



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Clonación, caracterización molecular y
análisis comparativo *in silico* de los ortólogos
de LEAFY y UNUSUAL FLORAL ORGANS de
Lacandonia schismatica”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

KARLA CITLALLIN SÁNCHEZ LARA



DIRECTORA DE TESIS:

BIÓL. ALMA AMPARO PIÑEYRO NELSON

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Sánchez

Lara

Karla Citlallin

55 74 86 49

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305557429

2. Datos del tutor

Biól.

Alma Amparo

Piñeyro

Nelson

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis

Medrano

González

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Ma. de la Paz

Sánchez

Jiménez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Rigoberto Vicencio

Pérez Ruiz

7. Datos del trabajo escrito

Clonación, caracterización molecular y análisis comparativo *in silico* de los ortólogos de LEAFY y UNUSUAL FLORAL ORGANS de *Lacandonia schismatica*

123 p

2013

A mis padres (Citlallin y Juan Carlos) a quienes les debo la vida. Gracias por su apoyo incondicional y por quererme tanto como lo hacen, por su gran paciencia para dirigirme y por todo su esfuerzo: A mamá por ser mi mejor amiga y la mujer con el corazón más hermoso del mundo. A papá por su gran cariño, dedicación y fuerza, que me hace fuerte a mí. Y a mi hermano (Carlos Antonio) en quien puedo ver el universo entero en su sonrisa y a quien le debo el haber aprendido a reírme de la vida y a disfrutar cada instante como él.

Porque este es un logro en equipo:

¡Lo hicimos!

A mis tías, quienes han sido una gran fuente de cariño, enseñanzas, ejemplo y apoyo desde el primer aliento de vida:

Tía Yuri, Tía Marta y Tía Margarita.

A los que ya no están pero cuyo amor y consejos siempre me guían:
Bisabuelita Benita, abuelita Luz, abuelo Luciano, abuelita Gloria y tía Josefina.

A todos los integrantes de mi sistema familiar

...Por la posibilidad de hacerlo diferente...

*“...You are whatever a moon has always meant
and whatever a sun will always sing is you,
here is the deepest secret nobody knows
(here is the root of the root and the bud of the bud
and the sky of the sky of a tree called life; which grows
higher than soul can hope or mind can hide)
and this is the wonder that's keeping the stars apart

I carry your heart with me (I carry it in my heart)”*

E. E. Cummings.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mami (Talin) y papito (Carlos) pues no terminaría de agradecerles por todo lo feliz que me han hecho, todo lo orgullosa que estoy de ustedes, todo lo que me han dado, ni de decirles todo lo que los quiero o lo importantes que son para mí y por ello, lo resumo, como les he dicho antes: Gracias por la vida.

Gracias por apoyarme tanto en este largo proceso de titulación y no desesperarse porque lo concluyera.

A Hermanito (Carlos): Como te quiero pequeño diablito, gracias por hacer muy alegres estos últimos 3 años y recordarme siempre que me pusiera a hacer la tarea, al fin se acabó!.

A tía Margarita: Gracias por tu inmenso cariño, por todo lo que has compartido conmigo, porque a ti en gran parte te debo el haber llegado a la universidad. Por el apoyo de siempre y el que me extendiste en esta ocasión para los costos de los trámites de titulación.

A tía Yuri: Gracias por enseñarme que cuando uno quiere algo, si el deseo se lo cuelga en el corazón siempre ha de conseguirlo, por tu mucho cariño y tú cuidar de la gente.

A tía Marta: Gracias por en general siempre ver por el bienestar de la familia, por ser un ejemplo de rectitud y cariño.

A tía Josefina: por enseñarme a tomarme la vida con toda la alegría del mundo...hasta llorar de la risa.

A abuelita Gloria cuyo ejemplo, amor y consejos siempre me guían. Y a mi abuelo Luciano por formarme el carácter típico de un Larita, aunque con el Sánchez ya tenía de sobra...

A mis primos (Ranis, Cuauh y Lilipooh): Por crecer juntos.

A los que son mi familia: Abuelito Juan, Cuauhtémoc, Lili, Tenoch, Ana Pau (con curiosidad de verte crecer), Jennifer (gracias por darme algo tan hermoso como es mi hermano ☺), Al pequeño Samu-samu, Hans, Bram (claro ejemplo de pasión, compromiso e inspiración de que la ciencia debe buscar el bienestar global), Norman, Ángel y Sama.

A la Dra. Guillermina Murguía Sánchez por enseñarme los secretos de las flores, y cuya cátedra ha sido decisiva para fomentar mi interés acerca de la biología de las mismas. Así como por su amistad.

A Almita por su paciencia, por ser mi tutora y por su amistad

Al Benjamín y a Bere por habernos conocido hace ya unos 6 años atrás, porque han estado en las buenas y no tan buenas. Al Topis porque verte tan feliz y realizado ahora me llena de emoción y de esperanza. A Bere porque siempre he admirado tu fortaleza y tu capacidad de reír, gracias por contagiarme la risa y la buena vibra.

A Claus por ser mi amiga desde hace ya unos 16 años y las aventuras de todo este tiempo, por ser mi Tou y mi hermana.

A Silvie por ser un ejemplo de bióloga e investigadora, por tu gran pasión por el quehacer científico, por tu apoyo y nuestra hermosa amistad.

A Gaby por ser una de las mejores amigas que podría desear y por tu apoyo incondicional en cada paso, por todas las porras que me echas, por cuidar de los demás.

A Danieliux por las muchas conversaciones, por seguirme el hilo, por tu amistad y ser todo un ejemplo del tipo de biólogo que me hubiera gustado ser.

A los hermanitos del laboratorio, ya que sin sus muy agradables conversaciones, sus comentarios, préstamo de reactivos o de protocolos y apoyo emocional, nunca me hubiera sido posible concluir este trabajo:

Alejandra: Porque este trabajo también es tuyo, pues sólo tú puedes comprender lo largo y cansado que ha sido este camino. Porque tú más que nadie ha discutido esta tesis conmigo. Gracias por tus comentarios, por los varios días de asilo en tu casa, por el apoyo moral y estresarte conmigo. Porque un día llegué a la conclusión de que continuar este camino parecía muy pesado y sin fin, pero que me hacía muy feliz poder seguir conviviendo contigo tan de cerca y eso lo hizo más llevadero.

Gracias por crecer juntas en este y muchos otros aspectos más. Por tu amistad que disfruto tanto, por siempre tener la paciencia de escucharme y por ser mi hermanita Triuridaceae.

Duhyadí: Por darme un gran ejemplo de que pese a las adversidades uno debe ser capaz de sobreponerse y lograr lo que se propone. Por ser una luchadora incansable en muchos aspectos. Por darme ánimos con tu ejemplo de no tirar la toalla por complejo que sea el camino.

Emiliano: Ola ke ase?... Todo lo que se me viene a la mente somos nosotros muriendo de la risa en lugares donde no se debe hacer ruido... Así que gracias por hacer tremendamente divertido este tiempo, por hacerme reír hasta no poder más. Gracias por tus comentarios tan acertados y preguntas sobre esta tesis, por muchas veces enseñarme a hacer las cosas

aunque tú no te percataras de ello, por siempre estar tan extremadamente motivado a hacer las cosas, lo que despertaba en mí ganas de hacer no menos a lo mejor que pudiera.

Estef: Por tu sonrisa, optimismo de siempre y la buena vibra.

Joel: Por tus comentarios, por pasarme artículos, por tus sugerencias y compartir tus ideas conmigo, por esa inteligencia tan profunda que te caracteriza y que tanto me impresiona. Por todas aquellas veces que nos preguntábamos algo y tú terminabas explicándome o complementando mi conocimiento.

Iván: Por esos fines de semana de trabajo en el lab escuchando música, por las mil y una horas que podíamos pasar platicando. Por ser una persona tan mágica, tan inamovible en sus decisiones y con ese gran corazón que tienes.... Y por ser un amigo todo consentidor :).

Minelly: Por tu gran alegría, por chillar juntitas cuando nos llenábamos de frustración y que creíamos que nunca nos íbamos a titular, por independientemente de la tesis hacerme ver que la vida no es tan cuadrada y que las reglas están para romperse. También por tu risa que me encanta tanto porque no puedo evitar que me la contagies y porque contigo puedo ser totalmente yo y espero que tú también sientas eso. Por todas las locuras tan divertidas que podemos hacer juntas.

Stefan: Por ser un ejemplo de personita trabajadora.

Victor: Por hacer mi estancia en el lab muy divertida, por todas esas veces que te molesté con tus reactivos o protocolos y siempre me respondiste con una sonrisa. Por dejarme conocer un poco a una persona tan llena de matices, tan interesante e inteligente. Siempre me impresionó y admiré esa pasión para hacer las cosas, ese equilibrio imperturbable que parece tener y esa gran alegría.

A los amigos que se han quedado a la mitad de este viaje, pero cuyos recuerdos y enseñanzas siempre llevo en el corazón.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Ecología por permitir mi desarrollo profesional y ser un segundo hogar.

A la Biól. Alma Piñeyro Nelson, por ser mi asesora de tesis, por dirigir mis primeros pipeteos en el laboratorio, por sus comentarios e infinita paciencia, así como por el regalo de la investigación independiente.

A los sinodales por sus comentarios y sugerencias:

Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Luis Medrano González, Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez y M. en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz.

A la Dra. Anidia Blanco Jaravio, la Dra. Paola Rojas, al Dr. Juan Estévez y a la M en C. Andrea San Juan por su ayuda en aspectos técnicos.

Al Dr. Renato Capello, el Dr. León Patricio Martínez Castilla y el Dr. Erick Alejandro García Trejo por sus enseñanzas y sugerencias de uso de software, así como apoyo en aspectos metodológicos de elaboración de árboles filogenéticos y valiosos comentarios para esta tesis.

A la Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces por el apoyo académico.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, UNAM y del C3.

Agradezco el apoyo de beca para hacer tesis de licenciatura al proyecto: PAPIIT 226510-3 "Estructura, función y evolución de los complejos de proteínas MADS en el establecimiento del meristemo y la determinación de órganos de la flor de *Lacandonia schismatica*".

Este proyecto esta financiado por CONACyT (180098; 180380; 167705; 152649; 105678) y por DGAPA, UNAM (IN204011-3; IN203113-3; IN226510-3; IB201212-2).

"Iremos de caza, perseguiremos a un organismo del cual desconocemos casi todas sus características, su hábitat, sus costumbres, a tal grado que podríamos estar junto a él sin notarlo. Su rastro es esquivo. Nuestra única certeza reside en que, al igual que los dragones, guardianes de tesoros inexpugnables, custodia un secreto grande sobre la vida.

A diferencia de los héroes clásicos, no dispondremos de la ayuda de Dioses.

Iremos a la caza del monstruo esperanzado"

Chaos-Cador, 2012

"El monstruo esperanzador ha sido generoso, nos ha revelado pistas pequeñas, nos ha dado ilusiones, esperanzas de entender por qué, de repente, un ser se cuestiona su existencia"

Chaos-Cador, 2012

"Hach Akium, Dios de todos los Dioses, creó el cielo y la selva. En el cielo sembró estrellas y en la selva sembró árboles;son una sola las raíces de las estrellas...

Por eso cuando cae un árbol cae una estrella".

Chan Kin "viejo" Selva Lacandona

"The flower is the poetry of reproduction.

It is an example of the eternal seductiveness of life".

Jean Giraudoux

"No se equivoca la semilla cuando muere en el surco para hacerse planta; se equivoca la que, por no morir bajo la tierra, renuncia a la vida".

Rabindranath Tagore

Índice

ABREVIATURAS	I
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 La flor	2
1.2 <i>Lacandonia schismatica</i> (Triuridaceae): Flor homeótica.	3
1.2.1 Estructuras reproductivas de <i>Lacandonia schismatica</i>	7
1.3 Bases morfogenéticas del desarrollo floral: Modelo ABC.	8
1.4 Desarrollo floral: La transición al estado reproductivo	12
1.5 Reguladores de AP3: LEAFY (LFY)	14
1.5.1 Participación en el desarrollo floral	14
1.5.2 Características estructurales	18
1.5.3 Evolución y homología	19
1.6 Reguladores de AP3: UNUSUAL FLORAL ORGANS	20
1.6.1 Participación en el desarrollo floral	22
1.6.2 Evolución y homología	23
1.6.3 Patrones de expresión de ortólogos de UFO	24
1.7 Regulación de AP3 por LFY y UFO	25
1.7.1 Patrones de expresión de UFO y AP3.	27
1.8 Bases genético-moleculares del desarrollo floral en <i>L. schismatica</i>: el desplazamiento de la expresión de <i>LsAP3</i> al centro del meristemo floral explica la formación de estambres centrales en esta especie.	28
2. HIPÓTESIS	32
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. OBJETIVOS	33
5. MÉTODOS	34
5.1 Amplificación de <i>LsUFO</i> y <i>LsLFY</i> por PCR	34
5.1.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA	34
5.1.2 Diseño de oligonucleótidos y amplificación por PCR de <i>LsUFO</i> y <i>LsLFY</i>	34
5.1.3 Clonación de <i>LsUFO</i> , <i>LsLFY</i> y <i>TbLFY</i>	37
5.2 Análisis de las secuencias: <i>LsUFO</i> y <i>LsLFY</i>	38
5.3 Diseño de sondas de <i>LsUFO</i> y <i>LsLFY</i> para hibridación <i>in situ</i>	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1 Obtención de secuencias homólogas de <i>LFY</i> y <i>UFO</i> en <i>L. schismatica</i> y <i>T. brevistylis</i>	41
6.2 Genes reguladores de <i>LsAP3</i>: LEAFY (<i>LsLFY</i>)	44
6.2.1 Obtención de secuencias homólogas de <i>LsLFY</i>	46
6.2.2 Dominios conservados: Extremo N y C terminal	50
6.2.3 Relaciones evolutivas	60
6.2.4 Posibles impactos de la duplicación de <i>LFY</i> y <i>AP3</i> en el fenotipo floral de <i>T. brevistylis</i> y <i>L. schismatica</i>	62

6.2.5	Diseño de sondas.	63
6.3	Reguladores de LsAP3: UNUSUAL FLORAL ORGANS (LsUFO)	65
6.3.1	Obtención de secuencias homólogas de LsUFO	66
6.3.2	Dominios conservados: Caja F	74
6.3.3	Relaciones evolutivas	77
6.3.4	Diseño de sonda de <i>LsUFO</i> y patrones de expresión de ortólogos de <i>UFO</i> en angiospermas	79
6.3.5	Posibles patrones de expresión de LsUFO con base en lo conocido en otras angiospermas y su posible relación con la arquitectura de la inflorescencia.	80
7.	CONCLUSIONES	84
8.	PERSPECTIVAS	87
9.	REFERENCIAS	89
10.	PROGRAMAS UTILIZADOS	98
APÉNDICE 1: Mutantes homeóticos en <i>Arabidopsis thaliana</i> que permitieron proponer el modelo ABC y el modelo del cuarteto floral		99
APÉNDICE 2: Protocolo corto de extracción de DNA de pequeñas cantidades de tejido liofilizado. (Modificado de protocolo largo de extracción de DNA de maíz del Centro de Internacional y Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT).		100
APÉNDICE 3: Vector de clonación		102
APÉNDICE 4: Secuencias consenso para LsUFO, TbUFO, LsLFY, TbLFY y TbLFY2 generadas a partir de datos experimentales y de la información del transcriptoma de <i>L. schismatica</i> y <i>T. brevistylis</i> .		103
APÉNDICE 5: Homólogos de LsLFY utilizados en este trabajo		107
APÉNDICE 6: Homólogos de LsUFO utilizados en este trabajo		109
APÉNDICE 7: Porcentajes de similitud de los dominios conservados de LsLFY y LsUFO respecto a otras embriofitas.		112

ABREVIATURAS

• GENERALES

AA	Aminoácido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid, por sus siglas en inglés)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico sintetizado a partir de una retro-transcripción
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid, por sus siglas en inglés)
RNAasa	Ribonucleasa
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
LB	Cultivo Luria Bertani
MF	Meristemo floral
MI	Meristemo de inflorescencia
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a partir de una retro-transcripción
SAM	Meristemo apical del brote (shoot apical meristem, por sus siglas en inglés)
SCF	Complejo de proteínas ubiquitin ligasas E3. Cuyos componentes centrales son Skp1, Cull1, Rbx1 y una proteína con caja F.
Tm	Temperatura de melting (por sus siglas en inglés)

• GENES

<i>AP1</i>	<i>APETALA 1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AG</i>	<i>AGAMOUS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AP2</i>	<i>APETALA 2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AP3</i>	<i>APETALA 3</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>DEF</i>	<i>DEFICIENS</i> , ortólogo de <i>AP3</i> de <i>Antirrhinum majus</i>
<i>GLO</i>	<i>GLOBOSA</i> , ortólogo de <i>PI</i> de <i>Antirrhinum majus</i>
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>

<i>LsAG</i>	Gen ortólogo de <i>AGAMOUS</i> de <i>Lacandonia schismatica</i>
<i>LsAP3</i>	Gen ortólogo de <i>APETALA 3</i> de <i>Lacandonia schismatica</i>
<i>LsLFY</i>	Gen ortólogo de <i>LEAFY</i> de <i>Lacandonia schismatica</i>
<i>LsPI</i>	Gen ortólogo de <i>PISTILATA</i> de <i>Lacandonia schismatica</i>
<i>LsUFO</i>	Gen ortólogo de <i>UFO</i> de <i>Lacandonia schismatica</i>
<i>NLY</i>	<i>NEEDLY</i>
<i>OsMADS3</i>	Gen ortólogo de <i>AGAMOUS</i> de <i>O. sativa</i>
<i>PI</i>	<i>PISTILLATA</i>
<i>PpLFY1</i> y <i>PpLFY2</i>	Genes ortólogos de <i>LEAFY</i> en el musgo <i>Physcomitrella patens</i>
<i>PRFLL</i>	Gen ortólogo de <i>LEAFY</i> de <i>Pinus radiata</i>
<i>SEP 1-4</i>	Genes <i>SEPALLATA 1, 2, 3, 4</i>
<i>SPWI</i>	<i>SUPERWOMANI</i> ; Gen ortólogo de <i>APETALA 3</i> de <i>O. sativa</i>
<i>TbLFY1</i>	Gen ortólogo 1 de <i>LEAFY</i> de <i>Triuris brevistylis</i>
<i>TbLFY2</i>	Gen ortólogo 2 de <i>LEAFY</i> de <i>Triuris brevistylis</i>
<i>TbUFO</i>	Gen ortólogo de <i>UNUSUAL FLORAL ORGANS</i> de <i>Triuris brevistylis</i>
<i>UFO</i>	<i>UNUSUAL FLORAL ORGANS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>

***Las abreviaturas correspondientes a los homólogos de *LsLFY* y *LsUFO*, utilizados en el presente trabajo se muestran en el apéndice 6 y 7, respectivamente, junto con el número de acceso a las secuencias en el NCBI.**

- AMINOÁCIDOS

Abreviatura 1 letra	Aminoácido	Abreviatura 1 letra	Aminoácido
A	Alanina	M	Metionina
C	Cisteína	N	Asparagina
D	Ácido aspártico	P	Prolina
E	Ácido glutámico	Q	Glutamina
F	Fenilalanina	R	Arginina
G	Glicina	S	Serina
H	Histidina	T	Treonina
I	Isoleucina	V	Valina
K	Lisina	W	Triptófano
L	Leucina	Y	Tirosina

NOTA: Genes se escriben en mayúsculas y cursivas, proteínas en mayúscula, y mutantes en minúsculas y cursivas.

RESUMEN

Lacandonia schismatica es una monocotiledónea hermafrodita que presenta un arreglo heterotópico de los órganos sexuales, -desarrollo de estambres centrales y carpelos que los rodean- siendo un caso de un mutante homeótico natural. Ya que ésta disposición es única para todo el clado de las angiospermas, la comprensión de las causas evolutivas y moleculares que subyacen el fenotipo homeótico de *L. schismatica* es importante porque permite conocer cómo evolucionan los procesos del desarrollo que dan lugar a innovaciones morfológicas.

La presente tesis describe por primera vez la secuencia, estructura y relaciones filogenéticas de la secuencias de aminoácidos de los ortólogos de LEAFY (LFY) y UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) en *L. schismatica* y en su taxón hermano *Triuris brevistylis*. En *Arabidopsis thaliana*, UFO y LFY regulan a *APETALA 3 (AP3)*, por lo que se ha propuesto que estos factores de transcripción subyacen la expresión novedosa de *LsAP3* al centro del meristemo floral lo que, en congruencia con el modelo ABC del desarrollo floral, tiene como consecuencia el desarrollo de estambres centrales.

En los análisis de la secuencia primaria de aminoácidos de los ortólogos de LFY en ambas triuridáceas mexicanas, se encontraron sustituciones de aminoácidos en posiciones altamente conservadas respecto a los ortólogos de otras embriofitas: tanto en el dominio de dimerización (Dominio N-terminal) como en el de unión a DNA (Dominio C-terminal), región que se ha propuesto como fuente de evolución y modificación de la función de este factor de transcripción. Las sustituciones de aminoácidos identificadas, abren la posibilidad de que los ortólogos de ambas triuridáceas pudieran presentar una divergencia bioquímica y funcional en el desarrollo, respecto a las reportadas en otras embriofitas.

Por otra parte, las sustituciones de aminoácidos encontradas en la caja F de *LsUFO* respecto a las de otras embriofitas podrían sugerir la capacidad de *LsUFO* de interactuar con nuevas proteínas blanco como reguladores negativos de *LsAP3*, debido a que *LsUFO*, como parte del complejo SCF, recluta proteínas blanco que son marcadas por ubiquitilación para su posterior degradación por el proteosoma 26S.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La flor

Las angiospermas (División Magnoliophyta) tienen como característica principal a la flor, estructura esencial para la reproducción sexual. Siendo ésta, la estructura definitoria del grupo (Buzgo, *et al.*, 2005). El origen de este linaje sigue siendo un misterio pues en el registro fósil aparece repentinamente ya con una gran variación morfológica donde no están presentes las etapas evolutivas intermedias, lo que constituye el “misterio abominable” que intrigó a Charles Darwin (Soltis *et al.*, 2008).

De los grupos que conforman el clado de las angiospermas, las eudicotiledóneas comprenden alrededor del 75% de las especies de plantas con flor conocidas y presentan flores relativamente estandarizadas que consisten en cuatro órganos diferentes acomodados en verticilos, que del exterior al interior del meristemo floral son: sépalos, pétalos, estambres (androceo), y carpelos (gineceo) (Buzgo, *et al.*, 2005).

La flor no es una estructura simple, sino que presenta una serie de innovaciones que distinguen a las estructuras reproductivas observadas en angiospermas de las presentes en gimnospermas. Algunas de estas características son: 1. Presencia de carpelos cerrados dentro de los cuales se desarrollan óvulos, a diferencia de los conos reproductivos de gimnospermas (Theissen & Melzer, 2007). 2. El hermafroditismo o bisexualidad verdadera (y en algunos casos la separación secundaria en flores unisexuales), mientras que en gimnospermas los sexos se encuentran preponderantemente separados en diferentes estructuras. 3. Un eje reproductivo comprimido en verticilos mientras que las gimnospermas presentan un eje elongado (Theissen & Melzer, 2007). 4. La presencia de órganos del perianto especializados que rodean a los órganos reproductivos. 5. La doble fecundación, que da paso a la formación de un endospermo nutritivo triploide y un embrión diploide (Theissen & Melzer, 2007).

Varios autores han intentado definir el concepto de flor pero no se ha podido llegar a una descripción que incluya los casos de variedad floral que se han observado. Según Theissen y Mezler (2007), la flor puede ser definida como: un eje reproductivo comprimido,

determinado y bisexual compuesto de megaesporangios (carpelos), microesporangios (estambres) y un perianto compuesto al menos de un órgano estéril laminar. Sin embargo, esta definición no incluye flores con simplificaciones secundarias (por ejemplo; flores unisexuales; únicamente con estambres o carpelos).

A nivel molecular, las angiospermas muestran evidencia de duplicación genómica en diferentes linajes, sugiriendo que la poliploidía pudo ser un catalizador importante en la evolución de este grupo (Soltis *et al.*, 2007). A su vez, la variación en la expresión espacio-temporal de diferentes factores de transcripción y otras proteínas homeóticas que actúan como reguladores florales, parecen subyacer a las diferencias en morfología floral documentadas entre las angiospermas basales, algunos linajes de monocotiledóneas y las especies modelo de eudicotiledóneas que han sido más investigadas (Soltis, *et al.*, 2007).

1.2 *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae): Flor homeótica.

Lacandonia schismatica (Martínez & Ramos, 1989; Figura 1.2.1) es una monocotiledónea hermafrodita que posee una inversión en la posición de los órganos sexuales, presentando un androceo central conformado por tres y ocasionalmente cuatro estambres con anteras biloculares de dehiscencia introrsa, que se desarrollan al centro de la flor. El androceo está rodeado por el gineceo, formado por 60-80 carpelos apocárpicos. Cada carpelo presenta un óvulo basal, bitégmico, sésil y anátropo (Martínez & Ramos, 1989; Márquez *et al.*, 1989). Las flores de *L. schismatica* se disponen en una inflorescencia racemosa (Ambrose *et al.*, 2006). Esta especie y la familia a la que pertenece son de hábito micoheterotrófico.

La inversión en la posición de los órganos sexuales separa a *L. schismatica* del resto del aproximadamente cuarto de millón de angiospermas descritas, donde en flores bisexuales el androceo se encuentra en el tercer verticilo floral y al centro de la flor se encuentra el gineceo (Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b). Adicionalmente, en *L. schismatica* los estambres y los carpelos se desarrollan a partir de un primordio compuesto, mientras que el verticilo más externo está ocupado por un perianto basalmente fusionado que comprende seis tépalos en promedio (Martínez & Ramos, 1989; Ambrose *et al.*, 2006). Se ha sugerido que los tépalos de esta angiosperma tienen un desarrollo más cercano a sépalos que a pétalos; debido a la ausencia de expresión de genes de función B en su perianto y al requerimiento de esta

función en *Arabidopsis* para el desarrollo de pétalos, según el modelo ABC del desarrollo floral (Álvarez-Buylla et al., 2010b), como se detalla en el apartado 1.3.



Figura 1.2.1. Flor de *Lacandonia schismatica*. El cáliz está formado por tépalos hialinos (T) y la corola por múltiples carpelos (C) que rodean a los tres estambres (E) centrales. Modificado de Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b

L. schismatica fue inicialmente incluida en una familia monotípica Lacandoniaceae (Martínez & Ramos, 1989) debido a la posición única de sus órganos sexuales, sus anteras introrsas, la fertilización cleistogámica, preántesis y el tipo de desarrollo del gametofito femenino. Sin embargo, Maas-van de Kamer & Maas (1994), Maas-van de Kamer (1995), and Maas-van de Kamer & Weustenfeld (1998) posicionaron a *Lacandonia* dentro de la tribu Triuridae, incluida dentro de la familia Triuridaceae (Gardner, 1843), debido a que al igual

que otros miembros del grupo presenta tépalos, fruto indehiscente y anteras biesporangiadas, así como un hábito micoheterotrófico y carpelos apocárpicos papilosos. Otros estudios recientes de morfología comparada y sistemática también sugieren que debe considerarse un género dentro de la familia Triuridaceae (Vergara-Silva *et al.*, 2003; Rudall 2003; Ambrose *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2004). Esta familia incluye miembros de herbáceas aclorofílicas que viven en simbiosis con hongos micorrízicos (Gandolfo *et al.*, 2002)

Desde el punto de vista de la genética y evolución del desarrollo, la importancia de estudiar a *L. schismatica* radica en que representa un caso de una mutante homeótica natural donde la distribución de los órganos sexuales es un autapomorfismo para el género *Lacandonia* con respecto a todo el clado de angiospermas conocidas (Vergara-Silva *et al.*, 2003). Esta planta ha sido considerada un caso de “monstruo esperanzado” que ha sobrevivido a un cambio morfológico extremo, estableciéndose como una población natural, comprobando que en la naturaleza pueden existir organismos que están sujetos a cambios extremos y discontinuos (macromutaciones), como propuso R. Goldschmidt en *La base material de la evolución (The material basis of evolution, 1940; citado en Dietrich, 2000)*.

