M., Mast, D., Lainé, S., Wang, S., Hagen, G., Li, H., et al. (2014). Structural basis for

- oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nat. Commun.* 2014 51 **5**, 1–8.
- Pacini, E. and Franchi, G. G.** (2020). Pollen biodiversity – why are pollen grains different despite having the same function? A review. *Bot. J. Linn. Soc.* **193**, 141–164.
- Paik, I. and Huq, E.** (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Semin. Cell Dev. Biol.* **92**, 114–121.
- Quail, P. H.** (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 85–93.
- Reddy, S. K. and Finlayson, S. A.** (2014). Phytochrome B promotes branching in Arabidopsis by suppressing auxin signaling. *Plant Physiol.* **164**, 1542–1550.
- Reyes-Olalde, J. I., Zuñiga-Mayo, V. M., Chávez Montes, R. A., Marsch-Martínez, N. and de Folter, S.** (2013). Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends Plant Sci.* **18**, 644–655.
- Reyes-Olalde, J. I., Zúñiga-Mayo, V. M., Serwatowska, J., Chavez Montes, R. A., Lozano-Sotomayor, P., Herrera-Ubaldo, H., Gonzalez-Aguilera, K. L., Ballester, P., Ripoll, J. J., Ezquer, I., et al.** (2017). The bHLH transcription factor SPATULA enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoecium. *PLoS Genet.* **13**, e1006726.
- Reymond, M. C., Brunoud, G., Chauvet, A., Martínez-García, J. F., Martin-Magniette, M. L., Monéger, F. and Scutt, C. P.** (2012). A Light-Regulated Genetic Module Was Recruited to Carpel Development in Arabidopsis following a Structural Change to SPATULA. *Plant Cell* **24**, 2812–2825.
- Roeder, A. H. K. and Yanofsky, M. F.** (2006). Fruit Development in Arabidopsis. *Arab. B.* **4**, e0075.
- Roeder, A. H. K., Ferrándiz, C. and Yanofsky, M. F.** (2003). The Role of the REPLUMLESS Homeodomain Protein in Patterning the Arabidopsis Fruit. *Curr. Biol.* **13**, 1630–1635.
- Sehra, B. and Franks, R.** (2015). Auxin and cytokinin act during gynoecial patterning and the development of ovules from the meristematic medial domain. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 555–571.

- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G. and Ruberti, I.** (2005). A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Dev.* **19**, 2811–2815.
- Shiu, S.-H., Shih, M.-C. and Li, W.-H.** (2005). Transcription Factor Families Have Much Higher Expansion Rates in Plants than in Animals. *Plant Physiol.* **139**, 18.
- Simonini, S., Stephenson, P. and Østergaard, L.** (2018). A molecular framework controlling style morphology in Brassicaceae. *Development* **145**,.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M.** (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 755–767.
- Song, Y. H., Shim, J. S., Kinmonth-Schultz, H. A. and Imaizumi, T.** (2015). Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115555> **66**, 441–464.
- Tao, Y., Ferrer, J. L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J., et al.** (2008). Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell* **133**, 164–176.
- Tashiro, S., Tian, C., Watahiki, M. K. and Yamamoto, K. T.** (2009). Changes in growth kinetics of stamen filaments cause inefficient pollination in *massugu2*, an auxin insensitive, dominant mutant of Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.* **137**, 175–187.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail, P. H.** (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749–1770.
- Vinson, C. R., Sigler, P. B. and McKnight, S. L.** (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* (80-.). **246**, 911–916.
- Weinig, C.** (2002). Phytochrome photoreceptors mediate plasticity to light quality in flowers of the Brassicaceae. *Am. J. Bot.* **89**, 230–235.
- Wellmer, F., Alves-Ferreira, M., Dubois, A., Riechmann, J. L. and Meyerowitz, E. M.** (2006). Genome-wide analysis of gene expression during early Arabidopsis flower development. *PLoS Genet.* **2**, 1012–1024.

- Wu, M., Upreti, S., Yan, A., Wakeel, A., Wu, J., Ge, S., Liu, Y., Liu, B. and Gan, Y.** (2018). SPATULA regulates floral transition and photomorphogenesis in a PHYTOCHROME B-dependent manner in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **503**, 2380–2385.
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L., Bu, Q., Huang, X., Deng, X. W. and Huq, E.** (2014). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1 Enhances the E3 Ligase Activity of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 to Synergistically Repress Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 1992–2006.
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L. and Huq, E.** (2015). Illuminating Progress in Phytochrome-Mediated Light Signaling Pathways. *Trends Plant Sci.* **20**, 641–650.
- Xu, F., He, S., Zhang, J., Mao, Z., Wang, W., Li, T., Hua, J., Du, S., Xu, P., Li, L., et al.** (2018). Photoactivated CRY1 and phyB Interact Directly with AUX/IAA Proteins to Inhibit Auxin Signaling in Arabidopsis. *Mol. Plant* **11**, 523–541.
- Yamaguchi, S., Smith, M. W., Brown, R. G., Kamiya, Y. and Sun, T.** (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell* **10**, 2115.
- Zúñiga-Mayo, V. M., Gómez-Felipe, A., Herrera-Ubaldo, H. and de Folter, S.** (2019). Gynoecium development: networks in Arabidopsis and beyond. *J. Exp. Bot.* **70**, 1447–1460.