L. schismatica está considerada como una especie en peligro de extinción dada la pérdida progresiva de su hábitat natural (Vergara-Silva *et al.*, 2003), siendo endémica a la selva Lacandona de Chiapas, México (Martínez & Ramos, 1989). Esta especie se distribuye en áreas cercanas a los 200 metros sobre el nivel del mar, en puntos aislados y dispersos de la selva tropical perennifolia dentro de la selva Lacandona y posiblemente en la selva tropical de Guatemala (Vergara-Silva *et al.*, 2003). La distribución geográfica de *L. schismatica* corresponde a las antiguas orillas de un lago que data de la última glaciación Pleistocénica en América hace aproximadamente 7000 años (Vergara-Silva *et al.*, 2003). Recientemente, Melo y Alves (2012) reportaron una planta muy similar del mismo género; *Lacandonia brasiliensis*, que fue descubierta en un fragmento de selva de la Mata Atlántica en el noreste de Brasil.

Lacandonia schismatica crece en las proximidades de la triuridácea *Triuris brevistylis*, especie que crece en altitudes mayores y que se extiende a otras áreas neotropicales que

incluyen los bosques de Guatemala (Vergara-Silva *et al.*, 2003). Dada la proximidad geográfica de ambas especies, así como similitudes en el hábito micoheterotrófico, la morfología (tamaño pequeño, desarrollo como inflorescencia racemosa monopodial, flores reducidas actinomorfas, fruto tipo aquenio, vasculatura floral extremadamente reducida, tépalos conados en sus bases, presencia de carpelos apocárpicos, etc.) y de desarrollo (primordio compuesto, desarrollo de las flores de la inflorescencia en sentido contrario a las manecillas del reloj, desarrollo del primordio del carpelo centrífugamente a partir del primordio compuesto, etc.), *L. schismatica* y *T. brevistylis* fueron consideradas especies cercanamente emparentadas (Martínez y Gómez, 1994; Ambrose *et al.*, 2006).

Aunque *L. schismatica* es hermafrodita con androceo central y *T. brevistylis* es dioica, en esta segunda especie se han documentado unos pocos individuos con flores hermafroditas heterotópicas (Martínez y Gómez, 1994; Vergara-Silva *et al.*, 2003). Con el fin de investigar si el fenotipo descrito para ambas especies estaba genéticamente definido o representaba una posibilidad dentro de un continuo de formas florales, Vergara-Silva *et al.* (2003) analizaron 1000 inflorescencias de cada especie. En el caso de *T. brevistylis*, presentó 0.5% de flores bisexuales, mientras que para *L. schismatica* el 2% de las inflorescencias estudiadas presentaron flores unisexuales, de ambos sexos, y se documentaron flores bisexuales con diferencias en el número de órganos reproductivos pero no flores con estambres externos a los carpelos. Además, las formas florales encontradas para ambas especies no se pudieron acomodar en una serie de variación floral continua que permitiera recrear el paso de unisexualidad a bisexualidad (Vergara-Silva *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere que la flor heterotópica de *L. schismatica* es producto de un evento saltacional, que su fenotipo es discreto y que está controlado por una o pocas mutaciones mientras que los módulos genéticos que gobiernan las estructuras sexuales masculinas y femeninas son independientes (Vergara-Silva *et al.*, 2003). Además, estos datos sugerían que el mecanismo genético que es posiblemente responsable de la transformación homeótica de los órganos reproductivos en ambas especies, debió originarse al menos antes de que estos dos taxones divergieran, teniendo el ancestro común una predisposición a la homeósis (Vergara-Silva *et al.*, 2003).

1.2.1 Estructuras reproductivas de *Lacandonia schismatica*

En la descripción botánica inicial, se consideró que *L. schismatica* poseía flores verdaderas con una mutación homeótica fijada en poblaciones naturales (Martínez & Ramos, 1989; Vergara-Silva *et al.* 2003). Sin embargo, pronto surgieron otras interpretaciones que proponían que el fenotipo de *L. schismatica* podía deberse a un fenómeno de reposicionamiento de los estambres durante el desarrollo (Stevens, 1991) o que en realidad representaba una inflorescencia comprimida con apariencia de flor (Rudall, 2003).

En el primer caso, se propuso que los estambres centrales podrían ser producto de una torsión secundaria (Stevens, 1991) pero la observación de la continuidad entre la capa epidérmica de los estambres y la parte central del receptáculo así como el hecho de que los tres primordios de estambre se desarrollan en la parte central del receptáculo desde los primeros estadios de la organogénesis floral, refutaron esta hipótesis (Ambrose *et al.*, 2006).

La segunda interpretación se apoyó en los resultados de análisis filogenéticos basados en marcadores moleculares en donde Triuridaceae se posicionaba como la familia hermana de Pandanaceae. Los miembros de esta familia presentan pseudantios (inflorescencias reducidas con órganos florales abortados), por lo que se propuso que todas las Triuridáceas, incluyendo a *L. schismatica*, podrían tener unidades reproductivas conformadas por inflorescencias reducidas o pseudantios. En este sentido, las flores masculinas distales de *L. schismatica* estarían reducidas dando lugar a lo que se observa como los tres estambres centrales y las flores femeninas proximales serían reducidas a carpelos desnudos (Rudall, 2003). Esta hipótesis fue refutada mediante observaciones morfológicas y series de desarrollo comparativas de *L. schismatica* y *T. brevistylis* donde no se observaron órganos abortados (Ambrose *et al.*, 2006). En el trabajo de Ambrose *et al.* (2006) se documentaron algunas de las características que son consideradas definitorias de una flor verdadera y que están presentes en *L. schismatica*, tales como: 1. Los meristemas de flor están protegidos por una bráctea y se desarrollan en los bordes de un meristemo de inflorescencia desnuda claramente distinguible. 2. La presencia de una bráctea que subtiende al primordio floral se desarrolla en oposición a los tépalos. 3. La ausencia de órganos florales abortados. 4. La progresión de desarrollo de órganos típica de angiospermas no homeóticas de acuerdo a la identidad del

órgano (primero los órganos del perianto, luego estambres y finalmente carpelos), pero con una distribución espacial atípica de los órganos sexuales que sugiere una homeosis fijada genéticamente 5. La presencia de un primordio común para estambres y carpelos que se desarrollan del centro del meristemo floral a la periferia. Los carpelos no se diferencian de este primordio común en verticilos sucesivos como se esperaría si *L. schismatica* fuese una inflorescencia, sino en crestas que radian de la parte distal de cada primordio de estambre hacia el borde del receptáculo. 6. El arreglo trímero de la flor de *L. schismatica*, que es una característica unificante de las monocotiledóneas, aunque también se ha visto en algunas inflorescencias (Ambrose *et al.* 2006; Garay-Arroyo, *et al.* 2012). Los estudios anteriores corroboran la identidad euantial de las unidades reproductivas de *L. schismatica*. Por lo anterior, en este trabajo *L. schismatica* se considera como una especie con flores verdaderas.

1.3 Bases morfogénicas del desarrollo floral: Modelo ABC.

A partir de trabajos de genética clásica e inspirados en el descubrimiento de genes homeóticos en animales como los genes HOX (conservados en todos los linajes de animales y que establecen los ejes antero-posteriores, dorso-ventrales, así como la identidad de los órganos que se desarrollarían en las diferentes somitas), aunado al avance en las técnicas de clonación y manipulación genética, investigadores enfocados en el estudio del desarrollo en plantas comenzaron a estudiar la existencia de genes homeóticos en angiospermas (Nam *et al.*, 2003).

El enfoque inmediato fue estudiar las mutantes florales conocidas con el fin de descubrir los genes involucrados que subyacen sus fenotipos (Ferrandiz-Maestre *et al.*, 1996). Los casos más comunes de homeosis floral eran aquellos donde en las flores mutantes un órgano dentro de un verticilo floral se desarrollaba morfológica y funcionalmente a semejanza de un órgano en otro verticilo. Estas transformaciones podían afectar a algunos o a todos los órganos del verticilo o a varios verticilos a la vez (Ferrandiz-Maestre *et al.*, 1996).

A inicios de los noventa Elliott Meyerowitz *et al.* (1991) integraron la información disponible hasta el momento en torno a mutantes florales homeóticos de *Arabidopsis thaliana* (Apéndice 1) y *Antirrhinum majus* en donde se habían podido identificar los genes involucrados en diferentes transformaciones homeóticas (descritos en Bowman *et al.*, 1989).

con lo que se propuso el “modelo ABC de la identidad de los órganos florales” que tenía la finalidad de explicar las bases morfogénicas del desarrollo de los diferentes órganos florales.

En el modelo ABC del desarrollo floral en *Arabidopsis* (Figura 1.3.1), se propuso que la acción combinatoria de los grupos de genes homeóticos de función A, B y C especifican las cuatro clases de órganos florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) comunes a la mayoría de angiospermas y que se encuentran organizados en verticilos florales concéntricos (Honma & Goto, 2001). La función A, llevada a cabo por los genes *APETALA1* y *APETALA2*, se expresan en el verticilo uno y dos donde permite el desarrollo de sépalos y pétalos en el verticilo respectivo. La función B determinada por los genes *PISTILLATA* y *APETALA 3*, se expresan en el verticilo dos y tres, donde se desarrollan pétalos y estambres en el verticilo respectivo. Y la función C determinada por el gen *AGAMOUS*, que se expresa en los verticilos tres y cuatro permitiendo el desarrollo de estambres y carpelos, en los verticilos respectivos.

La actividad A por sí sola, da lugar al desarrollo de sépalos y junto con la función B permite el desarrollo de pétalos. Cuando la función B actúa junto con los genes de función C, se desarrollan estambres. Finalmente la función C sola da lugar a los carpelos y regula negativamente a la función A (Theissen & Melzer, 2007).

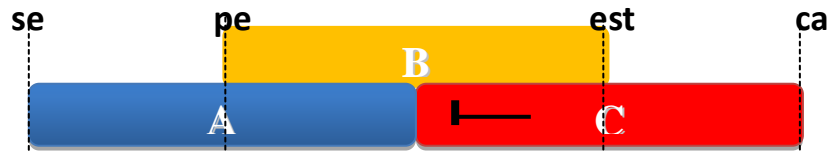


Figura 1.3.1 Modelo ABC del desarrollo floral descrito en *Arabidopsis*. Los genes de función A se expresan en el primer verticilo del meristemo floral y dan lugar al desarrollo de sépalos, la acción conjunta de las funciones A+B determinan pétalos en el segundo verticilo, B+C determinan estambres en el tercer verticilo y la función C, carpelos. Adicionalmente A y C se regulan negativamente.

El modelo ABC se amplió posteriormente para explicar las interacciones proteicas entre factores de transcripción al “Modelo del cuarteto floral” o Modelo ABCE (Theissen & Saedler, 2001), en el que la nueva función E, determinada por los genes *SEPALLATA 1-4* (*SEP 1-4*), es requerida para el desarrollo de todas las categorías de órganos florales (Pelaz *et al.*, 2000). La importancia de esta función fue descrita tras comprobar que la acción combinada de los genes *SEP* junto con genes A y B, son suficientes para convertir hojas en pétalos, además el mutante cuádruple *sep 1-4* resulta en una pérdida completa de identidad de órganos florales (Pelaz *et al.*, 2001).

Los genes *ABCE* son todos factores de transcripción que a excepción de *AP2*, que es parte de la familia de factores de transcripción específicos de plantas llamada AP2/EREBP, pertenecen a la familia MADS-box tipo II. Esta familia tiene una estructura proteica tipo MIKC y es específica de plantas (Pelaz, 2000), y se sabe que sus miembros regulan varios aspectos del desarrollo como el tiempo de floración, la diferenciación de tejidos la identidad de los meristemas, desarrollo de la raíz, etc. (Theissen & Melzer, 2007, Tapia-López *et al.*, 2008, Garar-Arroyo, comunicación personal). Las proteínas tipo MIKC presentan dominios característicos en su estructura que incluyen desde el extremo N al C terminal: el dominio MADS (M-) de unión al DNA; intervining (I-), determinante para la formación selectiva de dímeros de unión a DNA; el keratin-like (K) que favorece la dimerización de proteínas o la formación de complejos multiméricos y el carboxilo C-terminal (C-). El dominio MADS es la región más conservada dentro de esta familia génica y el mayor determinante de unión a DNA (Becker & Theissen, 2003).

Los genes MADS son regulados por factores de transcripción pertenecientes a otras familias génicas, como es el caso del gen *LEAFY (LFY)* (Weigel *et al.*, 1992) y del gen con caja F; *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* (Lee *et al.*, 1997).

De forma general se puede asumir una aplicación casi universal del modelo ABC en el desarrollo floral. Sin embargo la variabilidad encontrada en algunas estructuras florales de diferentes linajes de angiospermas (Soltis *et al.*, 2007) pueden responder a la modificación documentada de los patrones de expresión de los genes ABC. Para explicar este fenómeno se han propuesto dos modelos: el de “límite corredizo” y el de “bordes decadentes”. El primero se refiere a un cambio en el dominio de expresión de genes homeóticos florales que tiene como consecuencia el cambio de identidad del órgano en el verticilo afectado. En este caso dos escenarios son posibles: que se modifique el dominio del patrón de expresión de genes de clase B (hacia el exterior o el interior del dominio de expresión tradicional propuesto en *A. thaliana*) o que los dominios de expresión de los genes de clase A y C se modifiquen simultáneamente, ya que se regulan negativamente. Por otro lado, el modelo de bordes decadentes señala que las transiciones graduales en la morfología floral resultan del gradiente del nivel de expresión de genes de identidad de órganos florales en el meristemo floral (Theissen & Melzer, 2007).

1.4 Desarrollo floral: La transición al estado reproductivo

La vida postembrionaria de las plantas con flor se divide en dos fases distintas: una fase inicial vegetativa durante la cual las hojas con brotes laterales asociados se producen y una fase reproductiva, durante la cual se forman las flores. La transición entre las dos fases está determinada por un proceso complejo conocido como inducción floral, el cual está regulado por señales ambientales y endógenas (Blázquez *et al.*, 1997).

En el ciclo de vida de *A. thaliana*, durante la fase vegetativa, el meristemo apical (SAM, shoot apical meristem, por sus siglas en inglés) produce hojas en sus costados y en la transición hacia la floración el SAM se convierte en el meristemo de inflorescencia (MI). El MI genera los meristemos florales (MFs) en sus bordes (Liu *et al.*, 2009). Los MFs inmaduros crecen y se diferencian del MI. En los MFs se expresan los genes de identidad de órgano floral *ABCE* que dirigen la formación de sépalos, pétalos, estambres y carpelos en la flor (McKim & Hay, 2010). La transformación de SAM en MI está regulado por factores ambientales y endógenos que son integrados en múltiples vías de inducción a la floración (Parcy, 2005).

Durante la inducción a la floración, los genes del meristemo de inflorescencia como *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* y *EMBRYONIC FLOWER 1 y 2 (EMF1, 2)* se encuentran reprimidos en el MF mientras que los genes de identidad del meristemo floral, principalmente *LFY*, *APETALA1 (API)* y *CAULIFLOWER (CAL)*, están activos. La represión mutua de los genes del MI y del MF parece subyacer la definición de la identidad y límites de ambos tipos de meristemos en el SAM en la transición a la floración. Para especificar el MF, *LFY* y *API* regulan genes de inducción floral como *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* y *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (Álvarez-Buylla *et al.*, 2010^a, Figura 1.4.1).

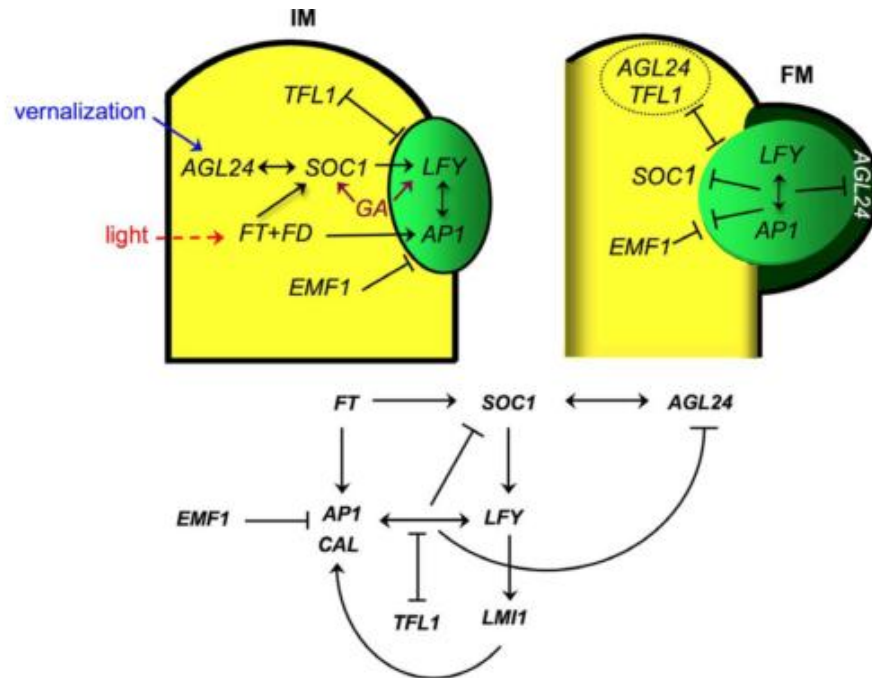


Figura 1.4.1. Participación de los genes del meristemo de inflorescencia en el MI y de los genes del meristemo floral en el MF. La represión mutua de los genes del MI y del MF subyace la identidad y límites de ambos tipos de meristemos en el SAM en la transición a la floración. Tomado de Álvarez-Buylla *et al.*, 2010a.

De los genes de identidad del meristemo floral, *LFY* sobresale debido a que su expresión precede a la de otros genes de identidad del MF y debido a que mutantes *lfy* de pérdida de función presentan el efecto más notable en la identidad de meristemos (Blázquez *et al.*, 1997). Este mutante resulta en una transformación homeótica que revierte la fase floral a vegetativa; hojas y brotes secundarios son producidos en lugar de flores. En contraste, la expresión ectópica de *LFY* durante la fase vegetativa resulta en un desarrollo floral temprano, convirtiendo hojas y meristemos laterales en flores. Por los datos experimentales mencionados, se ha concluido que *LFY* es suficiente y necesario para activar el programa de iniciación floral (Weigel *et al.*, 1992; Weigel & Nilsson, 1995). *LFY* además es el integrador clave de las señales ambientales y endógenas que dan lugar a la floración y actúa para coordinar el establecimiento de la expresión inicial de los genes homeóticos florales (Blázquez & Weigel, 2000; Figura 1.5.1.1). La regulación por parte de *LFY* y su cofactor UFO del gen de función B, *AP3*, es de relevancia primordial, en el presente trabajo por lo que en las siguientes secciones se detallarán los aspectos estructurales, evolutivos y funcionales de ambos transactivadores.

1.5 Reguladores de AP3: LEAFY (LFY)

1.5.1 Participación en el desarrollo floral

LFY es un factor de transcripción específico de las plantas (Weigel, *et al.* 1992) que puede actuar como activador o represor dependiendo del co-factor con el que este interaccionando. Esta proteína tiene dos papeles principales en la floración que son temporales y genéticamente separables: 1. Actúa como regulador de identidad del meristemo floral. Durante esta fase, LFY regula la filotaxia en la flor y el número de órganos y 2. Regula la activación de los genes de identidad de órgano floral y genes involucrados en la morfogénesis floral (Parcy, *et al.* 1998).

El gen *LFY* fue inicialmente reconocido por su función en el desarrollo floral aunque su expresión puede ser detectada débilmente en los primordios de hojas durante la fase vegetativa, pero cuando es inducido por señales externas (vernalización o luz) y/o endógenas (giberelinas), se relocaliza y se expresa fuertemente en los bordes del SAM, donde los meristemos florales se forman (Weigel *et al.*, 1992). Más tarde, cuando los primordios de sépalos se vuelven visibles, la expresión comienza a declinar en el centro de la flor (Parcy *et al.*, 1998). Una vez que los primordios de carpelos emergen *LFY* es detectado en pistilos, estambres y pétalos incipientes y persiste hasta el momento de la elongación del primordio del pétalo, luego del cual no es detectado (Siriwardana & Lamb, 2012a).

En contraste con el RNA de *LFY*, su proteína persiste hasta el momento en el que el primordio de sépalos se vuelve visible, momento en el cual el patrón de los genes ABC se desarrolla. Esta proteína se encuentra en el núcleo y se expresa uniformemente en el primordio de la flor (Moyroud *et al.*, 2009).

El nivel de expresión particular de *LFY* que es requerido en diferentes puntos del ciclo de vida define un gradiente que está regulado por factores ambientales y genéticos. Se ha demostrado que el tiempo de transición a la floración está al menos parcialmente controlado por los niveles de expresión de *LFY* y cuando la transcripción de éste aumenta, tiene como consecuencia la reducción del número de hojas producidas antes de la formación de la primera flor (Blázquez *et al.*, 1997). En consecuencia *LFY* combina propiedades de los genes

que regulan el tiempo de floración y de los genes de identidad del meristemo, actuando como un vínculo directo entre el proceso global de inducción floral y eventos regionales asociados con la iniciación de flores individuales (Blázquez *et al.*, 1997).

LFY regula a los genes homeóticos del desarrollo floral (Figura 1.5.1.1; Weigel, 1992) y mientras éste se expresa a través de todo el meristemo floral, *API*, *AP3* y *AG* se expresan en distintos dominios espaciales por lo que el modo de acción de la proteína codificada por LFY requiere de cofactores para fijar los límites de expresión de genes de identidad de órganos florales (Siriwardana & Lamb, 2012a). LFY activa a los genes ABC mediante el reconocimiento de regiones pseudopalindrómicas en sus promotores, que tienen una secuencia consenso T/ANNNNCCANTGG/TNNNT/A (en donde N puede ser cualquier base) principalmente para *API* y *AG* (Hamès *et al.*, 2008). Aunque los sitios de unión encontrados en el promotor de *AP3* coinciden con el motivo CCNNG (Lamb *et al.*, 2002).

Este factor de transcripción se une directamente al promotor de *API* y lo induce a través de todo el primordio floral, posteriormente la expresión de *API* queda confinada a los primeros dos verticilos florales como consecuencia de la represión mediada por *AG* al centro del meristemo floral (Weigel & Nilsson, 1995). El gen de función C a su vez es regulado por LFY en cooperación con WUSHEL (WUS), (factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas WUS homeobox (WOX)), el cual se expresa únicamente en el cuarto verticilo y le confiere especificidad espacial a la expresión de *AG* al centro del meristemo floral (Mayer *et al.*, 1998).

LFY también regula los genes de clase E; *SEP1*, *SEP2* y *SEP3*, necesarios para la especificación de todos los verticilos florales y genes adicionales MADS-box son requeridos para la especificación de identidad de órganos (Pelaz *et al.*, 2000; Álvarez-Buylla *et al.*, 2010a).

Finalmente LFY activa a los genes de clase B, como se observa en el mutante nulo de *lfy* en el que hay ausencia completa de pétalos y estambres (Lee *et al.*, 1997). LFY activa directamente la expresión de *AP3* mediante la interacción con *UFO*, el cual establece un pre

patrón para la expresión del gen de función B (Lee *et al.*, 1997; Lamb *et al.* 2002; Chae, *et al.*, 2008). UFO es una proteína F-box que participa en el complejo SCF que marca proteínas para su degradación por el proteosoma 26S y su transcrito se expresa en el segundo y tercer verticilo durante el momento en el que el primordio de sépalos se vuelve visible, restringiendo el dominio de expresión del gen B a estos verticilos (Lee *et al.*, 1997).

Una vez activado *AP3*, su proteína es capaz de formar heterodímeros con PI, que ejercen la función B y activan el programa necesario para el desarrollo de pétalos y estambres. Estos genes mantienen su expresión en un asa de autorregulación positiva (Honma & Goto, 2000). Alternativamente es posible que UFO marque algún represor de *AP3* para degradación (Chae *et al.*, 2008).

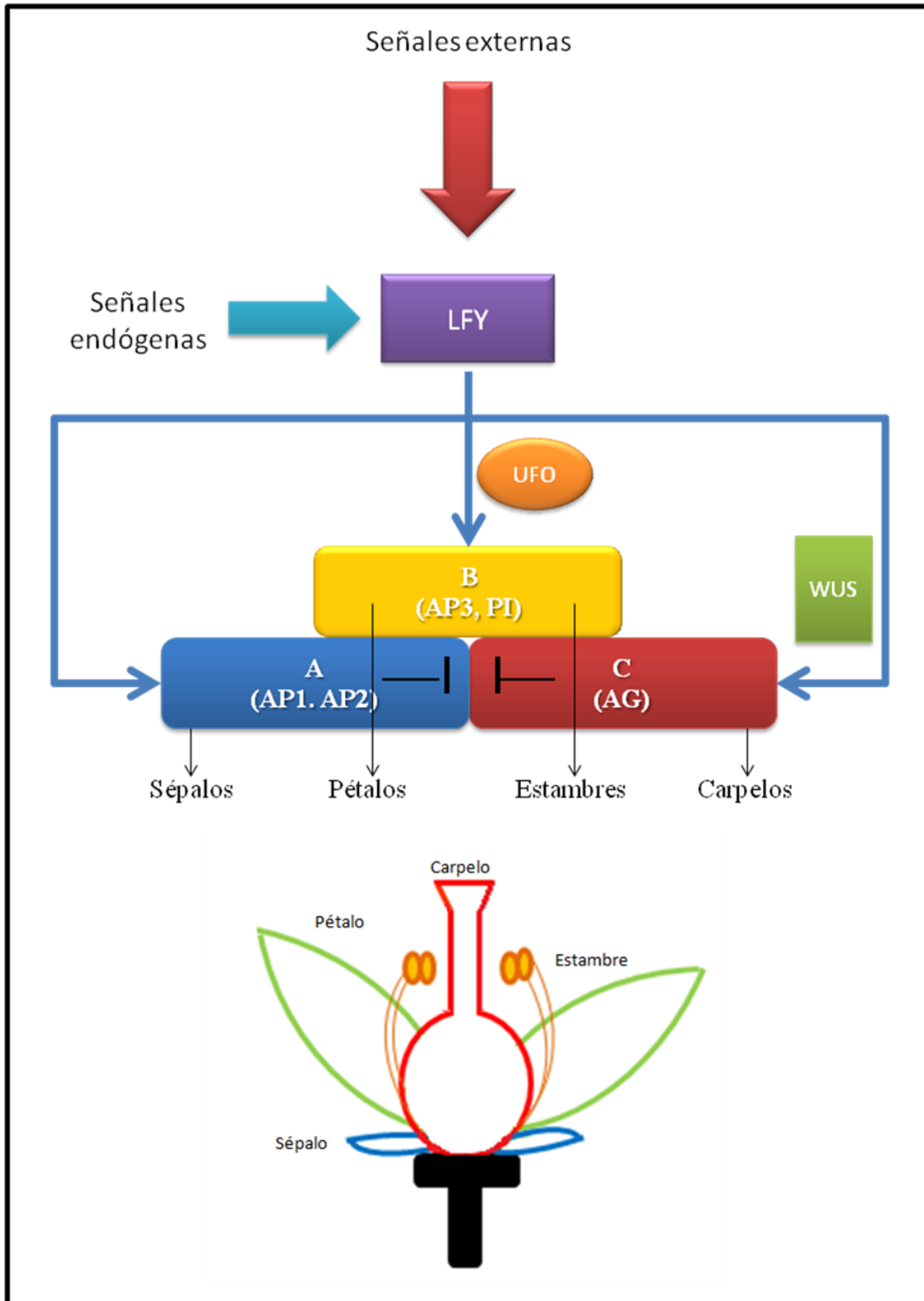


Figura 1.5.1.1. LFY, integra las señales externas (vernalización o luz) y/o endógenas (giberelinas) para el inicio de la floración. Y activa a los genes ABC, de forma directa (función A) y por la interacción entre LFY y cofactores como UFO (función B) y WUS (función C).

1.5.2 Características estructurales

En *Arabidopsis* LFY se ha caracterizado como un factor de transcripción único en plantas y aunque su secuencia primaria no revela similitud con ninguna familia de factores de transcripción estudiada, las proteínas homólogas de LFY en angiospermas están bien conservadas principalmente en las regiones N y C terminales (dominios N y C; Maizel, *et al.* 2005).

La función principal del dominio N-terminal es la de mediar la dimerización de LFY, el cual forma homodímeros u oligómeros, siendo la interacción LFY-LFY esencial para su actividad biológica. Es probable que LFY y posiblemente otros ortólogos actúen en homodímeros u oligómeros (Siriwardana *et al.* 2012a).

El dominio de dimerización está conservado a lo largo de todos los ortólogos de LFY, pero no presenta una secuencia primaria similar a ningún otro dominio. Sin embargo, contiene leucinas conservadas espaciadas de una forma similar a un zipper de leucina, sugiriendo que esta región puede formar estructuras tridimensionales similares (Siriwardana *et al.* 2012b). La mutación de estas leucinas elimina la asociación LFY-LFY corroborando la importancia de estos residuos (Siriwardana *et al.* 2012b). Además, este dominio no es esencial para la unión a DNA pero la estabiliza (Maizel, *et al.* 2005).

El dominio C terminal corresponde al dominio de unión a DNA, el cual corresponde a la región comprendida entre los aminoácidos 366 al 575 (respecto a la secuencia consenso presentada en este trabajo; ver figura 6.3.2.2). La estructura cristalográfica de este dominio ha mostrado que está relacionado con dominios hélice-vuelta-hélice (HTH) y presenta un plegamiento compacto compuesto por dos hebras beta seguidas de siete hélices alfa conectadas por pequeños bucles (Hamès *et al.* 2008).

La fuerte conservación del dominio C-terminal de unión a DNA de los ortólogos de LFY en plantas terrestres, sugiere que la función molecular de este factor de transcripción está conservada. Siendo el dominio de unión a DNA el responsable primario de la divergencia funcional a lo largo de la filogenia (Maizel, *et al.* 2005).

1.5.3 Evolución y homología

LFY se encuentra en todas las plantas terrestres que evolucionaron durante los últimos 400 millones de años, desde briofitas hasta plantas con flor (Maizel, *et al.* 2005). A diferencia de otros factores de transcripción que han evolucionado por duplicación génica para formar familias multigénicas, *LFY* es generalmente de copia única en angiospermas (Riechmann & Ratcliffe, 2000) y dentro de éstas, en especies con duplicaciones linaje-específicas, los parálogos parecen no haber divergido en función (Maizel, *et al.* 2005).

En gimnospermas *LFY* tiene un parálogo: *NEEDLY (NLY)*. Ambos clados representan un evento de duplicación específica de gimnospermas, con la pérdida del linaje *NLY* en angiospermas (Theissen & Mezler, 2007). La presencia de un homólogo de *LFY* y dos de *NLY* en gimnospermas parece ser la regla, a pesar de que *Gnetum gnemon* presenta sólo un gen *NLY*-like (Mouradov *et al.*, 1998). El ortólogo de *LEAFY* en la gimnosperma *Pinus radiata (PRFLL)* se expresa únicamente en conos masculinos, mientras que la expresión de *NLY* está confinada a conos femeninos. No obstante, ambos genes también se expresan en meristemas vegetativos (Mellerowicz *et al.*, 1998; Mouradov, *et al.* 1998). La diferencia en expresión y la carencia de ortólogos de *NLY* en angiospermas dio lugar a la hipótesis sobre el origen evolutivo de las flores a partir de conos masculinos “The mostly male theory” (Frohlich, 2003). Esta hipótesis propone que las flores bisexuales se originaron de estructuras tipo conos masculinos donde se desarrollaron óvulos ectópicos en plantas ancestrales hipotéticas por la restricción en el dominio de expresión del homólogo de *LFY* que permitió la expresión ectópica de un gen tipo C (Theissen & Becker, 2004). Otras teorías del origen de la flor han propuesto cambios espaciales en genes de clase B o cambios concertados de *LFY*, de sus cofactores y de genes MADS box (Theissen & Melzer, 2007).

El estudio realizado por Maizel *et al.* (2005) utilizando ortólogos de *LFY* de diferentes traqueofitas demostró que la habilidad de complementar al mutante de *lfy* de *A. thaliana* decrece conforme aumenta la distancia evolutiva del gen utilizado para el rescate con respecto a esta dicotiledónea. Lo anterior es resultado de cambios en la especificidad de unión a DNA (mediado por mutaciones en el dominio C-terminal) en las proteínas de los ortólogos de *LFY* más distantemente relacionados. Esto sugiere un continuo de cambios no

neutrales y discretos más que una modificación repentina.

En el musgo *Physcomitrella patens*, los ortólogos de *LFY* (*PpLFY1* y *PpLFY2*) regulan aspectos generales del ciclo de vida como la primera división del cigoto. Mientras que en gimnospermas y angiospermas los genes tipo *LFY* se han asociado con la formación de estructuras reproductivas como conos y flores, respectivamente (Siriwardana & Lamb, 2012a), varios genes tipo *LFY* en gimnospermas se expresan en la fase vegetativa, apoyando la idea de que la función ancestral de este gen estaba relacionada con el control de la actividad de división celular y posicionamiento de las nuevas células, más que con la reproducción (Moyroud *et al.*, 2010). Es posible que como consecuencia de las modificaciones en la especificidad de unión a DNA, la actividad bioquímica de *LFY* también se haya modificado a lo largo de la filogenia de traqueofitas (Maizel *et al.*, 2005).

1.6 Reguladores de AP3: UNUSUAL FLORAL ORGANS

UFO es una proteína que contiene un motivo F-box o caja F que está conservado en eucariontes (Laufs, 2003; Ni *et al.*, 2004). Las proteínas F-box son un componente del complejo SCF el cual, en *A. thaliana*, está compuesto por otras tres proteínas: cullin1, Rbx1 y Skp1 (Craig & Tyers, 1999; Figura 1.6.1). El complejo SCF actúa como una ubiquitin ligasa E3 marcando proteínas para degradación mediada por el proteosoma 26S (Deshaies, 1999). Este complejo controla la especificidad de ubiquitinación al facilitar la transferencia de ubiquitina a blancos apropiados. De esta forma el sistema de ubiquitina-proteosoma de degradación de proteínas intracelular controla la abundancia de varias proteínas reguladoras (Craig & Tyers, 1999).

En el complejo SCF las proteínas F-box sirven como componentes adaptadores, dando definición sustrato-específica al complejo SCF para la ubiquitilación de la proteína blanco y su marcaje para degradación (Gagne *et al.*, 2002). En *Arabidopsis thaliana* se han calculado la existencia de alrededor de 694 genes *F-box* potenciales, haciendo a esta superfamilia de genes una de las más grandes en plantas (Gagne *et al.*, 2002). La sorprendente expansión de esta familia posiblemente refleja el reclutamiento de proteínas F-box para regular una gran variedad de procesos biológicos (como la gametogénesis masculina, la señalización de hormonas, el tiempo de floración y desarrollo de órganos florales, el reloj circadiano, la

fotomorfogénesis, etc.), lo que sugiere que la degradación de proteínas y el uso de complejos SCF es un mecanismo de control del desarrollo prevalente en plantas (Gagne *et al.*, 2002; Risseuw *et al.*, 2003). Las proteínas blanco del complejo SCF incluyen factores de transcripción, reguladores del ciclo celular o ambos (Laufs, 2003).

El control de la actividad y abundancia de factores de transcripción o de sus cofactores por el marcaje para proteólisis parece ser el mecanismo por el cual las células pueden encender o apagar efectivamente la expresión de genes río abajo (Chae *et al.*, 2008). Además del marcaje para degradación de proteínas, la ubiquitilación puede tener un papel no proteolítico de modificación de actividad de proteínas u ocluir físicamente las interacciones proteína-proteína (Horwitz *et al.*, 2007).

Es probable que el papel de UFO sea marcar proteínas que controlen el patrón normal de crecimiento del primordio floral joven al limitar el número de divisiones celulares en la región central del meristemo durante la etapa en la que el primordio de flor está claramente delimitado a partir del MI (Samach *et al.*, 1999). Por otro lado, el ortólogo de UFO en *Antirrhinum majus*; FIM, interacciona con tres homólogos Skp1 llamados FAP 1, 2, 3, estas tienen un patrón de expresión sobrelapante con FIM, sugiriendo que el desarrollo floral puede estar controlado por una familia de complejos SCF^{FIM} (Ingram *et al.*, 1997).

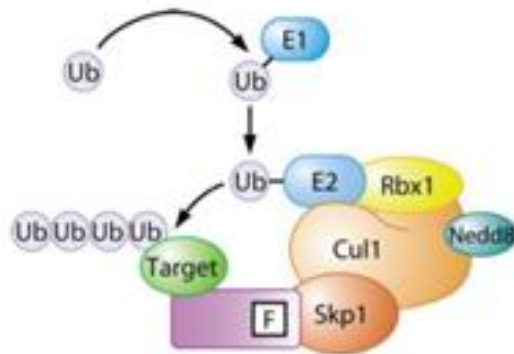


Figura 1.6.1. El complejo SCF está integrado por proteínas como cullin1, Rbx1 y Skp1 y una proteína con caja F. En éste complejo, las proteínas con caja F sirven como componentes adaptadores dando sustrato-específico para su ubiquitilación y su marcaje para degradación mediada por el proteosoma 26S. Tomado de Kipreos & Pagano, 2009.

1.6.1 Participación en el desarrollo floral

A partir de la descripción del fenotipo del mutante de *ufo* en *A. thaliana*, se ha inferido que *UFO* interviene en varios aspectos del desarrollo floral (Figura 1.6.1.1) que incluyen: 1. Especificación de la identidad del meristemo floral al interactuar con *LFY* y *AP1* (Levin & Meyerowitz, 1995). 2. Establecimiento del patrón de iniciación en los tres verticilos internos: pétalos, estambres y carpelos (Laufs, 2003; Ingram, *et al.* 1995). En las mutantes *ufo* se observan alteraciones más severas en los verticilos dos y tres donde además de alterarse el número de órganos y la filotaxia, también se observan sustituciones homeóticas: los pétalos se transforman en sépalos y los estambres en carpelos, aunque también se observan órganos mosaico en ambos verticilos (Durfée *et al.*, 2003). 3. Regulación positiva directa de la expresión de *AP3* e indirecta de la expresión de *PI*. Por lo que es requerido para el desarrollo de pétalos y estambres. *UFO* mantiene la transcripción temprana de *AP3* de forma independiente a su papel en el crecimiento temprano del primordio. (Samach *et al.*, 1999). 4. Se ha propuesto que regula la proliferación celular y el crecimiento de órganos debido a que las flores mutantes de *ufo* muestran defectos variables en el tamaño y número de órganos así como en su patrón de iniciación; desarrollando varios órganos fusionados. (Lee *et al.*, 1997). Además, el dominio F-box de las proteínas *UFO* y *FIM* tienen una similitud a nivel de secuencia con tres proteínas reguladoras del ciclo celular: la ciclina F, *Cdc4p* y *Skp2p* (Chae *et al.*, 2008).

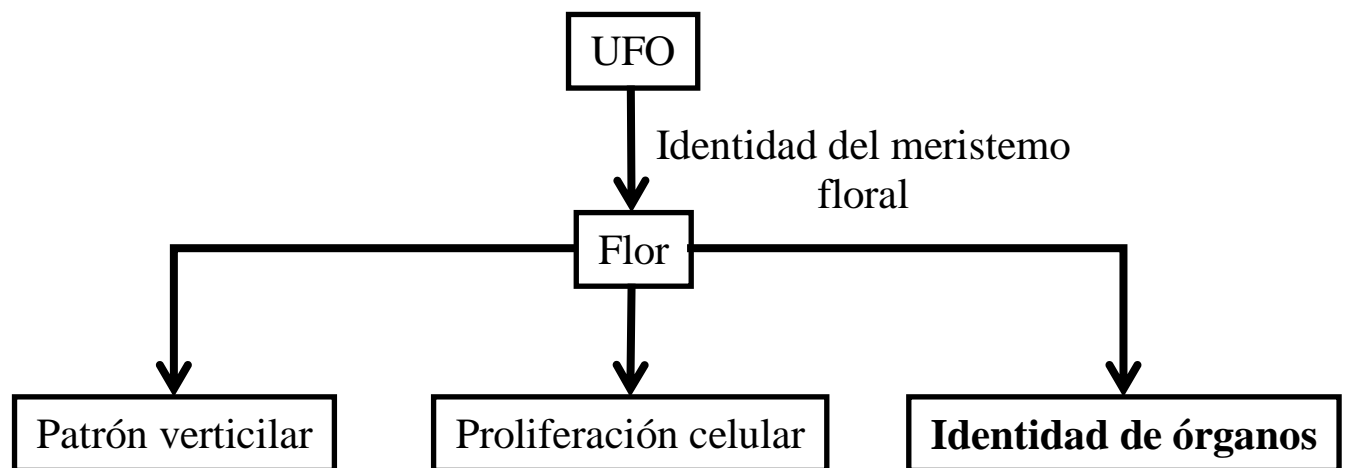


Figura 1.6.1.1. Participación de *UFO* durante el desarrollo floral.

1.6.2 Evolución y homología

UFO y sus ortólogos en angiospermas no han sido tan ampliamente estudiados como otras proteínas involucradas en regular la organogénesis floral, por lo que en esta sección se presenta la información disponible que está concentrada en las especies modelo *A. thaliana* y *A. majus* para dicotiledóneas, así como en *Oryza sativa* para monocotiledóneas (Levin & Meyerowitz, 1995; Ingram *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 2007).

En eudicotiledóneas, las funciones de UFO de *A. thaliana* y FIM de *A. majus* están parcialmente conservadas. A nivel de secuencia las proteínas UFO y FIM son similares, así como en el fenotipo de sus mutantes (Ingram *et al.*, 1995). Sin embargo, UFO parece regular de manera diferencial a los genes B (a través de la regulación de *AP3*), mientras que FIM regula tanto a los genes B como al gen C (Ingram *et al.*, 1995). Esta inferencia fue hecha a partir de análisis de hibridación *in situ* de RNAm de genes BC en fondos mutantes *fim* y *ufo*, respectivamente. En mutantes *fim* los niveles de transcrito del ortólogo de función C se reducen mientras que la expresión del ortólogo C en mutantes *ufo* no presenta alteraciones dramáticas con respecto al silvestre. Estos resultados sugieren que en *A. majus* la función normal de los genes C depende de la expresión de FIM, mientras que en *A. thaliana*, la función de los genes C es menos dependiente de UFO (Ingram, *et al.* 1995). Sin embargo, la presencia de tejido reproductivo en el segundo e incluso en el primer verticilo de mutantes *ufo* sugiere que puede haber expresión ectópica de genes de función C en algunas flores. UFO entonces podría jugar un papel como regulador negativo de genes de función C en el primer y segundo verticilo. Este fenómeno no ha sido observado en mutantes *fim*, quizá porque FIM no funciona como regulador negativo de genes de función C o porque la reducción en la transcripción del gen C en mutantes *fim* enmascara cualquier regulación negativa (Levin & Meyerowitz, 1995).

En general los fenotipos de mutantes de homólogos de *UFO* estudiados en eudicotiledóneas sugieren que todos participan en un proceso similar regulando la expresión de genes homólogos a *AP3*, ya que en todos ellos se ven afectados el desarrollo de pétalos y estambres (Ingram *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2007). En contraste, los estudios realizados del ortólogo de *UFO* en la monocotiledónea *O. sativa* (arroz): *ABER-*

RANT PANICLE ORGANIZATION1 (*APO1*; Ikeda-Kawakatsu *et al.*, 2012), sugieren que las funciones entre *APO1* y *UFO* han divergido considerablemente durante la evolución de cada uno de estos linajes (Ikeda, *et al.*, 2007). *APO1* y *UFO* tienen efectos opuestos en el destino del meristemo de inflorescencia ya que la transición de meristemo de inflorescencia a meristemo floral está suprimida por *APO1* pero promovida por *UFO* (Ikeda, K., *et al.*, 2007). Además el gen *APO1* parece diferir de *UFO*, y ser parcialmente congruente con *FIM*, respecto a los genes homeóticos que regula ya que el ortólogo en arroz regula positivamente a genes homeóticos de clase C (*OsMADS3*), pero no a genes de clase B (*SPW1*) (Ikeda, K., *et al.*, 2005).

Es posible que las diferencias en la regulación entre *UFO* y *APO1* sea consecuencia de la divergencia entre la región promotora y/o las proteínas blanco para degradación entre arroz y *Arabidopsis* (Ikeda *et al.* 2007). A su vez, *APO1* podría haber adquirido nuevas funciones a través del reclutamiento de diferentes proteínas (Ikeda *et al.*, 2007). Las implicaciones de estos estudios para otros linajes de monocotiledóneas son difíciles de extrapolar ya que la función de homólogos de *UFO* en otras monocotiledóneas además de *O. sativa* no ha sido investigada.

1.6.3 Patrones de expresión de ortólogos de *UFO*

El patrón de expresión de *UFO* en *A. thaliana* y el de *FIM* en *A. majus* está conservado (Ingram *et al.*, 1995). Aunque *UFO* tiene una expresión más temprana que *FIM*, ambos genes se expresan en el meristemo floral joven antes de la expresión de los genes de identidad de órganos. La expresión inicia en las células centrales del meristemo floral se reduce a un anillo correspondiente a los verticilos 2 y 3, dejando una región libre de expresión al centro del meristemo. En etapas posteriores, la expresión se restringe a pequeñas regiones en el sitio donde se unen los pétalos y los órganos adyacentes (Samach *et al.*, 1998). Además, mientras que la expresión de *UFO* es evidente únicamente en las uniones entre pétalos, en *FIM* se expresa en la unión sépalo-pétalo y pétalo-estambre (Ingram *et al.* 1995; Samach *et al.*, 1998).

El ortólogo de *UFO* en petunia; *DOUBLE TOP* (*DOT*; Souer *et al.*, 2008), se expresa inicialmente como una franja en la base del primer primordio de sépalos en el meristemo

floral joven (Long & Barton, 1998). En el estadio equivalente *FIM* y *UFO* se expresan al centro del meristemo floral (Simon *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997). Posteriormente *DOT* se expresa en un anillo que sobrelapa los verticilos 1 y 2 y después se mueve hacia la frontera de sépalos y pétalos para desaparecer en el momento en el que los carpelos se fusionan. En estadios posteriores la expresión de *DOT* y *ALF*, el ortólogo de *LFY* en petunia, no se sobrelapan más. Los ortólogos de *UFO* en el pimiento y en el tomate se expresa en un anillo de células que flanquean el desarrollo de pétalos y estambres (Taylor *et al.*, 2001). De lo anterior se puede concluir que los ortólogos de *UFO* en general se expresan en los verticilos en los que se desarrollan pétalos y estambres.

El patrón de expresión de *APO1* de arroz también difiere del de *UFO* en el desarrollo floral. El transcrito de *UFO* se localiza al centro del primordio floral cuando este comienza a estar claramente diferenciado del MI y luego desaparece del meristemo floral (Samach *et al.*, 1999). En contraste, la expresión de *APO1* en el meristemo floral es persistente incluso luego de la formación de lodículos y estambres (Ikeda *et al.* 2007).

1.7 Regulación de *AP3* por *LFY* y *UFO*

Como se mencionó en la sección 1.3, la identidad de los verticilos de pétalos y estambres está regulada por genes de función B. Y cuando *AP3* y *PI* se expresan ectópicamente, el dominio de expresión de los genes de función B se expande a los verticilos contiguos; flores *35S::AP3* tienen carpelos estaminoideos en el verticilo interno y flores con la construcción *35S::PI* tienen sépalos petaloides en el verticilo externo (Krizek & Meyerowitz, 1996). Además, la expresión constitutiva de ambos genes B restaura el desarrollo de pétalos y estambres en mutantes de *lfy* y *ufo* (Lee *et al.*, 1997).

La acción conjunta de *LFY* y *UFO* es necesaria para la activación de la expresión de *AP3* ya que la expresión ectópica de ambos factores de transcripción son capaces de activar a *AP3* y *PI* fuera de la flor (Parcy *et al.*, 1998).

Los estudios resumidos arriba de flores mutantes de *ufo* sugerían que esta molécula estaba relacionada con la regulación de *AP3* y *PI* ya que se observaba una reducción en la expresión de la proteína *AP3* y de la expresión de RNAm de *AP3* y *PI* en hibridaciones *in situ* en las

mutantes *ufo*, mientras que a nivel fenotípico se observaba la transformación homeótica de pétalos a sépalos y de estambres a carpelos, fenómeno que ocurre en mutantes *ap3* y *pi* (Levin & Meyerowitz, 1995). Adicionalmente, los fenotipos de mutantes *ufo* no muestran alteración dramática en genes de clase A o C, mientras que en las líneas de sobre-expresión de *35S::UFO* en *ap3-3* y *35S::UFO* en *pi-1*, únicamente se desarrollan sépalos y carpelos, lo que confirma que *UFO* actúa río arriba de los genes de función B (Levin & Meyerowitz, 1995).

Finalmente, la expresión ectópica de *UFO* en plantas que contienen el transgen *35S::UFO* produce un fenotipo dramático en el cual los carpelos se transforman en estambres y aparecen pétalos supernumerarios (Lee *et al.*, 1997). Este fenotipo de ganancia de función en las flores de *UFO* se debe a la expresión ectópica de *AP3* ya que dicho fenotipo se ve completamente abolido cuando la función de *AP3* está ausente (Lee *et al.*, 1997). Otra evidencia que sugería la regulación positiva de los genes B por *UFO* es que la expresión de *AP3* bajo el control del promotor constitutivo *35S* rescata los defectos de identidad de los órganos florales de mutantes *ufo* (Samach *et al.*, 1998).

Por otro lado, la alteración química o genética de la actividad del proteosoma compromete la activación de *AP3* vía *LFY*, indicando que la función de *UFO* es la de un cofactor transcripcional asociado a DNA implicado en la regulación de la expresión de genes homeóticos florales. Este mecanismo debe estar ampliamente conservado, ya que los homólogos de *UFO* y *LFY* se han encontrado en todas las especies de plantas estudiadas hasta el momento (Chae *et al.*, 2008). Se ha observado que *LFY* o proteínas asociadas a este factor de transcripción se ubiquitilan *in vivo* de manera parcialmente dependiente de *UFO* y que la regulación de la actividad transcripcional de *LFY* dependiente del complejo SCF^{UFO} es requerida para que *AP3* sea completamente inducido (Chae *et al.*, 2008).

Para regular *AP3*, *UFO* interactúa físicamente con *LFY* *in vitro* e *in vivo*, y esta interacción es necesaria para reclutar a *UFO* hacia el promotor de *AP3* (Chae *et al.*, 2008). La interacción entre *UFO* y *LFY* está conservada en angiospermas (Siriwardana & Lamb, 2012), como se ha demostrado en los ortólogos de *UFO* en petunia (DOT; Souer *et al.*,

2008) y arroz (APO1; Ikeda-Kawakatsu *et al.*, 2012) y sus respectivos ortólogos de LFY (ALF y RFL/APO2, respectivamente).

Por último, no se ha detectado interacción directa entre UFO y los reguladores negativos de AP3 como *SUPERMAN (SUP)*, *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS)* y el complejo transcripcional correpresor LEUNIG (LUG)/SEUSS (SEU) sugiriendo que no son blancos de la acción del complejo SCF^{UFO} (Chae *et al.*, 2008).

1.7.1 Patrones de expresión de UFO y AP3.

En flores tipo silvestre *AP3* se expresa a partir de que el primordio de sépalos se vuelve visible en el segundo y tercer verticilo, donde los primordios de pétalo y estambre emergen. La expresión de *AP3* se excluye del primordio de sépalo y del área central donde se desarrolla más tarde el primordio de carpelo. Cuando los sépalos crecen y cubren completamente el brote floral y el primordio de estambre se vuelve visible a partir del MF, el RNA de *AP3* se acumula a través del primordio de pétalo, estambre y en la base adaxial de sépalos.

UFO parece establecer un pre-patrón para la expresión de los genes B puesto que se expresa en etapas de desarrollo anteriores a la expresión de *AP3* y *PI* (Lohnman & Weigel, 2002; Ingram *et al.*, 1995). En contraste con *UFO*, *LFY* presenta un dominio de expresión más extenso que abarca a todo el primordio floral durante etapas tempranas del desarrollo (Levin & Meyerowitz, 1995).

La comparación de los patrones de expresión de *LFY*, *UFO* y *AP3* durante el desarrollo floral temprano junto con los análisis de pérdida y ganancia de función de cada gen sugieren que *LFY* juega un papel como activador global en el desarrollo floral mientras que *UFO* actúa como un regulador de región específica para el desarrollo de pétalos y estambres. De esta manera *LFY* se expresa en toda la flor joven y provee de especificidad floral, mientras que *UFO* se expresa en el meristemo apical del brote, y provee de especificidad regional a la expresión de la función B, dentro del meristemo floral (Lee *et al.*, 1997).

1.8 Bases genético-moleculares del desarrollo floral en *L. schismatica*: el desplazamiento de la expresión de *LsAP3* al centro del meristemo floral explica la formación de estambres centrales en esta especie.

En el contexto del modelo ABC, la hipótesis más sencilla que explica el desarrollo de estambres centrales es el desplazamiento del patrón de expresión de la función B, al centro del meristemo floral (Figura 1.8.1).

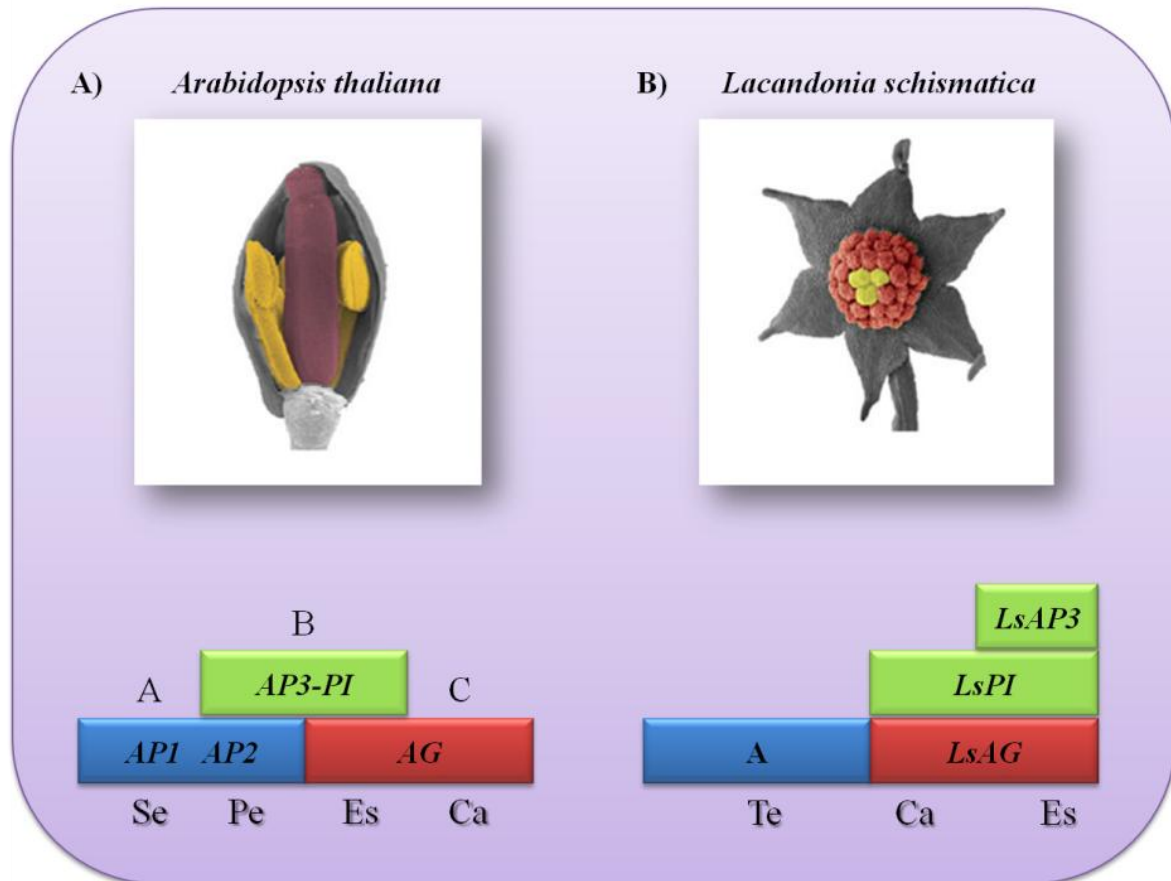


Figura 1.8.1. Genes homeóticos que participan en el desarrollo de los órganos florales: Modelo ABC descrito en *Arabidopsis thaliana* (ver figura 1.3.1 para explicación detallada). Y variación del modelo ABC (ACB) en *Lacandonia schismatica* que presenta la función B desplazada hacia el centro del meristemo floral, donde los estambres se desarrollan. Amarillo: estambres; rojo: carpelos. Modificado de Garay-Arroyo *et al.*, 2012.

Con el fin de comprobar esta hipótesis y de comprender la bases genético-moleculares que subyacen al desarrollo de estambres centrales en *L. schismatica*, Álvarez-Buylla y colaboradores (2010b), clonaron los ortólogos de AP3, PI y AG en *L. schismatica* (*LsAP3*, *LsPI* y *LsAG*) y llevaron a cabo experimentos de hibridaciones *in situ* con el fin de resolver sus patrones de expresión (Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b).

Los resultados de las hibridaciones *in situ* muestran que *LsAP3* se expresa en el centro del meristemo floral, desde etapas tempranas del desarrollo y hasta el momento en el que los estambres se desarrollan. En esta misma región se expresan *LsPI* y *LsAG*, por lo que la función B y C pueden interactuar y permitir el desarrollo de estambres centrales. Aunque *LsPI* y *AG* tienen un patrón de expresión más amplio ya que además de expresarse en los estambres, también se expresan en los carpelos (Figura 1.8.2).

Adicionalmente, experimentos de rescate de mutantes *ap3* y *pi* en *A. thaliana* transformados con *LsAP3* y *LsPI*, respectivamente, demostraron que si bien ambos genes estaban funcionalmente conservados para recuperar el desarrollo de estambres (*LsAP3*) y de estambres y pétalos (*LsPI*), los cambios observados en la secuencia de cada gen no eran suficientes para desplazar su dominio de expresión al centro del meristemo floral en *A. thaliana* (Figura 1.8.3), lo que sugería fuertemente que el desplazamiento en el dominio de expresión de *LsAP3* en *L. schismatica* debía estar mediado por cambios en la regulación en *cis* (cambios a nivel del promotor *LsAP3*) y/o en *trans* (cambios en la especificidad o dominio de expresión de factores de transactivación de *LsAP3*) de este gen (Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b).

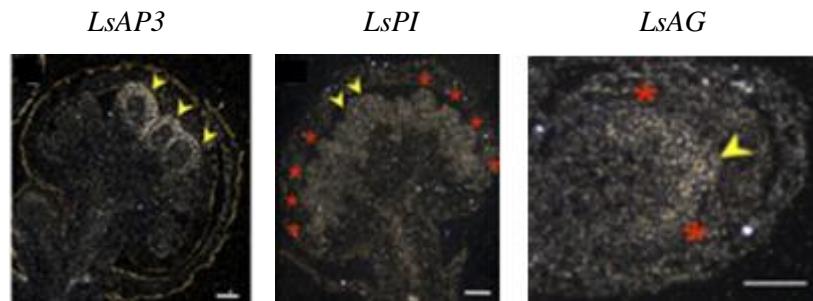


Figura 1.8.2. Secciones longitudinales de meristemos florales de *L. schismatica* en los que se muestra la hibridación de *LsAP3*, *LsPI* y *LsAG*. La expresión de *LsAP3* está restringida a la zona apical en etapas tempranas del desarrollo, donde los primordios de estambre se desarrollan para dar lugar a estambres maduros (flechas amarillas), mientras que *LsPI* y *LsAG* se expresan en un dominio más amplio durante las etapas tempranas del desarrollo floral y quedan restringidos a regiones donde el primordio de estambres (flechas amarillas) y carpelos (asteriscos rojos) se desarrollan. Modificado de Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b.



Figura 1.8.3. Líneas de complementación *35S::LsPI, pi-1*, y *35S::LsAP3, ap3-3*, respectivamente. *LsPI* tiene una función relativamente más conservada con respecto al ortólogo *PI* en *Arabidopsis*, ya que es capaz de rescatar tanto pétalos como estambres. Mientras que *LsAP3* solamente rescata estambres.

Para comenzar a discernir entre los posibles cambios regulatorios que impactan la expresión *in situ* de *LsAP3* es necesario investigar los cambios a nivel del promotor de *LsAP3* (regulación en *cis*). Fenómeno que ha sido inicialmente investigado por el trabajo de Piñeyro-Nelson (2013), en el cual para observar si el cambio en el patrón de expresión de *LsAP3* con respecto a *AP3* (de *Arabidopsis*) se debían a cambios en motivos reguladores en *cis*, se clonó un fragmento de 1 Kb del promotor del ortólogo de *AP3* de *L. schismatica* y se generaron líneas transgénicas de *A. thaliana* con las construcciones reporteras del promotor clonado de *L. schismatica* fusionado al gen reportero *GUS*. Éste análisis demostró que los cambios en *cis* presentes en el promotor de *LsAP3* no son suficientes por si solos para desplazar el patrón de expresión del gen que dirige al centro del meristemo floral.

De forma alternativa o complementaria, modificaciones en la secuencia primaria de aminoácidos de los reguladores principales de *LsAP3*, podrían tener efectos en el sitio donde se expresa (regulación en *trans*). En el caso de *L. schismatica*, la expresión atípica de *LsAP3* podría estar relacionada con la posibilidad de que el dominio de expresión del ortólogo de *UFO* permanezca expresándose al centro de la flor, como sucede en las etapas iniciales del desarrollo del primordio floral en *A. thaliana* (Garay-Arroyo *et al.* 2012), coincidiendo ahí con *LFY* y activando a *LsAP3*. A su vez, *LsUFO* tendría una expresión débil o una completa represión en el área que rodea a los estambres, la cual está parcialmente indeterminada dado que es la zona donde múltiples carpelos se desarrollan. Dicha hipótesis puede ayudar a explicar la indeterminación parcial del verticilo carpelar, mientras es congruente con el patrón de expresión de los genes B y C observados a través de las hibridaciones *in situ* en *L. schismatica* (Piñeyro-Nelson, *et al.*, 2010; Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b).

En esta tesis se presentan los primeros datos experimentales de *LsLFY* y *LsUFO* y se detallan modificaciones en su secuencia de aminoácidos.

2. HIPÓTESIS

El fenotipo heterotópico de la flor de *L. schismatica* es resultado del desplazamiento de la expresión de *AP3* al centro del meristemo floral. Ya que las proteínas UFO y LFY regulan la expresión inicial de *AP3* en *Arabidopsis*, los cambios en la secuencia primaria de aminoácidos de los ortólogos de UFO y LFY en *L. schismatica* podrían presentar sustituciones en su secuencia primaria de aminoácidos que posiblemente estén implicados en el desarrollo de estambres centrales en la flor de *L. schismatica*.

3. JUSTIFICACIÓN

La clonación y caracterización de los ortólogos de LFY y UFO de *L. schismatica* (*LsLFY* y *LsUFO*), así como su comparación a nivel de secuencia de aminoácidos respecto a homólogos de otras embriofitas; es fundamental para determinar regiones de conservación y variación de residuos en la secuencia primaria de estas proteínas, que puedan afectar sus actividades bioquímicas.

Esto permitirá explorar el posible efecto que cambios a nivel de secuencia de aminoácidos de LFY y UFO, puedan tener en el establecimiento del pre patrón del dominio de expresión de *LsAP3* al centro del meristemo floral, cuya expresión novedosa es la base molecular que explica el desarrollo de estambres centrales en *L. schismatica*, una característica singular dentro de las angiospermas.

La clonación de *LsLFY* y *LsUFO*, permitirá obtener ribosondas específicas para evaluar sus patrones de expresión espacio-temporales mediante hibridaciones *in situ*. Así como obtener insumos para experimentos posteriores.

4. OBJETIVOS

Principal

- Clonar y caracterizar molecularmente a los homólogos de UNUSUAL FLORAL ORGANS y LEAFY en *Lacandonia schismatica* (LsUFO y LsLFY), mediante un estudio comparativo de las modificaciones a nivel de secuencia de aminoácidos

Particulares

- Diseñar oligonucleótidos específicos y estandarizar un protocolo de PCR, para amplificar y clonar las secuencias de *LsUFO* y *LsLFY*.
- Comparar secuencias de aminoácidos de LsLFY y LsUFO con homólogos en otras embriofitas para caracterizar dominios conservados y sustituciones de aminoácidos en sitios importantes para la estructura y/o función de estas proteínas.
- Determinar relaciones filogenéticas para LsUFO y LsLFY.
- Diseñar ribosondas para investigar el patrón de expresión espacio temporal de *LsUFO* y *LsLFY* en el meristemo floral de *L. schismatica*.

5. MÉTODOS

5.1 Amplificación de *LsUFO* y *LsLFY* por PCR

5.1.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Se molieron manualmente inflorescencias de *Lacandonia schismatica*, utilizando nitrógeno líquido en mortero previamente esterilizado, tratado con solución descontaminadora de RNAasa y previamente enfriado a -70°C con nitrógeno líquido.

A partir del polvo obtenido se extrajo RNA del molido de *L. schismatica* con ayuda del sistema RNeasy® mini kit de Qiagen (No. Cat.74904) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se separó por electroforesis para comprobar la eficiencia de la extracción y que no estuviera degradado.

Utilizando el oligonucleótido dT y RNA de *L. schismatica* se llevó a cabo una retrotranscripción a cDNA utilizando el sistema SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Invitrogen (No. Cat.18064-014) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.1.2 Diseño de oligonucleótidos y amplificación por PCR de *LsUFO* y *LsLFY*

El diseño de oligonucleótidos, en el caso de *LsUFO* se realizó con base en la secuencia del transcriptoma eligiendo el sitio más externo hacia el 5' y más interno hacia el 3'. En el caso de *LsLFY* como sólo se tenían secuencias parciales a partir del transcriptoma, se realizó un alineamiento de éstos fragmentos con secuencias de nucleótidos de otros homólogos de LFY de monocotiledóneas y se determinaron sitios conservados sobre los que se diseñaron los oligonucleótidos y/o se diseñaron sobre las secuencias parciales obtenidas del transcriptoma.

Con ayuda del programa Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (Kibbe, 2007) se determinó que no existiera formación de estructuras secundarias ni auto complementariedad entre los oligonucleótidos sentido y antisentido de cada secuencia. La amplificación de las secuencias de interés mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador ICYCLER (BIO-RAD) con los oligonucleótidos diseñados (Tabla 5.1.2.1).

La Tm de los oligonucleótidos se calculó utilizando la regla de Wallace:

$$Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$$

En donde A (adenina), G (guanina), C (citosina), y T (timina) corresponden al número de cada nucleótido presentes.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')	Fragmento amplificado	Orientación	Tamaño del producto (pb)	Tm (°C)	Longitud
UFOcompleto 2	GTAACCTCTCTGGCGTTGCCA	<i>LsUFO</i>	Sentido	1256	56.3	21
UFOREV	CCTCTGAATGACATCAGAAATC		Antisentido		51.1	22
UFOmedioFOR	GAACGAGTGGTCGAAAATCAAGC	Fragmento interno de <i>LsUFO</i>	Sentido	535	55.3	23
UFOREV	CCTCTGAATGACATCAGAAATC		Antisentido		51.1	22
KSL-LFYR1-Ls	TTTTCGAGGGGTACGGTGT	<i>LsLFY</i>	Sentido	894	51.1	19
v KSLLFYR1v-Ls	TGG GAA CGT ACC ACA CGG CGA		Antisentido		58.3	21
KSL-LFYF2-Ls	GGAGCACCCGTTTCATCGTGA	Fragmento interno de <i>LsLFY</i>	Sentido	428	55.9	20
v KSLLFYR1v-Ls	TGG GAA CGT ACC ACA CGG CGA		Antisentido		58.3	21
KSL-LFYF2-Ls	GGAGCACCCGTTTCATCGTGA	Fragmento interno de <i>TbLFY</i>	Sentido	400	55.9	20
v KSLLFYR1v-Ls	TGG GAA CGT ACC ACA CGG CGA		Antisentido		58.3	21

Tabla 5.1.2.1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de *LsUFO*, *LsLFY* y *TbLFY1*

Se incluyó un control positivo (amplificación de un fragmento del gen para la ATPasa) y un control negativo que consiste en un blanco (sin DNA) por juego de oligonucleótidos. La temperatura de alineamiento utilizada, se determinó inicialmente disminuyendo 5°C a la Tm más baja entre el par de oligonucleótidos. El programa de PCR adecuado para la amplificación de cada uno de los fragmentos se estandarizó en varios ensayos, haciendo gradientes de temperatura con diferentes Tm y modificando las proporciones de los reactivos utilizados en el PCR (Tablas 5.1.2.2 y 5.1.2.3).

Reactivo	UFO	LFY
DNA	2	1
Buffer para PCR10X	2	2

dNTP's 2.5 mM c/u	1	0.4
MgCl ₂ 50 mM	0.6	1
Oligo sentido 10 μM	1	0.4
Oligo antisentido 10 μM	1	0.4
Taq polimerasa recombinante	0.1	0.2
H ₂ O	12.3	14.6
Volumen final	20	20

Tabla 5.1.2.2. Proporciones de reactivos utilizados para la amplificación de las secuencias de interés

Programa			Fragmento amplificado				
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	LsUFO	LsUFO (Fragmento interno)	LsLFY	LsLFY (Fragmento interno)	TbLFY (Fragmento interno)
1X	94	3					
35X	94	0.30					
	Variable:		57.6	53.2	58	57.6	57.6
	72	Variable:	2	2	1.3	2	2
1X	72	10					
1X	4	∞					

Tabla 5.1.2.3. Programas utilizados en el termociclador ICYCLER (BIO-RAD) para amplificar los diferentes fragmentos de LFY y UFO de *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*

La amplificación de los fragmentos de interés fue corroborada con la amplificación de fragmentos internos (PCR anidado). El tamaño de los fragmentos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y agregando un marcador de peso molecular (GeneRuler™ Express DNA Ladder, ready-to-use, 100-5000 bp).

En los casos en los que la amplificación no era suficientemente específica (por ejemplo: se observaba un barrido o bandas menores), el producto fue precipitado con 2.5 μL de glucógeno y una solución de etanol 100% y acetato de amonio 7.5 M en una relación (6:1). Finalmente se comprobó la recuperación exitosa de DNA, a partir de la precipitación, al correr una alícuota de 1μL en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

Durante las pruebas de especificidad de los oligonucleótidos para amplificar *LsLFY*, se extrajo DNA de *T. brevistylis* y *L. schismatica*, con un protocolo de CIMMYT modificado (CIMMYT, 2006) (Apéndice 2), con lo que adicionalmente fue posible amplificar la secuencia genómica de *LsUFO*, la secuencia parcial de *LsLFY* y la secuencia parcial de *TbLFY1*.

5.1.3 Clonación de *LsUFO*, *LsLFY* y *TbLFY*

Después de la obtención del fragmento de interés por PCR, éste se introdujo al vector TOPO® (Invitrogen) de 2.8 Kb (Apéndice 3) con ayuda del kit PCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® (Part. No. 450642) el cual no requiere ligación previa. La clonación de cada uno de los fragmentos se realizó mediante la transformación independiente de células termocompetentes, de la cepa de *E. coli* DH5 α , que se dejaron crecer 12h por 37 °C en medio de cultivo Luria Bertani (LB) y espectinomicina (100 μ g/mL) como marcador de selección. Posteriormente se muestrearon 10 colonias y se transfirieron a 5 mL de medio líquido LB con antibiótico de selección. Se dejaron crecer por 12 h en agitación continua a 37 °C y se realizó un miniprep con el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen Cat. No. 27106, para recuperar el inserto contenido en el plásmido. Se liberó el fragmento con digestión del plásmido con la enzima EcoRI Fast Digest® de FERMENTAS con oligonucleótidos y/o del vector mediante PCR con oligonucleótidos M13 sentido y M13 antisentido y se verifico que en estas clonas estuvieran insertadas las secuencias de interés mediante la separación de 10 μ L de producto, por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Las muestras se enviaron a secuenciar por ambos extremos, con los oligonucleótidos M13 sentido y M13 antisentido a la Unidad de Oligonucleótidos y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM. Para corroborar los resultados, las secuencias obtenidas experimentalmente se alinearon con la secuencia de *LsUFO* y las secuencias parciales de *LsLFY* obtenidas a partir de la secuenciación masiva del transcriptoma de *L. schismatica*.

En el caso de *LsLFY* y *TbLFY*, los resultados de las secuenciaciones se alinearon con la información parcial del transcriptoma y con ortólogos de *LFY* de otras monocotiledóneas.

A las colonias que presentaron el inserto, se les agregó glicerol y se guardaron a -70 °C. La viabilidad de éstas colonias se comprobó dos semanas después, al observarse crecimiento

tras llevar a cabo un cultivo de las clonas seleccionadas en medio LB sólido con espectinomicina (100 µg/mL).

5.2 Análisis de las secuencias: *LsUFO* y *LsLFY*

Con los datos obtenidos de forma experimental y de las secuencias de nucleótidos curadas a partir del transcriptoma tanto de *Lacandonia schismatica* como de *Triuris brevistylis*, se generaron secuencias consenso a nivel de nucleótidos (Apéndice 4). Y utilizando la secuencia de nucleótidos de los ortólogos de LFY y UFO en *O. sativa*, *RFL* y *APO1* respectivamente, se determinó el codón de inicio y de termino para *LsLFY*; Figura 6.1.1 y para *LsUFO*; Figura 6.1.2.

Para caracterizar las secuencias de nucleótidos se identificaron los codones de inicio y de término y mediante la comparación de la secuencia amplificada a partir de gDNA, con las secuencias del transcriptoma se determinaron los intrones. Las secuencias se tradujeron a aminoácidos, se encontró el marco de lectura correcto con la ayuda del sitio del sitio <http://web.expasy.org/translate/> y se corroboró el marco de lectura correcto con el uso del programa blastp del NCBI, disponible en el sitio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Para el análisis de posición de intrones, las secuencias se obtuvieron a partir de los genomas que se encuentran en el NCBI, con el programa nblast en la opción NCBI Genomes (chromosome) y buscando la posición de los sitios que alineaban con la secuencia de interés en el genoma de *O. sativa* y *A. thaliana*. Las secuencias se alinearon con ayuda del programa Clustal W (Larkin, *et al.*, 2007). Y se realizó un análisis para ver si existía o no diferencia estructural a nivel de secuencias genómicas ente secuencias de los ortólogos de *L. schismatica* y *Arabidopsis* y arroz de LFY y UFO.

Para realizar el análisis comparativo de los ortólogos de *LsUFO*, se utilizaron las secuencias de aminoácidos generadas en este trabajo. Se buscaron secuencias de aminoácidos homólogas a *LsUFO*, *TbUFO*, *UFO* de *Arabidopsis* (Ingram *et al.*, 1995) y *APO1* de *O. sativa* (Ikeda *et al.*, 2007), con ayuda del programa BLAST.

Las secuencias de homólogos de *LsLFY* y *LsUFO* (Ver número de acceso del NCBI en apéndice 5 y 6, respectivamente) se alinearon con el programa Multiple Sequence

Comparison by Log-Expectation MUSCLE versión 3.8.31 (Edgar, 2004), cada alineamiento se editó a mano y se encontraron los porcentajes de identidad compartidos entre las secuencias homólogas a *LsUFO* y *LsLFY* con el programa Geneious v6.0 (<http://www.geneious.com/>).

En las secuencias de aminoácidos de ortólogos de *UFO*, se encontraron motivos conservados con ayuda de la base de datos de familias de proteínas, Pfam 26.0 (Finn *et al.*, 2010) <http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence> así como en la base de datos de dominios de proteínas PROSITE (Sigrist *et al.*, 2012) <http://prosite.expasy.org> y/o con ayuda de bibliografía.

Para los análisis filogenéticos, se utilizó el programa ProtTest 2.4 server (Abascal *et al.*, 2005) que permite elegir el modelo de reemplazamiento de aminoácidos que mejor se ajusta a las secuencias analizadas. Los árboles filogenéticos se realizaron por el método de máxima verosimilitud con ayuda del programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 5.05) (Tamura, *et al.*, 2011).

5.3 Diseño de sondas de *LsUFO* y *LsLFY* para hibridación *in situ*

Con el fin de diseñar una sonda específica para *LsUFO*, se alineó esta secuencia con los cuatro *LsUFO-like* encontrados en el transcriptoma y se buscó un sitio poco conservado entre ellas para hacer una sonda específica de *LsUFO*. En particular, fue necesario elegir una región de la secuencia que no contuviera la caja F, para evitar falsos positivos en la hibridación *in situ*, ya que esta región está representada en otras proteínas de la misma familia.

Para *LsLFY* se diseñó una sonda y dado que se logró amplificar la secuencia parcial de *TbLFY1*, también se diseñó la sonda de este gen para determinar su patrón de expresión. Con esta finalidad se alinearon las secuencias de *RFL*, *LsLFY*, *TbLFY1* y *TbLFY2*, y se buscó un sitio conservado, pero que en el caso de los dos ortólogos de *LFY* de *T. brevistylis* fuera lo suficientemente variable para evitar hibridaciones cruzadas entre sí. La especificidad de las sondas se comprobó con ayuda del programa BLAST.

Finalmente se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar las sondas (de *LsUFO*, *LsLFY*

y TbLFY), a partir de los fragmentos clonados en vector, con el programa Primer-BLAST (Ye, 2012), disponible en el sitio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Las sondas diseñadas y minipreps de los vectores se enviaron al Departamento de Biología de Plantas y Genética Forestal en el Centro de Biología Evolutiva de la Universidad de Uppsala, Suecia, donde se están realizando las hibridaciones *in situ* en colaboración con los doctores Peter Engström y Marie Englund.

A continuación se muestra un esquema que resume los métodos anteriormente descritos:

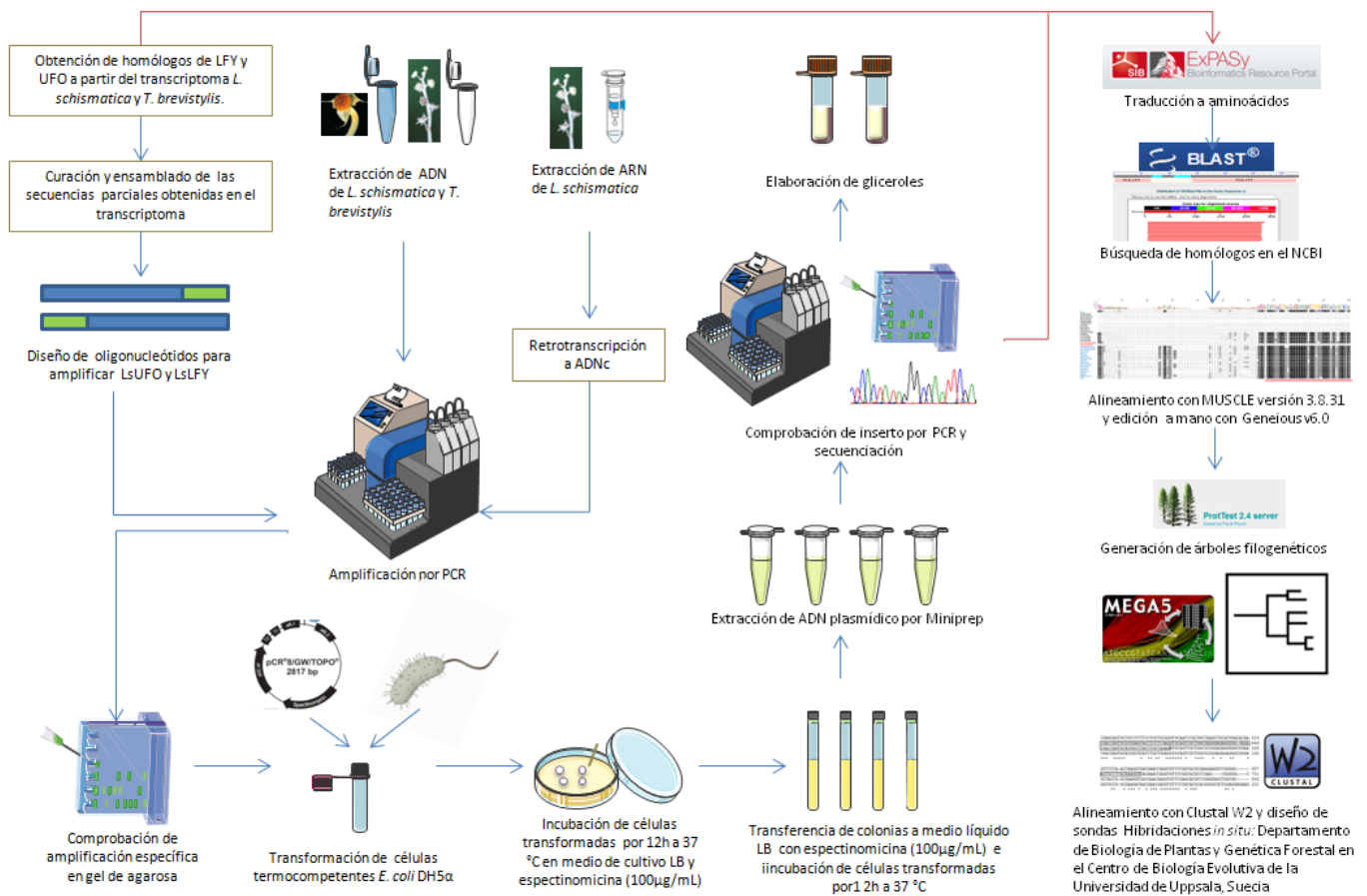


Figura 5.1 Resumen del método seguido en este trabajo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de secuencias homólogas de *LFY* y *UFO* en *L. schismatica* y *T. brevistylis*

Se identificaron los homólogos de *LFY* y *UFO* de *Arabidopsis* en *L. schismatica* y en *T. brevistylis*, a partir de la base de datos del transcriptoma de cada una de las especies. Las secuencias parciales obtenidas se curaron y ensamblaron. Posteriormente se amplificaron estas secuencias por PCR con oligonucleótidos específicos. Y a partir de la información obtenida tanto de los transcriptomas, de *L. schismatica* y de *T. brevistylis*, como de las secuencias amplificadas por PCR en estas especies, se identificó un ortólogo de *LFY* para *L. schismatica* (*LsLFY*), el cual se amplificó parcialmente tanto a partir de cDNA como de gDNA. A nivel estructural, la secuencia genómica parcial amplificada de *LsLFY* comprende un intrón de 86 nucleótidos y dos exones (Figura 6.2.1). En contraste, en *T. brevistylis* se identificaron dos ortólogos *TbLFY1* y *TbLFY2*, cuyas secuencias parciales se encontraron tanto en el transcriptoma de flores masculinas como femeninas. Adicionalmente durante la estandarización del protocolo de PCR, *TbLFY1* se amplificó parcialmente por lo que fue posible diseñar una sonda para hibridación *in situ*, para este ortólogo.

En el caso de los homólogos de *UFO*, a partir de la comparación de los datos experimentales con los del transcriptoma de *L. schismatica* y *T. brevistylis* se identificó un ortólogo de *UFO* para *L. schismatica* (*LsUFO*) y una secuencia parcial correspondiente al ortólogo de *T. brevistylis* (*TbUFO*). A nivel estructural, la secuencia genómica de *LsUFO* carece de intrones (Figura 6.3.1).

En la tabla 6.1.1 se indican las secuencias consenso obtenidas con el método anteriormente descrito, que pueden corresponder a secuencias parciales o completas. En negro se señalan las secuencias cuya amplificación era uno de los objetivos de la presente tesis y en gris aquellas secuencias cuya información se obtuvo de la información obtenida del transcriptoma o que se amplificaron durante experimentos de estandarización del protocolo de PCR.

Secuencia		<i>Lacandonia schismatica</i>	<i>Triuris brevistylis</i>	
			<i>TbLFY1</i>	<i>TbLFY2</i>
LFY	Genómica (DNAg)	√ (parcial)*	√ (parcial)	√ (parcial)
	cDNA	√ (parcial)*	√ (parcial)	√ (parcial)
	Aminoácidos	√ (parcial)*	√ (parcial)*	√ (parcial)
UFO	Genómica (DNAg)	√*	X √ (parcial) √ (parcial)	
	cDNA	√*		
	Aminoácidos	√*		

Tabla 6.1.1 Secuencias consenso obtenidas a partir de datos experimentales y del transcriptoma de *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*. En negro se indican aquellas secuencias que eran el objetivo de este trabajo y con un asterisco se señalan aquellas secuencias para las que se tienen datos experimentales. En el caso de los ortólogos de LFY para *T. brevistylis*, únicamente se cuentan con datos experimentales para la secuencia *TbLFY1*.

Como se menciona en el apartado de métodos, se generaron secuencias consenso con la información obtenida experimentalmente y a partir del transcriptoma para cada una de las secuencias descritas en la tabla 6.1.1. Se determinó el codón de inicio y de paro para cada una de las secuencias y se tradujo a secuencia de aminoácidos (Apéndice 4).

Para la secuencia de *LsUFO* (Figura 6.1.1) y la secuencia parcial de *LsLFY* (Figura 6.1.2), se muestran los codones de inicio y de paro, los sitios donde hibridan los oligonucleótidos para su amplificación, las regiones para las que se utilizó la información experimental o del transcriptoma y los sitios donde se diseñaron las sondas para hibridación *in situ* (Ver sección 6.2.5 y 6.3.4). Todas las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos obtenidas en el presente trabajo para de homólogos de *L. schismatica* y *T. brevistylis*, se detallan en el apéndice 4

LEAFY de *Lacandonia schismatica* (*LsLFY*)

<i>Oryza_RFL</i>	ATGGATCCCAACGATGCCTTCTCGGCCGCGCACCCGTTCCGGTGGGACCT	50
<i>Lacandonia_LFY</i>	-----	
<i>Oryza_RFL</i>	CGGCCCGCCGGCGCCGGCGCCCGTGCCACCACCGCCGCCACCACCGCCGC	100
<i>Lacandonia_LFY</i>	-----CGGCCGC	
<i>Oryza_RFL</i>	CGCCGCCGCCGGCTAACGTGCCAGGGAGCTGGAGGAGCTGGTGGCAGGG	150
<i>Lacandonia_LFY</i>	CCACGCAGCAGGCAGCCGCGGC ---GGAGCTGGAGGGCG <u>TTTTTCGAGGGG</u>	
<i>Oryza_RFL</i>	TACGGCGTGCGGATGTCGACGGTGGCGCGGATCTCGGAGCTCGGGTTCAC	200
<i>Lacandonia_LFY</i>	<u>TACGGTGTGCGGGCAGCGACGTCTCGGGTGGCGGCGCTTGGTTTCAC</u>	
<i>Oryza_RFL</i>	GGCGAGCACGCTCCTGGCCATGACGGAGCGCGAGCTCGACGACATGATGG	250
<i>Lacandonia_LFY</i>	GGCGTCGACGCTGGCGGTGATGACGGACGCCGAGCTGGACGACATGGCCA	
<i>Oryza_RFL</i>	CCGCGCTCGCCGGGCTGTTCCGCTGGGACCTGCTCCTCGGCAGCGGTTTC	300
<i>Lacandonia_LFY</i>	CCCTCCTCTCCCACCAATTTCCGGTGGGATATCCTCGTAGGTGAGCGGTAC	

<i>Oryza_RFL</i>	GGCCTCCGCGCCGCGCTGCGAGCCGAGCGCGGCCGCTGATGTGCTCGG	350
<i>Lacandonia_LFY</i>	GGCATTCGCGCCGCCCTCCGTTCCCTCCGTGGACGCCTCCTCCCTCCGCC	
<i>Oryza_RFL</i>	CGGCCGCCACCATGGGCACCAGTCCGGGAGCACCGTGGACGGCGCCTCCC	400
<i>Lacandonia_LFY</i>	TGCAGGTGAGAGTGAGAGTGGGATCGTCA -----	
<i>Oryza_RFL</i>	AGGAAAGTGTGTCCGACGAGCATGACATGGCGGGGAGCGGCGGCATGGGC	450
<i>Lacandonia_LFY</i>	----- AGCAGCCGCCGCCCGCCGCCGAGCCTGGGC	
<i>Oryza_RFL</i>	GACGACGACAACGGCAGGAGGATGGTGACCGGCAAGAAGCAGGCGAAGAA	500
<i>Lacandonia_LFY</i>	GGCCAGAA ----- GGCGGCGAAGAAACCCAAGAAAGCGGCTTCCCA	
<i>Oryza_RFL</i>	GGGATCCGCGGCGAGGAAGGGCAAGAAGGCGAGGAGGAAGAAGGTGGACG	550
<i>Lacandonia_LFY</i>	CGCTTCGGAATCAGACAGCGGCGAGTCGGACGGGAAGGCGTCGGCATCGG	
<i>Oryza_RFL</i>	ACCTAAGGCTGGACATGCAGGAGGACGAGATGGACTGCTGCGACGAGGAC	600
<i>Lacandonia_LFY</i>	CGTCGGCACGGAAGAAACCCAAGAAAGTGGTTTCCCACGCTCCAGAGTCG	
<i>Oryza_RFL</i>	GGCGGCGGCGGGTCCGAGTCGACGGAGTCGTCGGCCGGCGGCGGCGGG	650
<i>Lacandonia_LFY</i>	GATGGCGTCGAGTCGGATGGGCGGGCGTCTGCGGCGATAGT -----	
<i>Oryza_RFL</i>	GGAGCGGCAGAGGGAGCATCCTTTTCGTGGTGACGGAGCCCGGCGAGGTGG	700
<i>Lacandonia_LFY</i>	GGCAAGGCAGAG <u>GGAGCACCCGTTTCATCGTGACGGAGCCCGGGGAGGTGG</u>	
<i>Oryza_RFL</i>	CGAGGGCCAAGAAGAACGGGCTGGACTACCTGTTCCATCTGTACGAGCAG	750
<i>Lacandonia_LFY</i>	CCAGGTCTGAAGAAGAACGGGCTGGACTACCTGTTCCACCTCTACGACCAG	
<i>Oryza_RFL</i>	TGCCGCCTCTTCCCTGCTGCAGGTGCAATCCATGGCTAAGCTGCATGGACA	800
<i>Lacandonia_LFY</i>	TGCGTGGAGTACCTCCTCGAGGTGCAGTCGCTGGCGAGGGAGAGGGGGGA	
<i>Oryza_RFL</i>	CAAGTCCCCAACCAAGGTGACGAACCAGGTGTTCCGGTACGCGAAGAAGG	850
<i>Lacandonia_LFY</i>	<u>GAAGTGCCCCACAAAGGTC</u> ACAAACCAGGTGTTCCGGCACGCCGAGCGG	
<i>Oryza_RFL</i>	TGCGGGCGAGCTACATCAACAAGCCCAAGATGCGGCACTACGTGCACCTGC	900
<i>Lacandonia_LFY</i>	GGGCGGCGC --- AAATCAACAAGCCCAAGATGCGCCACTACGTCCACTGC	
<i>Oryza_RFL</i>	TACGCGCTGCACTGCCTGGACGAGGAGGCGTCGGACGCGCTGCGGCGCGC	950
<i>Lacandonia_LFY</i>	TACGCCCTCCACTGCGTCGACCCCTCCGCCTCCAACGCTCTCCGCCGGGA	
<i>Oryza_RFL</i>	CTACAAGGCCCGCGGCGAGAACGTGGGGGCGTGGAGGCAGGCCTGCTACG	1000
<i>Lacandonia_LFY</i>	GTTCAAGTCCCGGGGACCGGCGTCGGCGCGTGGCGGGAAGCGTGTTACC	
<i>Oryza_RFL</i>	CGCCGCTCGTCGACATCTCCGC---GCGCCACGGATTCGACATCGACGCC	1050
<i>Lacandonia_LFY</i>	AGCCCCTGGTCTCCATCGCCGCCTCGCGCCATGGCTGGGACGCCGACGCC	
<i>Oryza_RFL</i>	GTCTTCGCCGCGCACCCGCGCCTCGCCATCTGGTACGTGCCACCAGACT	1100
<i>Lacandonia_LFY</i>	CTCTTCGCCTCCCACCTCGCG <u>TCGCCGTGTGGTACGTTCCCA</u> AAAAAGCT	
<i>Oryza_RFL</i>	CCGCCAGCTCTGCCACCAGGCGCGGAGCAGCCACGCCGCCGCCGCCGCCG	1150
<i>Lacandonia_LFY</i>	CCGGGAGCTATGCTACCTCGAACG---CAGCCGCGCCCATGTGCCCGCAG	
<i>Oryza_RFL</i>	CGCTCCCGCCGCCCT-----	1200
<i>Lacandonia_LFY</i>	GGATACCGCCGGCCGTTGGTTGCGCCGACAGCCTCCCCACATGTCCACC	
<i>Oryza_RFL</i>	---- TGTTCTAA -----	1248
<i>Lacandonia_LFY</i>	ATCATGTACTAA GCTGAGATGAGAATGAGATCGAGTGGTTCGAGGTCCC	

Figura 6.1.1 Alineamiento de la secuencia del transcrito de *RFL* de *O. sativa* y de *LsLFY*. En negritas se señala el codón de inicio (ATG) y de paro (TAA) de la traducción. La sección amplificada por PCR en el presente trabajo se señala con letras negras y queda flanqueada por el sitio donde hibridan los oligonucleótidos sentido y antisentido que están subrayados y resaltados en negritas. Las secciones que fueron generadas a partir de datos del transcriptoma y de las cuales no se tienen de forma experimental se indican en gris. La sección donde se diseñó la sonda para trabajos de hibridación *in situ* se resalta en azul y está flanqueada por los oligonucleótidos diseñados para la misma, marcados en color verde.

UNUSUAL FLORAL ORGANS de Lacandonia schismatica (LsUFO)

AGAAAGTTCACCCATGGAAGGCTTTTTTTTTTTCCTT	GTAACCTCTGGCGT	50
<u>TGCCA</u> TGGATCCCCGCATATGGCGTCGCCTTCCACAACCTCTCATCGACC		100
GCATCCTCGCTTTCTTACCCCCAGCAGCTTTCTTCCGTGCCCGCTCCGTA		150
TGTCGTAGGTGGTATGCCCTCTTGTCTCCACCTACTTCCTCGACCTCCA		200
CGATCATCTTTCCCTCGTGTGCCCTTTTTTCTCTTCTTCCCTGCTCCCCT		250
CCTTCCCATCCTCATTACACTCCACCTCCACCACAACGCGGTCTCCTG		300
GACACCAAATCAACACATGGCATCCAATCCCTTTTGACCACTTCATACC		350
TGACGGATTCACTCCGGCCGCTCCACGGCGGTAGTCTGTTGGATTT		400
CAGATGCCGCTGGCTCCAAGACCTTCTCCTATCCAACCCCTTTCAAAG		450
CTTGTGCTCACCTCCCCCATCCCGTTGTGCACGTTTGTGGCCTACTGT		500
TGGCCTTGCCATCGGCCACTCATCCATTACAGCCATCATTGCAGGGGACG		550
ACATGATAACACCATTTCTCTGTAATGAATATATCATCTGAACGCTTACA		600
ACAGATGTATCTAGTGGCTTCTGCTCTCCTTGGACAATGGTAAGTGTCT		650
TCCTCGACTCTCCGATATGAAAACAGGACGCATGTTATTCGCAGATGAAA		700
GGTTCTACTGTATGAGCTTCGGCCATTTCGCTGTCTTGCCTACAACCC		750
GACGA	<u>GAACGAGTGGTCGAAAATCAAGCCACCGATGCAGAAATACTTGCG</u>	800
	<u>GTCCCGAGCTTGGTGGTGTGCTGGGGTAGGATAATGTTGGT</u>	850
	<u>TGGAGAAAGCTAAG</u> CTCAGCATTCCACAGAGTGTGCGAGTCTGGGAGTTG	900
CGAGGCTGCCGGAGGACTTGGGAAGAAATTGGTAGGATGCCAATGGACAT		950
CTATCGTCAGTTTGCCGAGGCGGAGAGGGGAAGGGGTTTCGAGTGCAC TG		1000
GAAACGGTGTGCTCATAGCCGTTACAATGTGCGGTTCTGTGGACGTTTTG		1050
CTTTTTGACTTGGAGAGGAAGCAGTGGAGATGGGTGCCACGGTGCCATT		1100
AACCGCCCACGGAGGGGAAATGTGGCTCAGAGGGATGTCCTACGAGCCAC		1150
AGCTTGGGACGCCGCTTATTGGGAGCTTTTTGTTCCACGGCATCTGTCATT		1200
GCAAATTTGTAAATTTAATTATTGCAAGTGTTTTTGGTCTACTAAGGCA		1250
AAAAATTTAAATACCCTA	<u>GGAGACTTACTGTAGTCTTTAG</u> TTCCCTCAACT	1300
T		1301

Figura 6.1.2. Alineamiento de la secuencia del transcrito de *LsUFO* en la que se señala en rojo el codón de inicio (ATG) y de paro (TAA) de la traducción. La sección amplificada por PCR en el presente trabajo se señala con letras negras y queda flanqueada por el sitio donde hibridan los oligonucleótidos sentido y antisentido, marcados en rosa. La sección donde se diseñó la sonda para trabajos de hibridación *in situ* está indicada en azul y está flanqueada por los oligonucleótidos diseñados para la misma, marcados en color verde. Las secciones que fueron generadas a partir de datos del transcriptoma y no se tienen de forma experimental están señaladas en gris.

6.2 Genes reguladores de LsAP3: LEAFY (LsLFY)

De las secuencias obtenidas en este trabajo, se identificó un ortólogo de *LFY* para *L. schismatica* (*LsLFY*), lo que es consistente con la evidencia para ortólogos de este gen reportados en la mayoría de angiospermas tanto extintas como contemporáneas, donde *LFY* es un gen de copia única (Maizel *et al.*, 2005). A nivel estructural, la secuencia genómica parcial amplificada de *LsLFY* comprende al menos un intrón y dos exones (Figura 6.2.1), que corresponde a la región amplificada por PCR. Es posible que en homología a la estructura genómica que presentan los homólogos de *LFY* de *Arabidopsis* y *RFL* de arroz, *LsLFY*

presente un segundo intrón al interior de la región correspondiente al dominio C-terminal.

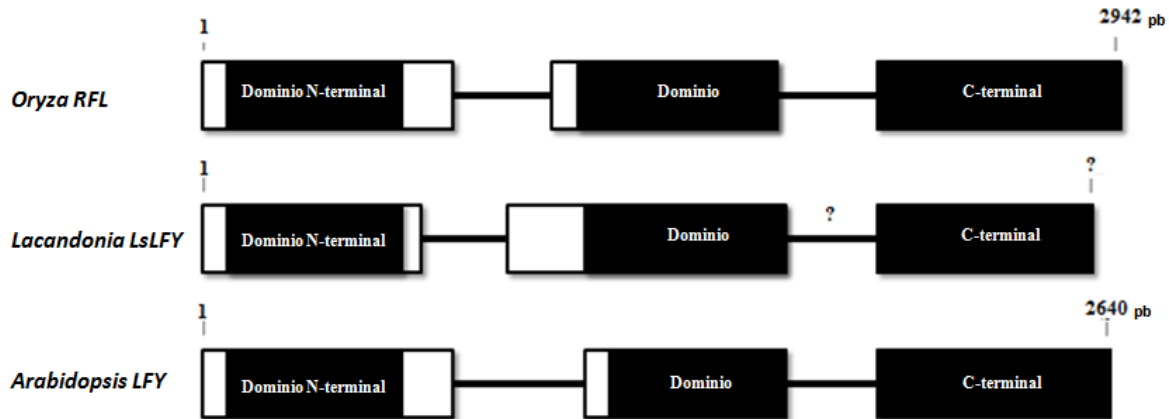


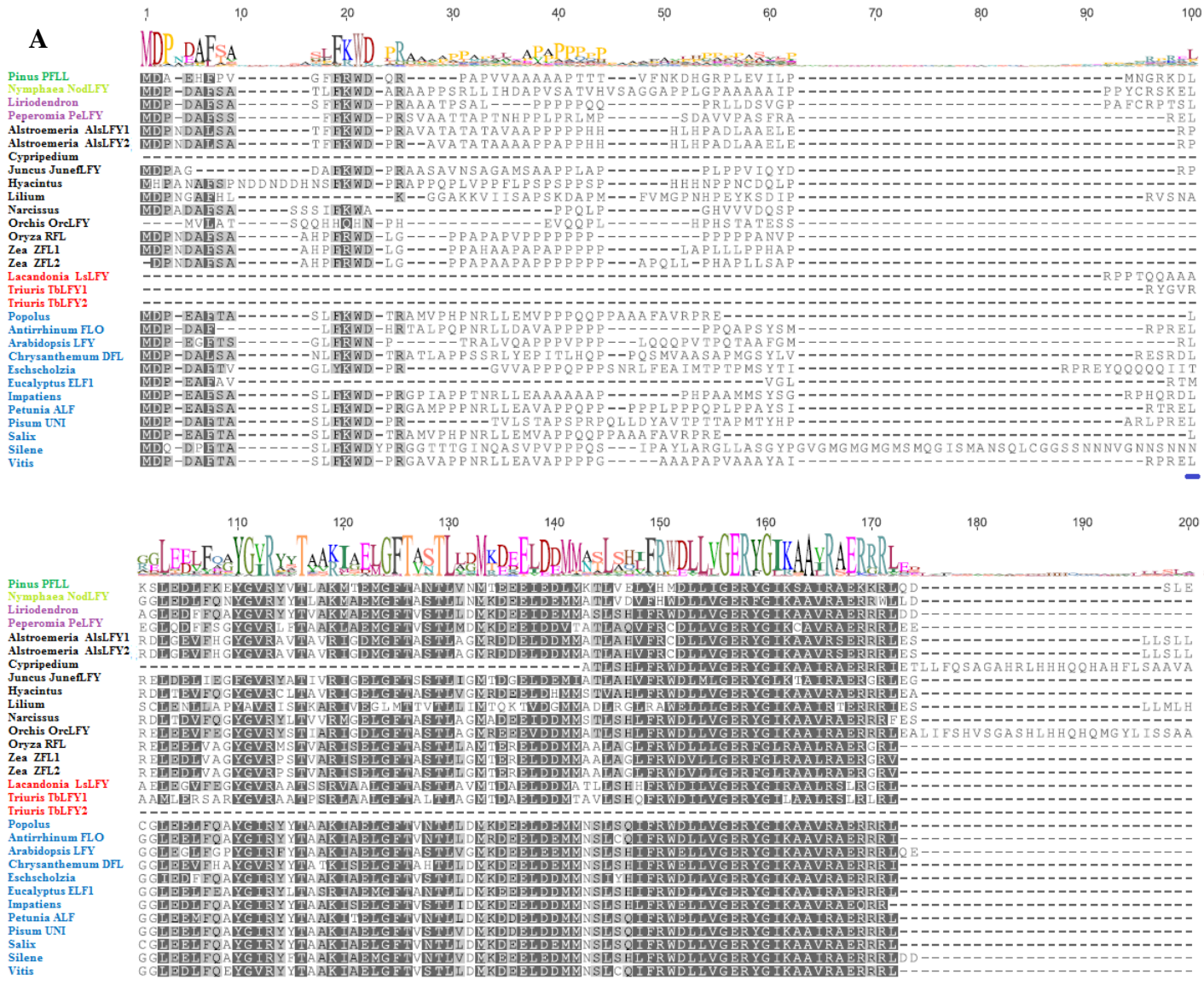
Figura 6.2.1 Comparación de secuencias de DNA genómico entre *RFL*, *LsLFY* y *LFY*. El signo de interrogación en la secuencia de *LsLFY* en el segundo intrón, se refiere a que este fragmento de la secuencia es una inferencia hecha a partir de análisis comparativos de *LFY* y no ha sido amplificada experimentalmente.

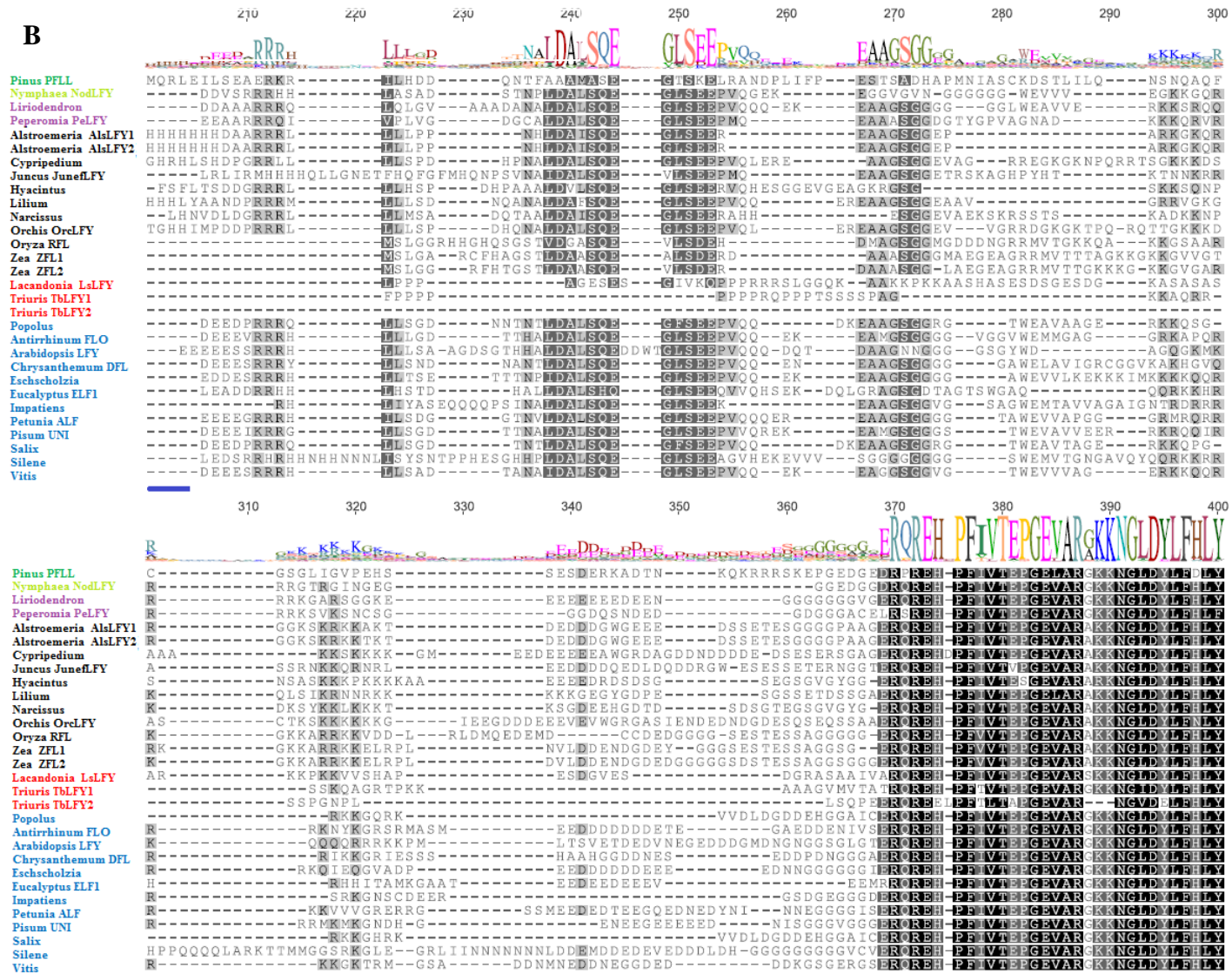
En contraste, en *T. brevistylis* se identificaron dos ortólogos *TbLFY1* y *TbLFY2*. Si bien esto es poco común, en algunas pocas especies poliploides como el maíz y *Nicotiana tobaccum* se ha podido identificar más de un ortólogo de *LFY* (Aagaard *et al.*, 2005). Los homólogos de *LFY* en maíz (*zfl1* y *zfl2*) tienen cierta redundancia funcional en el desarrollo floral. Sin embargo, *zfl1* está más asociado con el tiempo de floración, mientras que *zfl2* está más asociado con características de la estructura de inflorescencia, sugiriendo cierta divergencia funcional (Bomblies *et al.*, 2003). Otra especie con más de un ortólogo de *LFY* es *Eucalyptus globulus*, el cual presenta dos ortólogos de *LFY* (*ELF1* y *ELF2*). Mientras *ELF1* se expresa en los órganos florales durante el desarrollo en un patrón similar al de *LFY*, *ELF2* parece ser un pseudogen (Southerton *et al.*, 1998). Por otro lado en *A. thaliana*, el aumento de número de copias de *LFY* silvestre tiene como consecuencia una floración más temprana (Blázquez *et al.*, 1997). El aumento en el número de ortólogos de *LFY* en angiospermas parece afectar principalmente aspectos de iniciación floral y características de la inflorescencia más que a la disposición de órganos en el MF. Los dos ortólogos de *LFY* en *T. brevistylis* podrían también estar más relacionados con estos aspectos que con la homeosis observada en algunos individuos (Fig 6.2.2.3). Alternativamente, la presencia de los dos ortólogos de *LFY* podría deberse a que uno de estos fuera un pseudogen como es el caso de *ELF2* (Southerton *et al.*, 1998).

6.2.1 Obtención de secuencias homólogas de LsLFY

En el alineamiento de secuencias de aminoácidos de homólogos de LFY en diferentes linajes de angiospermas, se observó que existen dos sitios conservados; uno hacia el extremo N-terminal y el segundo hacia el extremo C-terminal (Figura 6.2.1.1). La primera sección conservada corresponde al dominio de dimerización de LFY en *A. thaliana* y es esencial para su actividad biológica (Siriwardana & Lamb, 2012b). Por su parte, el dominio C-terminal se ha descrito como un sitio de unión a DNA (Hamès *et al.*, 2008). La fuerte conservación de ambos dominios sugiere que la función molecular de LFY está también conservada a través de las secuencias analizadas. Otra evidencia adicional que refuerza la importancia de estos dos dominios es que todas las mutaciones que truncan la actividad de LFY en *A. thaliana* están mapeadas a estas secciones (Siriwardana & Lamb, 2012b). Modificaciones en estos dominios pueden ser las responsables de los cambios de función bioquímica de LFY en diferentes linajes.

Se han observado mutaciones en el dominio de unión a DNA en la secuencia del ortólogo de LFY del musgo *Physcomitrella patens*, que parece comprometer su actividad bioquímica. En *P. patens* este factor de transcripción controla aspectos generales del ciclo de vida mientras que en angiospermas tiene actividades más especializadas como la inducción del destino floral (Maizel, *et al.*, 2008).





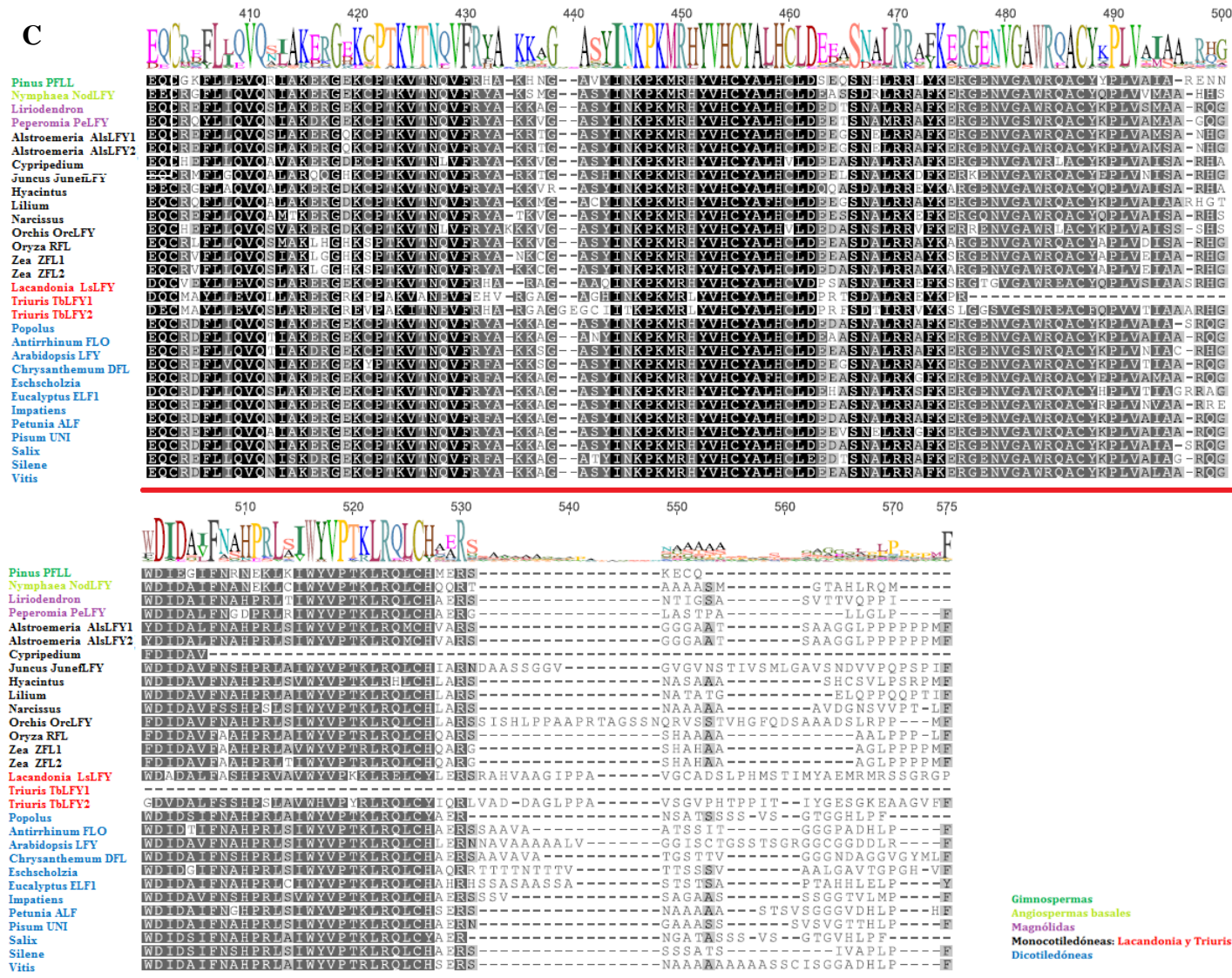


Figura 6.2.1.1 Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de LsLFY, TblFY1 y TblFY2 con homólogos de LFY de diferentes embriofitas. LFY y sus ortólogos contienen dos dominios conservados; subrayado con azul se encuentra la región N terminal, importante para la homodimerización de la proteína y subrayado con rojo se encuentra la región del extremo C-terminal que es el dominio de unión a DNA. Los guiones representan espacios que

fueron introducidas para optimizar el alineamiento. En negro se representan los sitios con 100% de similitud; en gris oscuro sitios con 80 a 100%; en gris claro residuos con 60 a 80% y en blanco los sitios con menos de 60% de similitud. En la secuencia consenso, la altura de los caracteres representa un promedio de la frecuencia del aminoácido en dicha posición. Panel A: Región comprendida entre el aminoácido 1 y el 200, respecto a la secuencia consenso. Panel B: Región comprendida entre los aminoácidos 201 al 400. Panel C: Región comprendida entre el aminoácido 401 al 575.

6.2.2 Dominios conservados: Extremo N y C terminal

En general, los factores de transcripción presentan sus actividades de unión a DNA y dimerización en dominios altamente conservados. Usualmente, la región de unión a DNA está más conservada que el dominio de dimerización (Amoutzias *et al.*, 2004, Simionato *et al.* 2007). La estructura de la proteína de LsLFY y sus homólogos siguen este patrón. En el Apéndice 7; Tabla A.7.1, se puede observar que LsLFY y TbLFY1 presentan mayores porcentajes de identidad a sus homólogos en el dominio de unión a DNA (extremo C-terminal) que con el dominio de dimerización (extremo N-terminal). Sin embargo, debe considerarse que la región C terminal presenta una mayor longitud pero que de forma individual, los ortólogos de LFY en *L. schismatica* y *T. brevistylis* presentan más sustituciones en el dominio de unión a DNA que en el de dimerización. Las mutaciones que se encontraron en LsLFY, TbLFY1 y TbLFY2, respecto a LFY de *A. thaliana*, se resumen en las tablas 6.2.2.1 y 6.2.2.2.

- **Dominio N-terminal de LFY**

La homodimerización de LFY, necesaria para su interacción con otras proteínas, está mediada por el dominio N-terminal que es esencial para su actividad biológica y esta asociación estabiliza la unión a DNA (Siriwardana & Lamb, 2012b). Esta observación fue corroborada experimentalmente al documentar que mutaciones que abolen la habilidad de auto asociación no son capaces de complementar alelos nulos de *lfy*.

En esta región existen cinco residuos de leucinas (posiciones 124, 131, 139, 146, 154) en LFY, cuyo patrón de espaciamiento entre sí tiene similitud con las leucinas presentes en los zipper de leucina, sugiriendo que esta región puede formar una estructura similar (Siriwardana & Lamb, 2012b).

De las cinco leucinas representativas de este dominio, Siriwardana & Lamb, (2012b) habían propuesto dos como conservadas en todas las plantas terrestres (posiciones 131 y 154, para la secuencia consenso aquí presentada). No obstante, en el alineamiento de la Figura 6.2.2.1 se observa que la leucina 154 se encuentra modificada en los ortólogos de maíz (L154V) ZFL1 y ZFL2 y en LsLFY y en TbLFY1 (L154I).

Las otras tres leucinas presentes en las posiciones 124, 139 y 146 se han descrito como conservadas en monocotiledóneas y dicotiledóneas (Siriwardana & Lamb, 2012b). Sin embargo, en el alineamiento de la Figura 6.2.2.1 se muestra que la única leucina conservada entre estos linajes de angiospermas e incluso en todo el grupo de embriofitas es la correspondiente a la posición 131.

En la secuencia de TbLFY1, se encontró una inserción de metionina en la posición 103 y una deleción en la posición 108 en TbLFY1. Ninguna de estas sustituciones se encuentra en otra embriofita. Para LsLFY y TbLFY1 también se encontró la mutación en la posición 169 de una leucina, que es un aminoácido no polar. En esta posición siempre se encuentra un ácido glutámico que presenta carga negativa. Aunque el E169 está muy conservado en embriofitas, no se tienen análisis de los efectos de las mutaciones puntuales en este sitio.

Sustituciones encontradas en el Dominio N-terminal para LsLFY, TblFY1 y TblFY2

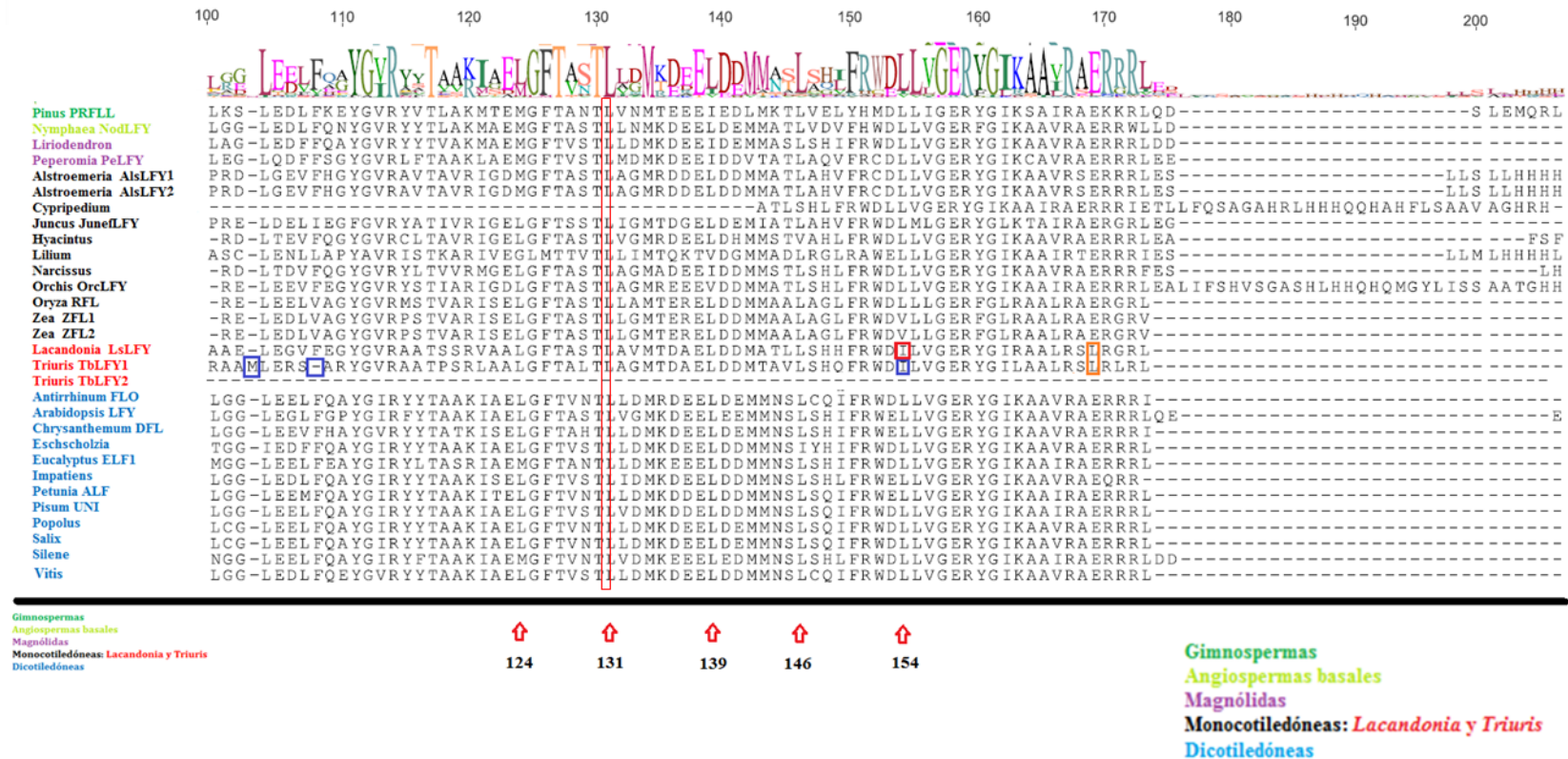


Figura 6.2.2.1. Alineamiento de la región N-terminal de las secuencias de aminoácidos de LsLFY, TblFY1, TblFY2 y sus homólogos en gimnospermas (verde), angiospermas basales (verde claro), Magnólicas (morado), monocotiledóneas (negro) y dentro de este grupo *L. schismatica* y *T. brevistylis* en rojo, dicotiledóneas (azul). En el alineamiento las cajas azules señalan residuos únicos para los parálogos de *T. brevistylis*, las cajas rojas residuos únicos para *L. schismatica* y las cajas naranjas señalan residuos que parecen ser específicos de Triuridaceae. En la parte inferior del alineamiento se indican con flechas las posiciones donde se encuentran las leucinas conservadas descritas en el trabajo de Siriwardana & Lamb, 2012b. Algunas de estas leucinas se han propuesto como conservadas en traqueofitas (subrayadas en azul) y angiospermas (enmarcadas en un cuadro negro). La posición 131 señalada en un rectángulo rojo se refiere a la única leucina conservada en traqueofitas en este alineamiento.

En el caso de la sustitución de L154I en LsLFY y TblFY1 se trata de aminoácidos no polares al igual que la leucina que generalmente se encuentra en esta posición, por lo que podría no implicar cambio significativo a nivel estructural y/o funcional. Sin embargo, esta sustitución podría tener efectos sobre la capacidad de homodimerización de estas proteínas, ya que la mutación de las cinco leucinas en LFY de *A. thaliana*, cuando son convertidas en alaninas tienen como consecuencia la reducción de la fuerza de las interacciones LFY-LFY, que disminuyen la habilidad de complementar mutantes *lfy* (Maizel, *et al.*, 2005).

Es posible que las sustituciones presentes en el dominio N de los ortólogos de ambas triuridáceas modifiquen la capacidad de autodimerización LFY-LFY. Esto podría sugerir que en las triuridáceas mexicanas LFY tiene actividad como monómeros, aunque no han sido reportados casos como este previamente y al menos para LFY, la unión cooperativa a DNA como dímeros es esencial para que este factor de transcripción ejerza su actividad biológica. Las sustituciones observadas en LsLFY y TblFY1 se resumen en la siguiente tabla:

Dominio	Posición	Embriofitas	LsLFY	TblFY1	Observaciones	Referencia
Dimerización (N-terminal)	103	–	–	Inserción de M	No presente en ninguna otra embriofita.	Este trabajo
	108			Delección		
	154	L No polar	I No polar	I No polar	Reducción de la fuerza de interacción LFY-LFY. Conservación de la identidad química del aminoácido.	Siriwardana & Lamb, 2012 y este trabajo
	169	E Cargado negativamente	L No polar	L No polar	Posición altamente conservada en embriofitas.	Este trabajo

Tabla 6.2.2.1. Resumen de las principales sustituciones en el dominio de dimerización encontradas en las secuencias de los ortólogos de LsLFY, TblFY1 y TblFY2, respecto a las secuencias de homólogos de otras embriofitas.

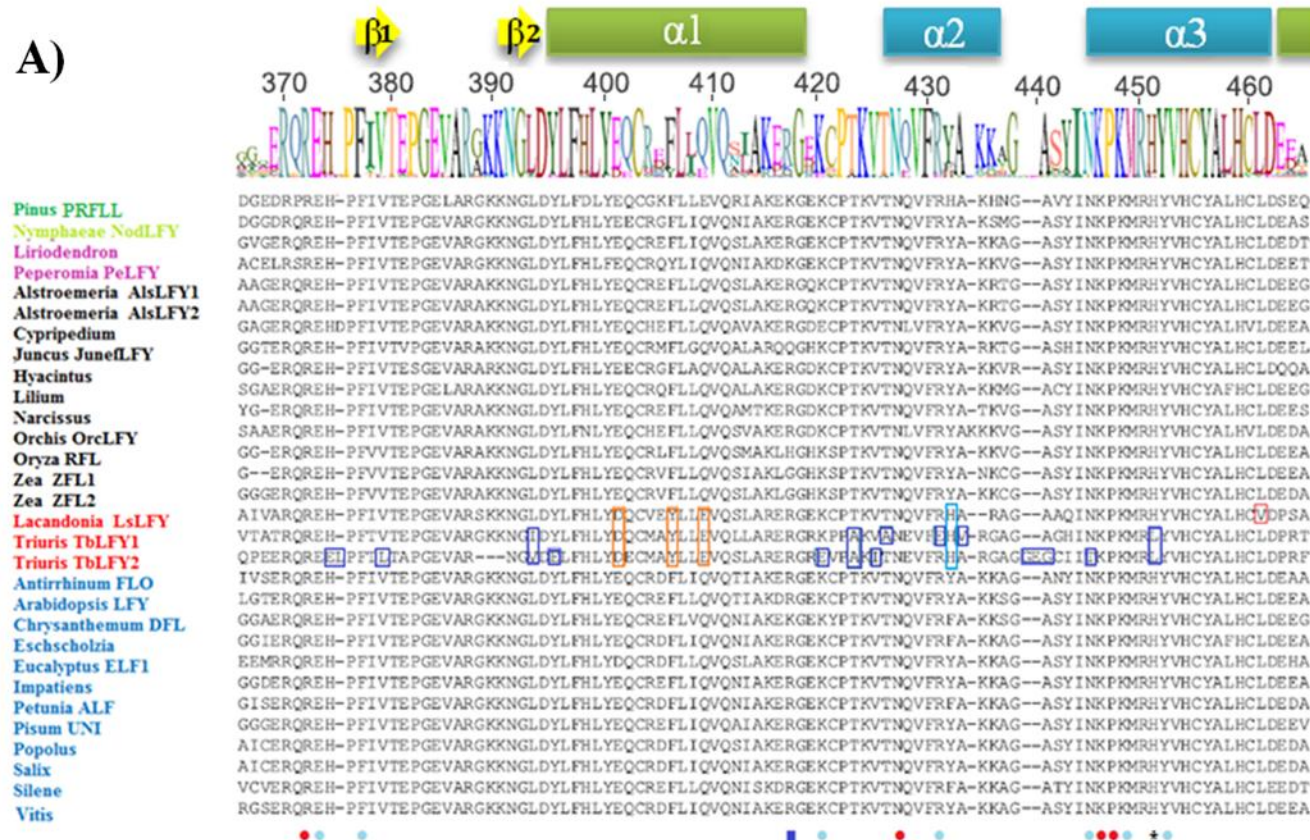
- **Dominio C terminal de LFY**

El dominio C corresponde al sitio mínimo de unión a DNA y la fuerte conservación de su secuencia entre homólogos, sugiere que la función molecular de LFY también está conservada. Se ha propuesto que este sitio es el principal responsable de la divergencia de función de LFY (Maizel, *et al.*, 2005).

Un análisis de esta región para las secuencias de aminoácidos de LsLFY, TbLFY1 y TbLFY2 mostró varias sustituciones en sitios altamente conservados para otras embriofitas (Figura y tabla 6.2.2.2) siendo las más relevantes las presentes en aquellos residuos que Hamès *et al.* (2008) han establecido como involucrados en dimerización (posición 527) y de interacciones involucradas con el esqueleto de DNA (posiciones 431, 445, 517 y 520), así como el sitio 451, cuya mutación puntual tiene como consecuencia la actividad parcial de LFY, indicando que ese sitio es crucial para la unión a DNA (Maizel, *et al.* 2005). En la tabla 6.2.2.2 se enumeran las mutaciones principales encontradas en la región C-terminal de LsLFY, TbLFY1 y TbLFY2.

Sustituciones encontradas en el Dominio C-terminal para LsLFY, TbLFY1 y TbLFY2

A)



Aminoácido involucrado en:

- Dimerización
- Unión al esqueleto de ADN
- Unión a bases de ADN

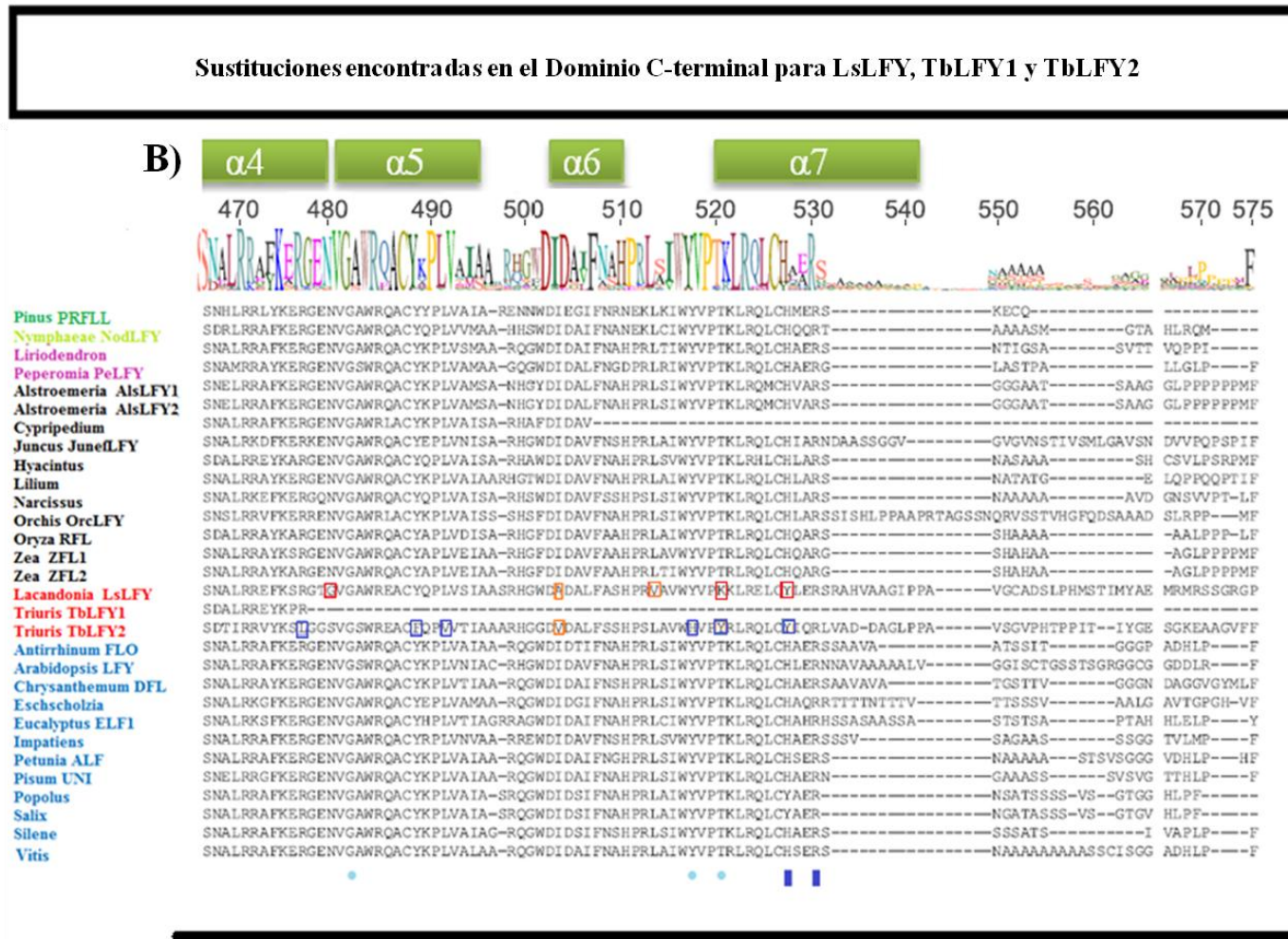


Figura 6.2.2.2. Alineamiento de la región C-terminal de las secuencias de aminoácido de LsLFY, TbLFY1, TbLFY2 y sus homólogos. En la parte superior del alineamiento se indican las regiones de la estructura secundaria propuesta de la proteína, como hélices beta y alfa. Los residuos involucrados en la interacción con bases de y el esqueleto de DNA están marcados con círculos rojos y azules, respectivamente, debajo del alineamiento. Los rectángulos azules indican los residuos involucrados en la dimerización. En este alineamiento los aminoácidos marcados con rectángulos rojos y los azules resaltan los

aminoácidos de las secuencias de *L. schismatica* y *T. brevistylis*, respectivamente, que varían en sitios altamente conservados en los demás taxones analizados. El asterisco señala la posición 451, cuya mutación puntual tiene como consecuencia la actividad parcial de LFY, indicando que ese sitio es crucial para la unión a DNA (Maizel, *et al.* 2005). Las cajas azul claro señalan aminoácidos que varían dentro del clado de las monocotiledóneas y las cajas anaranjadas son aminoácidos presentes tanto en los ortólogos de LFY de *T. brevistylis* como en *L. schismatica* y que no se encuentran en los otros grupos. Panel A) Región comprendida entre el aminoácido 365 al 465. Panel B) Región comprendida entre el aminoácido 466 al 575. Modificado de Hamès *et al.*, 2008.

La mutación N445T en TbLFY2 es interesante porque en *A. thaliana* se ha reportado que la mutación N445D da lugar a una reducción en la afinidad de unión al DNA lo que se traduce en un fenotipo débil de pérdida de función (Maizel, *et al.* 2005).

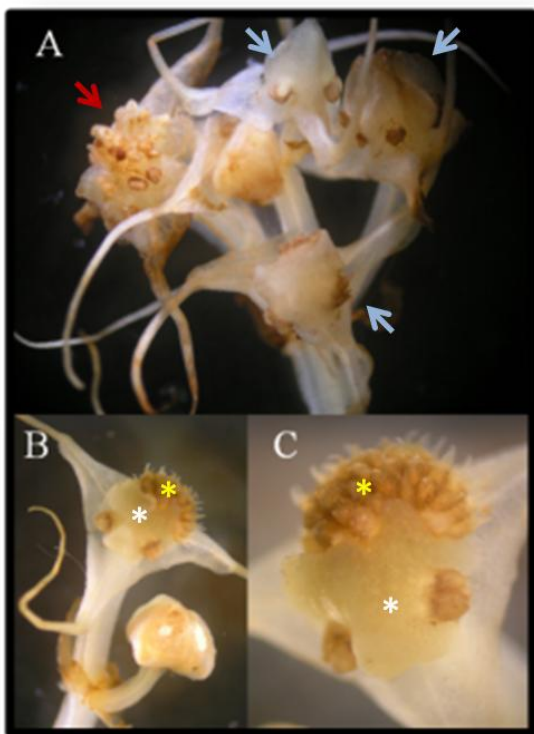
Por otro lado, la posición 451 es crucial para la unión a DNA y está ocupada por histidina (H) en helechos, gimnospermas y angiospermas. En esta posición el ortólogo en *Physcomitrella patens*, PpLFY1, presenta ácido aspártico (D) y la substitución H451D parece estar restringida a musgos verdaderos. En PpLFY1 este es el único aminoácido que aunque difiere de las secuencias de otras plantas estudiadas en el extremo C-terminal, su mutación no inactiva la proteína y es responsable de modificar la especificidad de unión a DNA en comparación con sus ortólogos en angiospermas (H451). Además la mutación de este sitio en PpLFY1, activa parcialmente la transcripción y en plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con PpLFY1 (D451H) provee actividad parcial de LFY (Maizel, *et al.* 2005). Estas plantas forman órganos con características petaloides y estaminoides (Maizel, *et al.* 2005).

La H451 está conservada en angiospermas, excepto para TbLFY1 y TbLFY2, donde está sustituida por leucina. Este resultado demuestra que modificaciones en la posición 451 no son exclusivas de musgos y que este sitio en *T. brevistylis* podría reflejar una modificación importante en el dominio de unión a DNA, posiblemente modificando la función de LFY en esta especie, como se ha propuesto en *Physcomitrella patens* (Maizel, *et al.* 2005).

La posición 527 está altamente conservada en embriofitas y está involucrada en dimerización. En esta posición es común encontrar histidina, un aminoácido polar, mientras

que LsLFY1 y TbLFY2 presentan tirosina (Y) que es un aminoácido hidrofóbico. En *A. thaliana* la unión cooperativa a DNA se ve moderadamente afectada en mutantes H527A y se ha detectado que la H527 y la R530 son responsables para dicha unión. En una búsqueda en el NCBI de todos los homólogos de LFY, se identificaron que sólo los ortólogos de LFY en *Salix discolor* y *Populus trichocarpa* presentan esta tirosina en la posición 527. Además, *P. trichocarpa* presenta dos ortólogos de UFO (No. Acceso: XP_002303341.1 y XP_002326440.1).

Es interesante mencionar que los *Populus* o álamos son dioicos, con inflorescencias compuestas de flores unisexuales encontradas en árboles separados, aunque ocasionalmente se encuentran inflorescencias mezcladas o flores hermafroditas (Rottmann *et al.*, 2000). Como se refirió en la introducción, en *T. brevistylis* también se han identificado flores atípicas que son bisexuales en una especie considerada como dioica (Figura 6.2.2.3).



Las modificaciones en los residuos de aminoácidos en la posición 527 así como el número de parálogos de LFY (TbLFY1 y TbLFY2) en *T. brevistylis* o de ortólogos de UFO en otras especies como *P. trichocarpa* (*Populus trichocarpa 1* y *Populus trichocarpa 2*), podría ser importante para la generación de inflorescencias unisexuales pero también, para un bajo porcentaje de homeosis en estas especies. Las sustituciones observadas en LsLFY y TbLFY1 se resumen en la tabla 6.2.2.2.

Figura 6.2.2.3. Plantas homeóticas de *Triuris brevistylis*. A) En la misma inflorescencia se aprecia el desarrollo de flores masculinas (flechas azules) y flores femeninas (flechas blancas). B) y C) Flor bisexual en la que se observa el desarrollo de gineceo (asterisco amarillo) y androceo (asterisco blanco) en una misma estructura floral.

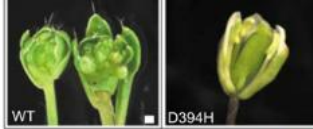
Dominio	Posición	Embriofitas	LsLFY	TbLFY1	TbLFY 2	Observaciones	Referencia
Unión a DNA (C-terminal)	389 y 390	K Cargado		Delección	Delección	Conservados en traqueofitas Posible participación en interacciones con otras proteínas	Hamès <i>et al.</i> , 2008 y este trabajo
	431	R Cargado positivamente		E Cargado negativamente		Importante para la unión al esqueleto de DNA	
	445	N Polar			T No polar	Importante para la unión al esqueleto de DNA	Maizel, <i>et al.</i> 2005 y este trabajo
	451	H Polar		L No polar	L No polar	Necesario para la unión a DNA No es única de musgos 	
	517	Y Hidrofóbico		–	H Polar	Importante para la unión al esqueleto de DNA	Hamès <i>et al.</i> , 2008 y este trabajo
	520	T No polar	K Cargado	–	Y Hidrofóbico	Importante para la unión al esqueleto de DNA	
	527	H Polar	Y Hidrofóbico	–	Y Hidrofóbico	Dimerización	Hamès <i>et al.</i> , 2008 y este trabajo

Tabla 6.2.2.2. Resumen de las principales sustituciones en el dominio C terminal de unión a DNA encontradas en las secuencias de los ortólogos de LsLFY, TbLFY1 y TbLFY2, respecto a las secuencias de homólogos de otras embriofitas. Para la secuencia de TbLFY1, los guiones representan posiciones para las cuales no se tiene información

6.2.3 Relaciones evolutivas

Para conocer las relaciones evolutivas de los homólogos de LsLFY se construyó un árbol filogenético enraizado con las secuencias de aminoácidos de sus homólogos en *Pinus*. Figura 6.2.3.1. Este árbol muestra que de forma general, la topología de las relaciones evolutivas de estas proteínas concuerda con la topología recuperada en trabajos donde se analiza la filogenia de especies (APGIII, 2009), al obtenerse dos grandes grupos: las monocotiledóneas y las dicotiledóneas.

Las secuencias de LFY obtenidas para ambas Triuridáceas mexicanas se agrupan en el clado de ortólogos de monocotiledóneas. De los dos parálogos de *T. brevistylis*, TbLFY2 parece presentar una tasa de evolución mayor respecto a TbLFY1 y respecto a los otros homólogos de LFY analizados.

Como se ha mencionado, se cuenta con secuencias parciales por lo que será interesante comprobar estos resultados una vez que se hayan amplificado totalmente las secuencias de *TbLFY1* y *TbLFY2*, así como llevar a cabo análisis de evolución molecular a nivel de nucleótidos sobre cada una de las secuencias de LFY encontradas en *L. schismatica* y *T. brevistylis*, con el fin de ver si hay sitios que estén sujetos a selección diferencial y si éstas coinciden con los aminoácidos descritos arriba como importantes para el plegamiento, homodimerización e interacción proteína-DNA de LFY.

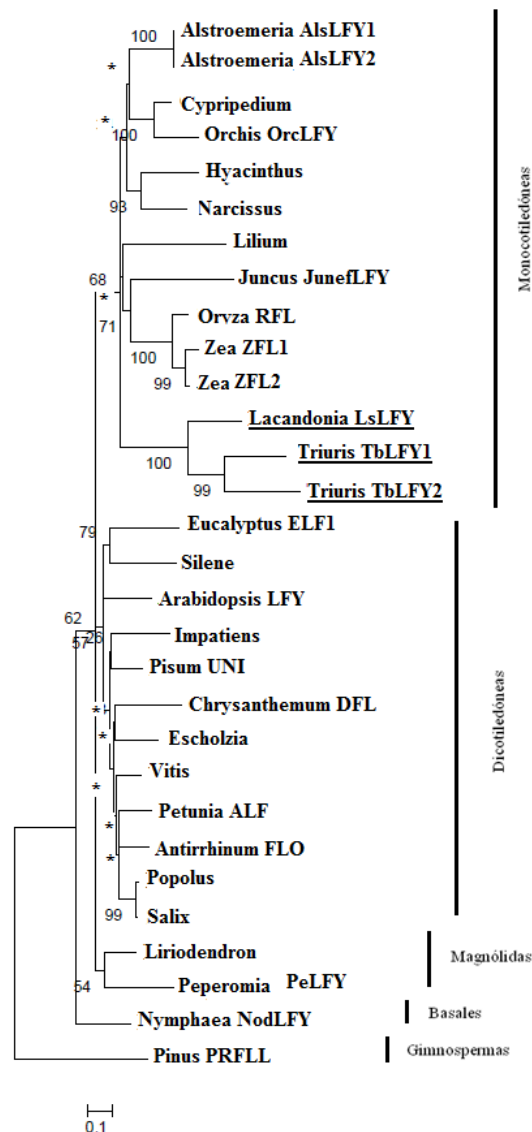


Figura 6.2.3.1. Análisis de relaciones evolutivas de LFY generadas por el método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo JTT (Jones, *et al.* 1992). Los valores de confianza para la filogenia, se determinaron de acuerdo con 1000 réplicas. De lado izquierdo se muestran los valores de confianza obtenidos por remuestreo (bootstrap value) y los asteriscos indican valores menores a 50. Se utilizó una distribución discreta Gamma para modelar la diferencia en las tasas evolutivas entre sitios (parámetro = 0.9662). Las tasas del modelo de variación permite que ciertos sitios sean evolutivamente invariables ([+I], 7.7224% sitios). El análisis involucra 30 secuencias de aminoácidos. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas proporcional al número de sustituciones por sitio. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias. Se consideraron 575 posiciones en el juego de datos final. Los análisis evolutivos fueron construidos en MEGA (Tamura *et al.* 2011).

6.2.4 Posibles impactos de la duplicación de *LFY* y *AP3* en el fenotipo floral de *T. brevistylis* y *L. schismatica*

A pesar de la diferencia en las historias de duplicación de *LFY/FLO* y *AP3/DEF*, estos genes interactúan en una vía esencialmente conservada, fundamental para el establecimiento de al menos el verticilo de estambres (Ingram, *et al.*, 1995). En este sentido, es relevante el hecho de que *T. brevistylis* presenta dos genes *AP3* (Cappello *et al.*, sin publicar, citado en: Garay-Arroyo *et al.*, 2012; ver tesis de Dolores Fuentes, 2013) y dos parálogos de *LFY* (documentados en este trabajo). Será fundamental investigar el papel que estas duplicaciones puedan tener en el diocismo aparente de *T. brevistylis* y sobre todo, en la evolución del linaje de *Lacandonia*, ya que la evidencia actual sugiere que estas dos especies son taxones hermanos (Davis *et al.*, 2004; Rudall & Bateman, 2006). El análisis de otras especies dentro de estos dos géneros, como son *L. brasiliiana* (Melo y Alves, 2012) y otras *Triuris* (Maas y Rubsamen, 1986), serán importantes para determinar si existió una duplicación de los ortólogos de *AP3* y *LFY* en *T. brevistylis* que no sucedió en *L. schismatica* o si uno de los ortólogos de cada uno de los genes se perdió en este último género.

Por su parte, las duplicaciones de *TbAP3* y *TbLFY* pueden haber sido objeto de presión de selección diferencial, permitiendo la adquisición de nuevas funciones vía subfuncionalización -restricción del dominio de expresión de los parálogos comparados con lo que ha sido documentado en homólogos funcionales de genes de copia única- y/o neofuncionalización -a través de un cambio en el dominio de expresión en otro verticilo u órgano, o adquiriendo nuevas funciones relativas a las del gen parálogo (Vandenbussche *et al.*, 2004).

Los fenotipos homeóticos de algunas *T. brevistylis* (Figura 6.2.2.3) sugieren que al menos en algunos individuos de la especie, se encuentra la presencia activa de todos los genes necesarios para establecer los órganos reproductivos femeninos y masculinos, por lo que se requiere de experimentos posteriores para determinar si en ambos sexos se encuentran de manera habitual y activa los dos transcritos de los parálogos de *LFY* y de *AP3* o sólo en plantas con flores bisexuales. También será útil comparar los resultados obtenidos con otras Triuridáceas para determinar si el hecho de que *L. schismatica* sea el único género monoico de la tribu Triuridae pudiera deberse a la pérdida de una copia de *AP3* y de *LFY* y a la

neofuncionalización de la copia restante o debido a otros procesos genético-moleculares.

6.2.5 Diseño de sondas.

Otra aproximación para investigar los posibles cambios en función de un gen transcrito es mediante la observación de sus patrones de expresión *in situ*, lo que es complementado habitualmente con experimentos funcionales donde se analizan los fenotipos de mutantes de pérdida de función, sobre-expresión y recuperación de dicho gen. En el caso de los genes ortólogos de LFY recuperados en este trabajo para *L. schismatica* y *T. brevistylis*, será fundamental observar sus patrones de expresión con el fin de generar hipótesis funcionales en torno a qué interacciones proteína-proteína entre factores de transcripción y otros factores regulatorios como UFO, pudieran haber sufrido cambios moleculares que impacten en su patrón de expresión espacio-temporal. Esta aproximación será particularmente útil con los ortólogos de LFY en *T. brevistylis*, donde uno de estos dos parálogos (*TbLFY2*) parece haber sufrido mayores sustituciones que el otro.

Bajo los criterios señalados en la sección de metodología se eligió una región de la secuencia de *TbLFY1* en la que *TbLFY2* presentaba una delección de nueve nucleótidos para evitar falsos positivos en la hibridación *in situ* (Figura 6.2.5.1). Las sondas para *LsLFY* de 157 nucleótidos y para *TbLFY1* de 108 nucleótidos fueron diseñadas en el extremo C-terminal. Además se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 6.2.5.1) para su amplificación a partir de la secuencia previamente introducida en vector de clonación, como se detalla en métodos.



Figura 6.2.5.1 Alineamiento de homólogos de LsLFY y TbLFY. La caja negra muestra la sección correspondiente a las sondas diseñadas para experimentos de hibridación *in situ*.

Ya que LFY es un factor de transcripción específico de plantas y que presenta un alto nivel de conservación dentro del reino Plantae, mientras que no presenta similitud aparente con otras proteínas (Maizel, et al. 2005), la sonda de *LsLFY* se analizó contra la base de datos del NCBI y su especificidad se comprobó al encontrar parecido con *RFL LFY*, *FIM* y otros ortólogos. En el caso de *TbLFY1*, debido a que no se ha reportado ninguna secuencia similar, la especificidad del sitio elegido para la sonda se comprobó con ayuda del programa BLASTX y la sonda presentó parecido con los homólogos de *LFY* y *FIM*.

Sequence (5'→3')	Sonda	Tamaño (pb)	Orientación	Tm (°C)	Longitud (pb)
GGAGCACCCGTTTCATCGTGA	LsLFY	157	Sentido	55.9	20
GACCTTTGTGGGGCACTTCT			Antisentido	53.8	20
GAGCACCCGTTTCATCGTGAC	TbLFY	108	Sentido	55.9	20
CTCTAGCAGGTAGGCCATGC			Antisentido	55.9	20

Tabla 6.2.5.1. Oligonucleótidos propuestos para la amplificación de las sondas síntesis de cDNA de las sondas sentido y antisentido de de *LsUFO*, *LsLFY* y *TbLFY1*

6.3 Reguladores de LsAP3: UNUSUAL FLORAL ORGANS (LsUFO)

Se identificaron un ortólogo de *UFO* para *L. schismatica* (*LsUFO*) y una secuencia parcial correspondiente al ortólogo de *T. bevistylis* (*TbUFO*). Este descubrimiento es consistente con la tendencia general observada durante la búsqueda en el NCBI de ortólogos en otras angiospermas en las que sólo se ha encontrado una copia de este gen, siendo el maíz (*Zea mays* subsp. *mays*) y *Populus trichocarpa* las pocas excepciones conocidas en donde se detectaron dos ortólogos, pero para los que no se tienen análisis de función ni de homología previos.

La secuencia de UFO de ambas triuridáceas presenta un alto porcentaje de aminoácidos iguales entre el par de secuencias alineadas, o grado de similitud, (72.1%), a nivel de aminoácidos en la región para la cual se tiene información de ambas especies.

A nivel estructural, *LsUFO* carece de intrones al igual que su ortólogo en *Arabidopsis*, lo que contrasta con otras monocotiledóneas de las que se tiene información (Poales), que presentan dos exones y un intrón (Figura6.3.1). Este gen y su transcrito tienen un tamaño de 1,197 pb y la proteína de LsUFO es de 399 aminoácidos.

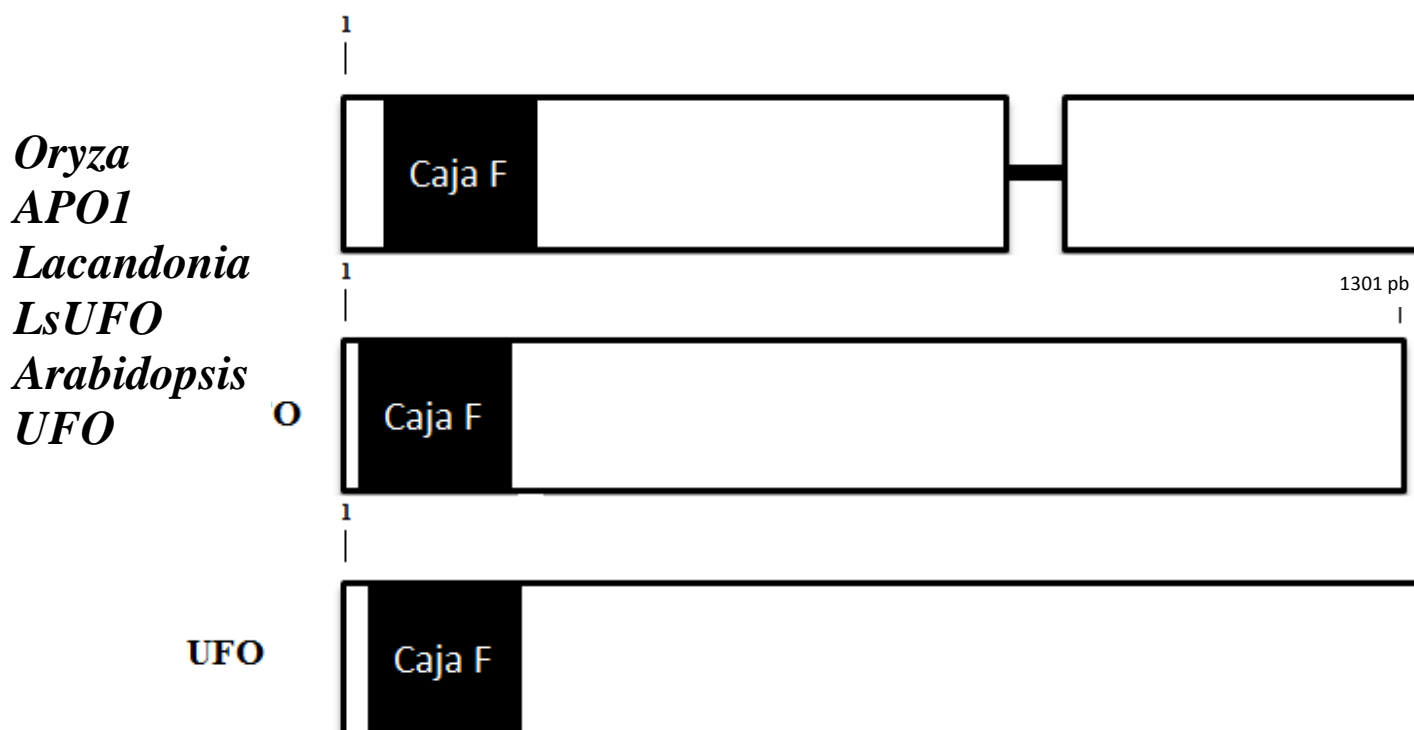


Figura 6.3.1. Comparación de secuencias de DNA genómico entre APO1, LsUFO y UFO.

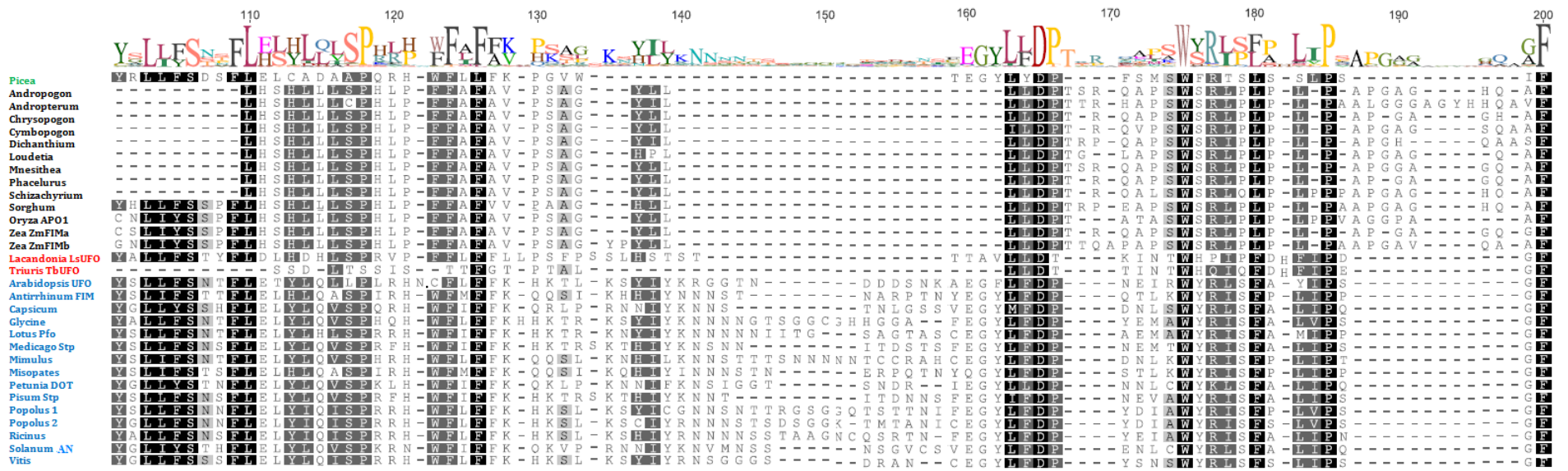
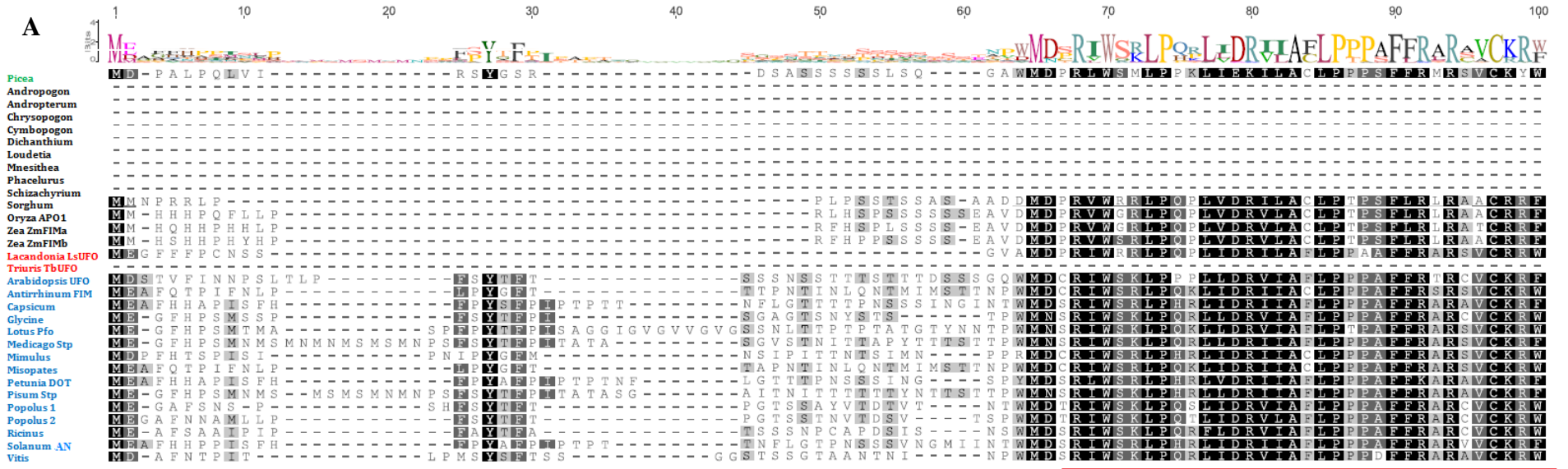
6.3.1 Obtención de secuencias homólogas de LsUFO

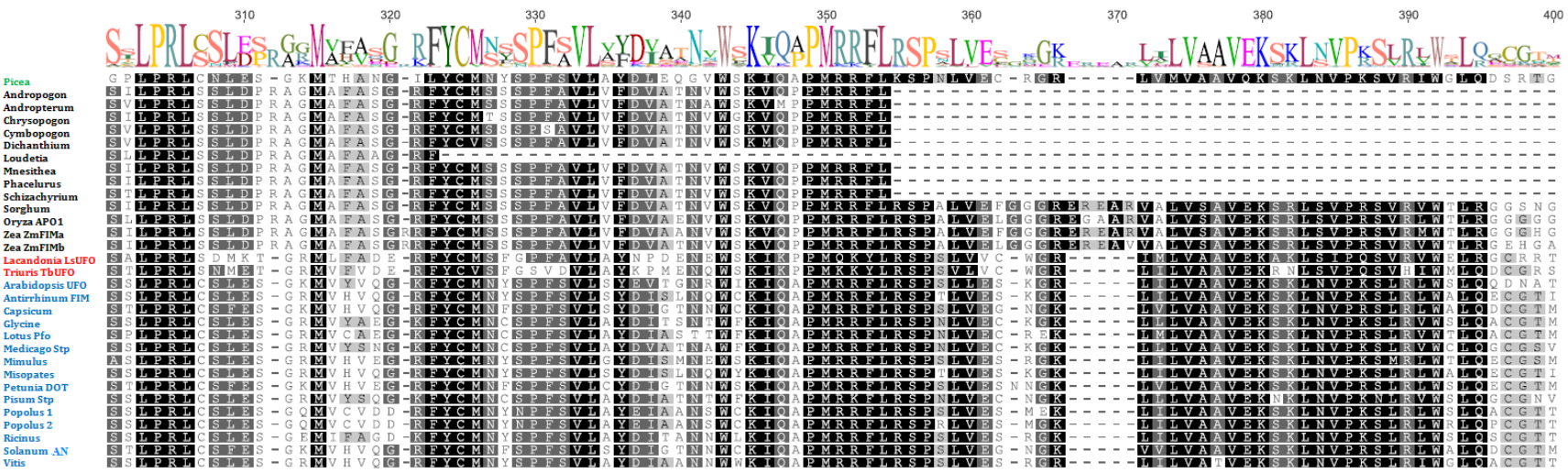
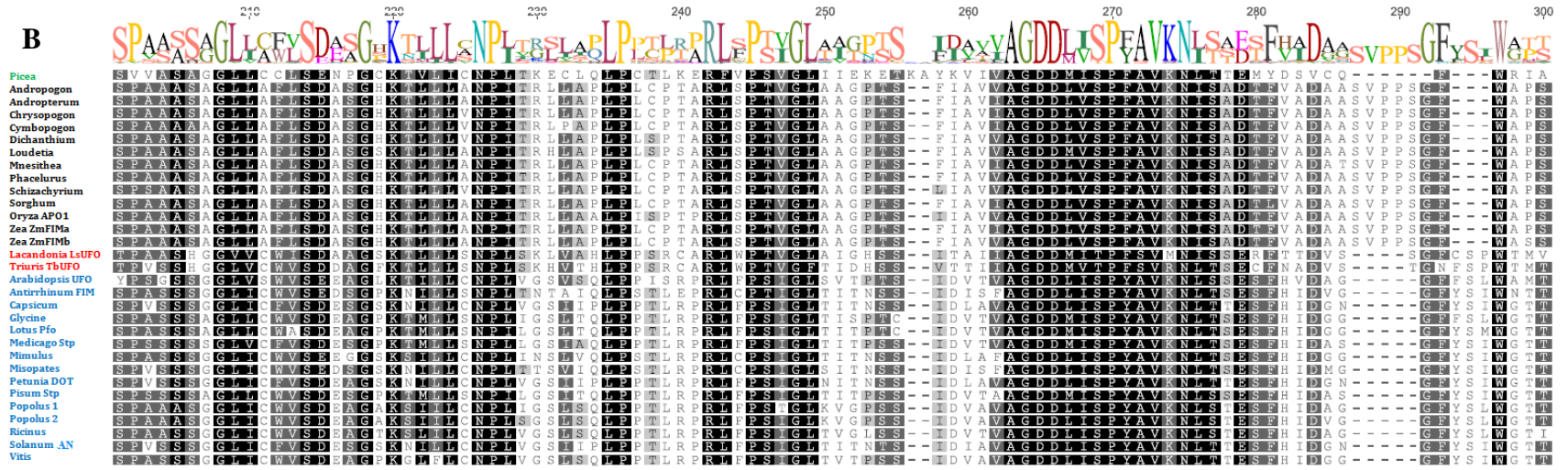
Para realizar los análisis de homología de *UFO*, se encontró el marco de lectura correcto y se buscaron secuencias de aminoácidos homólogas a LsUFO, TbUFO, UFO de *A. thaliana* (Ingram *et al.* 1995) y APO1 de *O. sativa* (Ikeda *et al.*, 2007) mediante un análisis con el programa BLAST. Tras la curación de las secuencias, se obtuvieron 30 homólogos de LsUFO en angiospermas mientras que se utilizó como grupo externo el ortólogo de este gen en *Picea abies* (gimnosperma). Una limitación de las secuencias de referencia obtenidas es que la caracterización funcional de homólogos de UFO en angiospermas en general y monocotiledóneas en particular está pobremente estudiada, existiendo para estas últimas, análisis de homología y función únicamente para APO1 de *O. sativa* (Ikeda *et al.*, 2007). Además, de los 11 registros de monocotiledóneas encontradas en la base de datos del NCBI todas pertenecen a la familia Poaceae y 9 están incompletas, careciendo del dominio F que caracteriza a la familia de proteínas a la que pertenece UFO. A pesar de esta limitación dichas secuencias fueron incluidas para ampliar el número de ortólogos comparados en monocotiledóneas. En el caso de las dicotiledóneas, al existir más información, únicamente

se utilizaron aquellos registros en los que se tenían las secuencias completas.

A nivel de aminoácidos, el alineamiento de homólogos de LsUFO y TbUFO muestra la estructura bipartita típica de las proteínas F-box (Kipreos & Pagano, 2000; Figura 6.3.1.1). En el dominio N-terminal se encuentra conservada la caja F que típicamente es requerida para la interacción directa con Skp1 del complejo SCF mientras que el extremo carboxilo terminal contiene un fragmento altamente conservado; ver Figura 6.3.1.1. Si bien el dominio F-box está relacionado con el reclutamiento de proteínas blanco en el complejo SCF mediante interacciones proteína-proteína (Bai *et al.*, 1996), para UFO no están caracterizados funcionalmente otros motivos fuera de la caja F, aunque en ensayos experimentales en los que esta caja se elimina se ha demostrado que la interacción con LFY es más fuerte, al menos en análisis de doble híbrido (Chae *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN





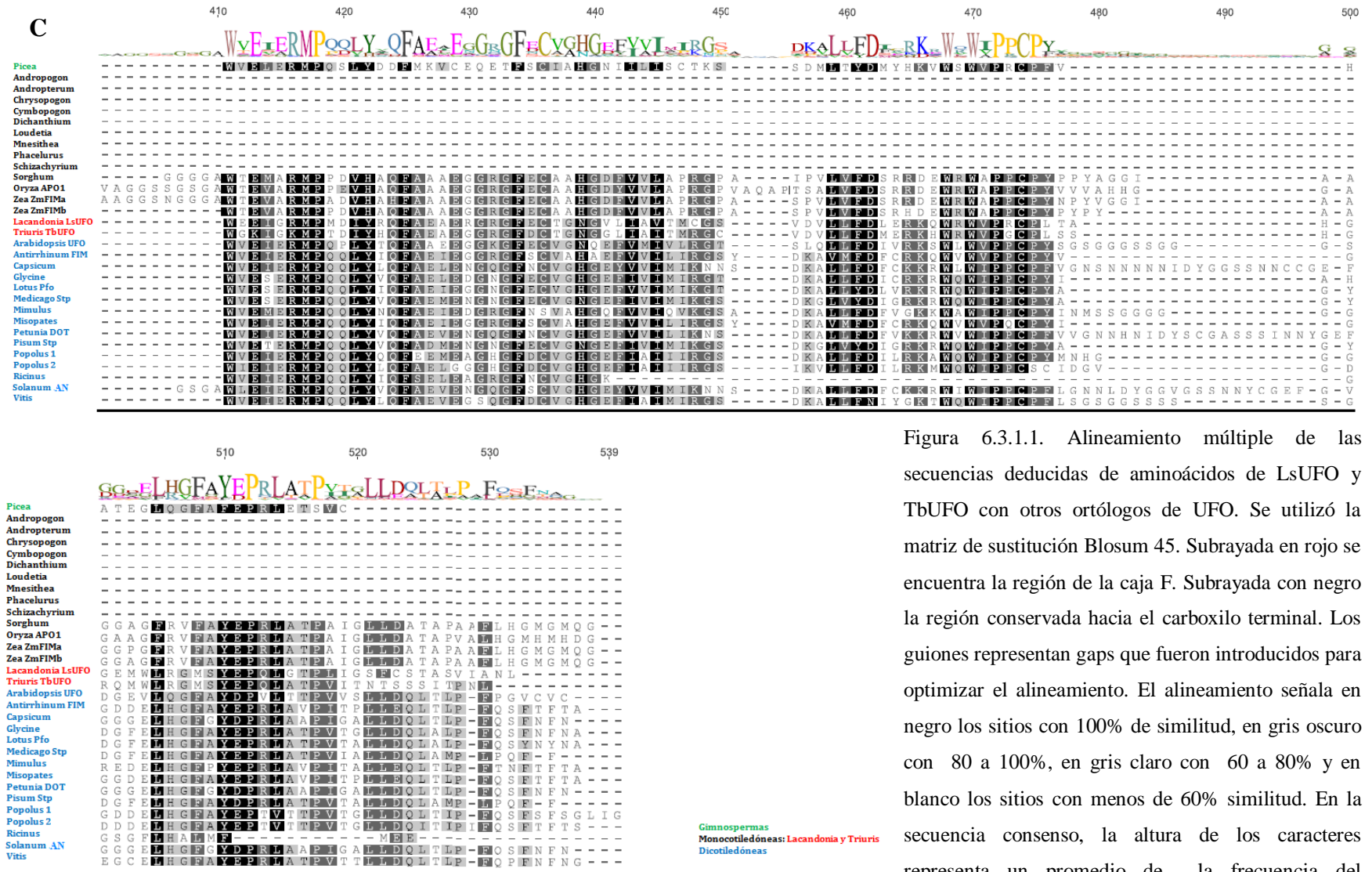


Figura 6.3.1.1. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de LsUFO y TbUFO con otros ortólogos de UFO. Se utilizó la matriz de sustitución Blosum 45. Subrayada en rojo se encuentra la región de la caja F. Subrayada con negro la región conservada hacia el carboxilo terminal. Los guiones representan gaps que fueron introducidos para optimizar el alineamiento. El alineamiento señala en negro los sitios con 100% de similitud, en gris oscuro con 80 a 100%, en gris claro con 60 a 80% y en blanco los sitios con menos de 60% similitud. En la secuencia consenso, la altura de los caracteres representa un promedio de la frecuencia del

aminoácido en dicha posición. Panel A: Región comprendida entre los aminoácidos 1 al 200 de la secuencia consenso. Pánel B: Región comprendida entre los aminoácidos 201 al 400. Panel C. Región comprendida entre los aminoácidos 401 al 539

Debido a que UFO pertenece a una de las superfamilias de proteínas más grande conocida (familia de proteínas F-box: FBX; Kipreos & Pagano, 2000), se realizó un árbol filogenético con las secuencias de ortólogos de UFO para corroborar origen común (Figura 6.3.1.2). Adicionalmente se incluyeron secuencias de posibles parálogos de UFO (llamados “UFO-like” en este trabajo) encontrados en *A. thaliana* y *O. sativa* a partir de la búsqueda de secuencias en el NCBI y utilizando secuencias UFO-like de *L. schismatica* como referencia. También se buscaron posibles parálogos de LsUFO y TbUFO a partir de datos del transcriptoma contrastados con la información de las secuencias consenso generadas. Este análisis permitió evitar el uso de secuencias “UFO-like”.

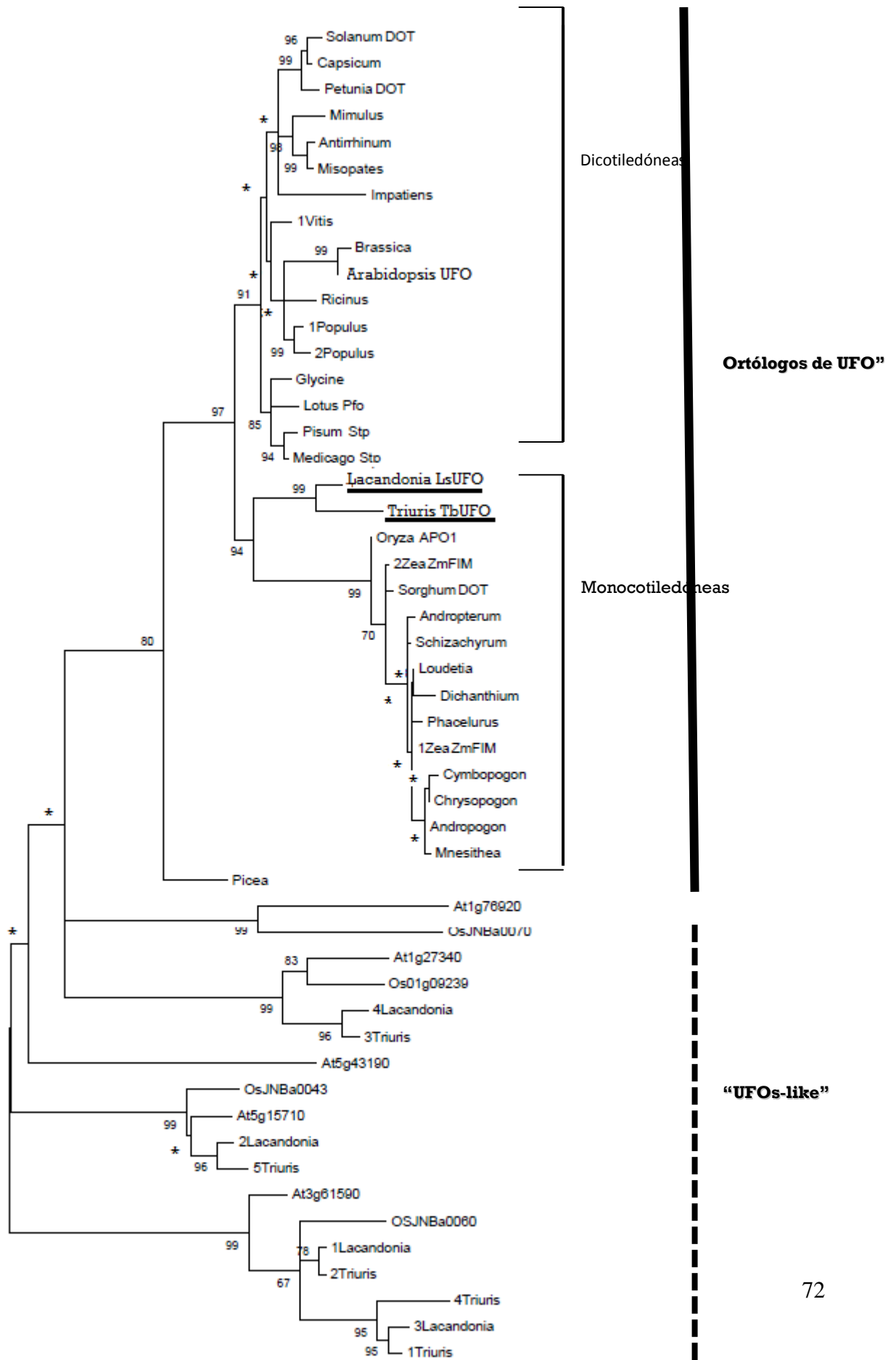


Figura 6.3.1.2. Árbol filogenético que muestra que LsUFO y TbUFO constituyen un clado con UFO, FIM, APO1, DOT, AN, STP y PFO, mientras que las proteínas UFO-like se agrupan en otros clados. Las relaciones evolutivas de UFO se generaron por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo JTT (Jones, et al. 1992). Los valores de confianza para la filogenia, se determinaron de acuerdo con 1000 réplicas.

Se utilizó una distribución discreta Gamma para modelar la diferencia en las tasas evolutivas entre sitios (parámetro = 1.4691). De lado izquierdo se muestran los valores de confianza obtenidos por remuestreo (bootstrap value) y los asteriscos indican valores menores a 50. El análisis involucra 51 secuencias de aminoácidos. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas proporcional al número de sustituciones por sitio. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias. Se consideraron 694 posiciones en el juego de datos final. Los análisis evolutivos fueron construidos en MEGA (Tamura et al. 2011).

Los UFO-like formaron un clado claramente distinguible y separado de los ortólogos de UFO tales como LsUFO, TbUFO, UFO de *Arabidopsis* (Ingram *et al.*, 1995), APO1 de arroz (Ikeda *et al.*, 2007), FIM de *Antirrhinum* (Simon *et al.*, 1994), DOT de *Petunia x hybrida* (Souer *et al.*, 2008), ANANTHA (AN) de *Solanum lycopersicum*, STANINA PISTILLOIDA (STP) de chícharo (Taylor, *et al.*, 2001), *Medicago truncatula* (Wang, *et al.*, 2008) y de PROLIFERATING FLORAL ORGANS (PFO) en *Lotus japonicus* (Zhang *et al.*, 2003). Lo anterior indica que las secuencias amplificadas de LsUFO y TbUFO son ortólogos de UFO. (Figura 6.3.1.2).

Para determinar los porcentajes de similitud de LsUFO respecto a otras embriofitas se generó una matriz (Apéndice 7; Tabla A.7.2). En el caso de las secuencias de referencia de monocotiledóneas sólo se comparó la región compartida entre éstas y LsUFO. Los análisis de similitud se enfocaron en la caja F, cuya función es la de proveer de sustrato específico al complejo SCF para su ubiquitilación y posterior degradación vía proteosoma 26S (Craig & Tyers, 1999). Además se comparó otra sección para la cual se tenía información, dado lo incompleto de las secuencias encontradas en el NCBI. Dicha región va del aminoácido 110 al 354 (Apéndice 7; Tabla A.7.2).

La secuencia de aminoácidos de la caja F en LsUFO presenta una alta similitud con las otras embriofitas analizadas; $x \geq 53.1\%$, teniendo el mayor porcentaje de similitud con *Misopates* (73.5%), seguida de *Antirrhinum* con un 71.4% de similitud. Es importante señalar que a

nivel de la caja F, LsUFO presenta una mayor similitud con dicotiledóneas que con monocotiledóneas. De éstas últimas, con la que presenta una mayor similitud es con APO1 de *O. sativa* (63.3%).

6.3.2 Dominios conservados: Caja F

En la literatura se encontró una secuencia consenso para la caja F inferida a partir de la comparación de varias proteínas de esta familia pertenecientes a organismos muy variados (Gagne, *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta este trabajo no se tenía referencia de una secuencia consenso de la caja F para homólogas de UFO. Con el fin de determinar la región correspondiente a la caja F para esta proteína, se realizó una búsqueda en la base de datos PROSITE (Sigrist *et al.*, 2010) <http://prosite.expasy.org/>, en la que se identificó este motivo con una longitud variable de 47 a 50 aminoácidos en Pfam (Pfam00646) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/pssm/pssm_viewer.cgi?cd=pfam00646&mode=Position), la longitud de dicha caja fue finalmente refinada a 49 aminoácidos. Este fragmento contiene dos aminoácidos característicos de cajas F: una lisina (L) y una prolina (P) en la posición 6 y 7 respectivamente (Gagne *et al.*, 2002; este trabajo).

Los resultados aquí descritos deben ser corroborados una vez que se tenga información de más ortólogos de UFO en un número mayor de angiospermas, sobre todo de monocotiledóneas no-poáceas.

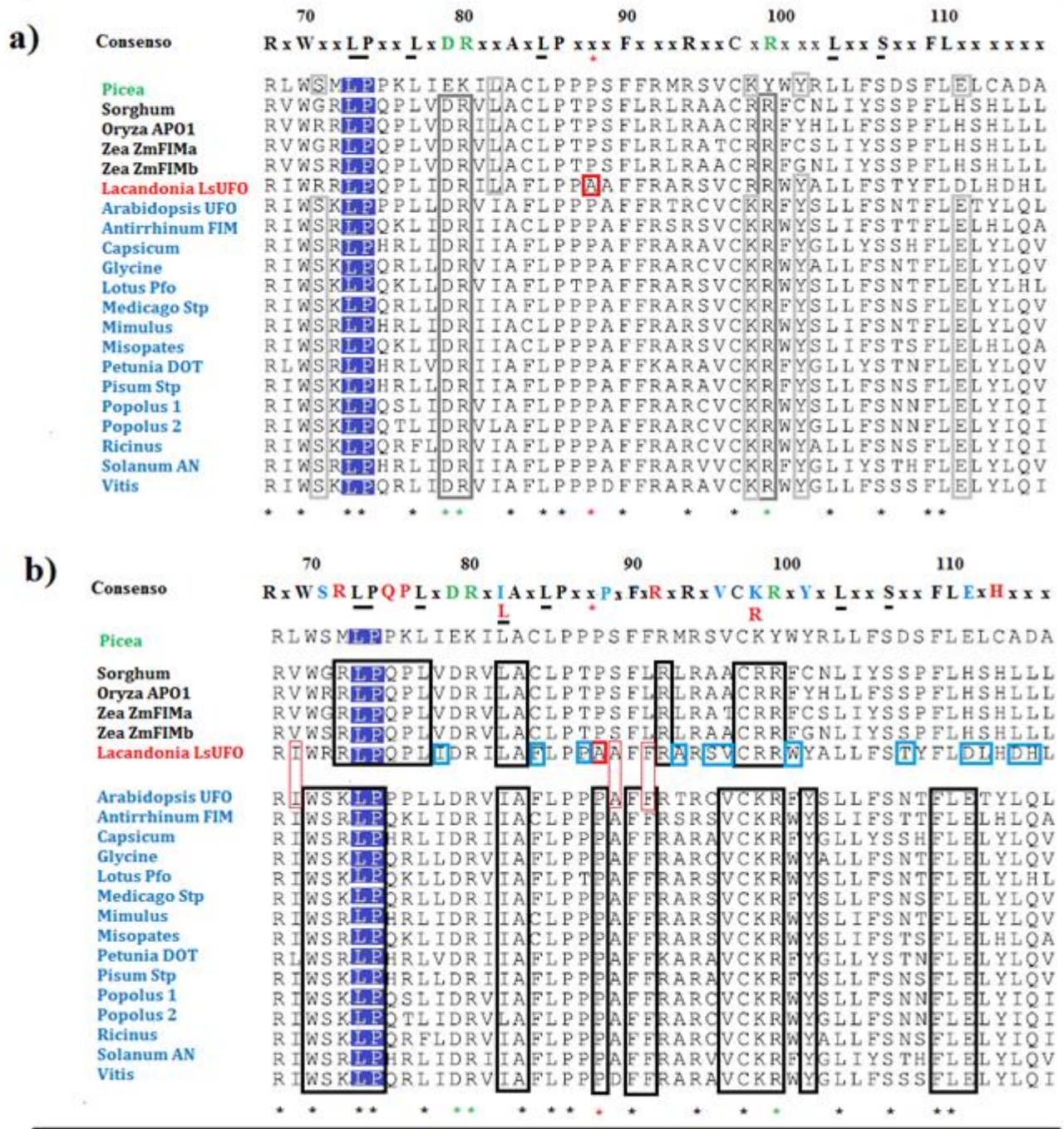
En la Figura 6.3.2.1, mediante un análisis comparativo de los residuos presentes en las secuencias de UFO comparadas, se encontraron aquellos aminoácidos que definen al grupo de las embriofitas (aminoácidos en verde de la secuencia consenso). Además se identificaron aminoácidos que definen al grupo de las angiospermas (cajas gris oscuro), así como aminoácidos compartidos entre gimnospermas y monocotiledóneas o gimnospermas y dicotiledóneas (cajas gris claro).

En la Figura 6.3.2.1 también se detallan sobre la secuencia consenso los aminoácidos que definen a cada grupo: embriofitas, gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Así como sitios muy conservados que diferencian monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se encontraron en particular dos sitios donde hay aminoácidos que definen y diferencian los

grupos de las angiospermas: (L-82) y (R-98); en monocotiledóneas (I-82) y en dicotiledóneas (K-98).

La caja F de LsUFO presenta varios aminoácidos que no están presentes en ningún otro grupo de embriofitas en dicha posición y otros 12 aminoácidos únicos para el clado de los ortólogos de UFO en monocotiledóneas. Por otro lado destacan tres aminoácidos en LsUFO que son específicos para dicotiledóneas. Finalmente en LsUFO resalta el hecho de presentar el aminoácido A88 (aminoácido no polar) mientras que el resto de las embriofitas tienen P88 (aminoácido hidrofóbico). En términos generales, la caja F de LsUFO presenta mayor similitud con dicotiledóneas que con monocotiledóneas.

Análisis comparativo de la caja F de homólogos de UFO



Gimnospermas
 Monocotiledóneas: *Lacandonia* y *Triuris*
 Dicotiledóneas

Figura 6.3.2.1. Alineamiento de aminoácidos pertenecientes a la caja F de homólogos de UNUSUAL FLORAL ORGANS en espermatofitas. En azul se resaltan los dos residuos de aminoácidos más conservados en todas las

cajas F comparadas; la leucina y la prolina en la posición 6 y 7, respectivamente (Jonkers & Rep, 2009). a) Las cajas grises indican aminoácidos conservados dentro del grupo de las angiospermas. b) Las cajas negras indican sitios conservados que definen a la caja F en ortólogos de dicotiledóneas y monocotiledóneas respectivamente. Las cajas rojas, resaltan aminoácidos que varían de forma única en LsUFO mientras que éstos se encuentran conservados para el resto de los ortólogos de embriofitas analizados en este trabajo. Los rectángulos rojos de líneas delgadas resaltan los aminoácidos de LsUFO que no se encuentran en los ortólogos de monocotiledóneas analizadas y que son definitorios para los ortólogos de dicotiledóneas. Las cajas azules son aminoácidos que no están presentes en ortólogos de otras monocotiledóneas estudiadas. En la secuencia consenso los aminoácidos subrayados son aquellos conservados respecto a la secuencia consenso de la caja F. El dominio Pfam00646 fue obtenido de Pfam (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/pssm/pssm_viewer.cgi?cd=pfam00646&mode=Position). El color de los aminoácidos indica el grupo al que define un aminoácido particular presente en determinada posición de los ortólogos estudiados. Negro: espermatofitas, verde: angiospermas, azul: dicotiledóneas y rojo: monocotiledóneas. En la parte inferior, los asteriscos negros señalan aminoácidos conservados en embriofitas, los verdes en angiospermas y los rojos señalan aminoácidos que varían únicamente en LsUFO.

6.3.3 Relaciones evolutivas

Para esclarecer las relaciones evolutivas de los homólogos de LsUFO se construyeron dos árboles filogenéticos enraizados (Figura 6.3.3.1). El primero se generó con la región de las secuencias en las que había información para todos los homólogos de LsUFO (aminoácido 110 al 354). El segundo árbol se generó utilizando toda la información –incluida la caja F en el extremo amino terminal– de las secuencias obtenidas del NCBI, aún cuando la mayoría de las secuencias de los ortólogos de Poales y la de *T. brevistylis* son parciales (ver alineamiento de Figura 6.3.1.1). Ambos árboles filogenéticos recuperados están en concordancia con la filogenia de las angiospermas en cuanto a recuperar dos grupos principales: las monocotiledóneas y las dicotiledóneas. Y en ambos árboles se recupera la posición de LsUFO y TbUFO dentro de los homólogos de monocotiledóneas.

Es imprescindible realizar estos análisis nuevamente una vez que: 1. se tenga un mayor número de secuencias que estén completas, sobre todo de monocotiledóneas más cercanas a Triuridaceae, 2. que las secuencias parciales que ya se tienen de poales se completen. LsUFO y TbUFO quedan agrupados en el clado de los ortólogos de UFO de monocotiledóneas, pero como grupo hermano a las poales. Además, la tasa de sustitución de LsUFO y TbUFO parece ser mayor a la de los otros taxones analizados.

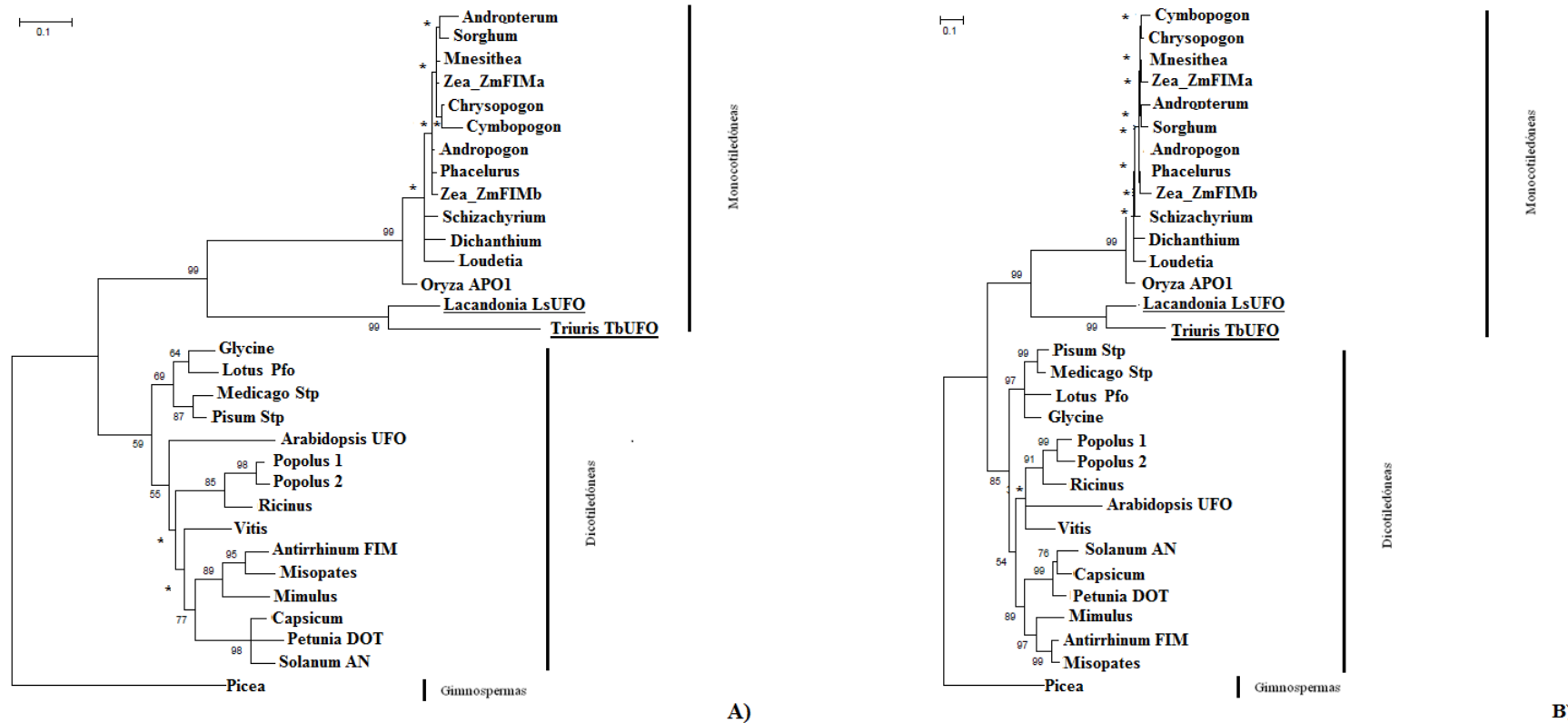


Figura 6.3.3.1. Análisis de relaciones evolutivas de UFO generadas por el método de máxima verosimilitud. A) Árbol reconstruido utilizando la región para la que había información para todas las de los taxones incluidos. El árbol fue inferido a partir de 1000 réplicas. Se utilizó una distribución discreta Gamma para modelar la diferencia en las tasas evolutivas entre sitios (parámetro = 1.3236). Se consideraron 246 posiciones en el juego de datos final. Los análisis evolutivos fueron construidos en MEGA (Tamura et al. 2011). B) Árbol reconstruido utilizando todas las secuencias disponibles. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo JTT (Jones, et al. 1992). El árbol fue inferido a partir de 1000 réplicas. Se utilizó una distribución discreta Gamma para modelar la diferencia en las tasas evolutivas entre sitios (parámetro = 1.2654). Todas las posiciones ambiguas se removieron para cada par de secuencias. Se consideraron 539 posiciones en el juego de datos final. Los análisis evolutivos fueron construidos en MEGA (Tamura *et al.*, 2011). En ambos árboles el análisis involucra 31 secuencias de aminoácidos. De lado izquierdo se muestran los valores de confianza obtenidos por remuestreo (bootstrap value) donde los asteriscos indican valores menores a 50. Los árboles están dibujados a escala, con la longitud de las ramas proporcionales al número de sustituciones por sitio. Todas las posiciones ambiguas fueron removidas para cada par de secuencias.

6.3.4 Diseño de sonda de *LsUFO* y patrones de expresión de ortólogos de *UFO* en angiospermas

Con el fin de diseñar una sonda gen-específica para *LsUFO*, se alineó esta secuencia con los cuatro parálogos *UFO*-like encontrados en el transcriptoma y se buscó un sitio poco conservado entre ellas para hacer una sonda específica de *LsUFO*. Como se mencionó en el apartado de metodología fue necesario elegir una región de la secuencia que no contuviera la caja F, ya que esta región está representada en otras proteínas de la misma familia, para evitar falsos positivos en la hibridación *in situ* (Figura 6.3.4.1).

La sonda de 150 nucleótidos quedó anotada en el extremo C-terminal de *LsUFO*, que además de ser una región variable presenta sitios con inserciones de longitud importante que impedirían que la sonda hibride con los parálogos de *LsUFO*. Además se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 6.3.4.1) para su amplificación a partir de la secuencia previamente introducida en vector de clonación, como se detalla en métodos.

LsUFO-like1	T-CAT-TGAGGTCAAGGCGGATGAACCGTCTGGTGGCCTATGAC--TTCTCAGATGGTAA 1130
LsUFO-like2	TACATACAGAGCTACGGAGCTCCAGC--TCTGCTTGTCTTTGACATGAGCCACAAGG--T 1115
LsUFO-like3	TACATACAGAGTTACGGGTCGTCAGC--TCTCCTAATGTTGATATTCTCTGAAGC--A 1115
LsUFO-like4	C-CTCATGGAACCAAGGG-----AAGGGTCTACT---TTATGATGTTGATAGAAAGG--C 980
LsUFO	C-AATGTG CGGTTCTGTG-----GACGTTTTGCT---TTTGACTTGGAGAGGAAGC--A 1061
	* * * * *
LsUFO-like1	GTGGCAGAGGGT-GCCTGATCCCC--TA-----GTGAAAG-----GAA--AAGG----C 1171
LsUFO-like2	GTGGAAATGGTC-ATTGAAATGCC--T-----GTGAC-----AAA--GAGATTTC 1157
LsUFO-like3	ATGGAAATGGGC-GGTAAGTGCC--T-----GTTTC-----GAA--GCGGTTTC 1157
LsUFO-like4	TTGGTCGTGGATTGCTG-GCTGCGCACTGCAATTGTGCA-----ATAG-T--C 1024
LsUFO	GTGGAGATGGGT-GCCACGGTGCCATT--AACCGCCACGGAGGGGAAATGTGGCT--C 1116
	*** ** * * *
LsUFO-like1	ACTG-GATGGCTTGT--GGTA-----CTGCATT--TG--ATCC--ATGCC 1208
LsUFO-like2	GCTTCAACTITTTACTGGGT-----TTGC-TT--TG--AACC--AAGGCT 1196
LsUFO-like3	TCTGCAGCTATTCACAGGGT-----TTGT-TT--CG--AGCC--CCATCT 1196
LsUFO-like4	AGGTTAGT-TTCTAT-GAGCC-----CCGC-TT--TGATA-----CCT 1057
LsUFO	AGAGGGATGTCTAC-GAGCCACAGCTTGGGACGCCGC-TTATTGGGAGCTTTGTTCCA 1174
	* * * * *
LsUFO-like1	CACTGCTTTGCC-TTG-A----- 1224
LsUFO-like2	TGAGGCTCTATC-CTG-AI----- 1213
LsUFO-like3	TGACG-TGGATAGCTG-AI----- 1213
LsUFO-like4	CAGTA-T-----ACTG-A----- 1068
LsUFO	CGGCA-ICTGTCAATTGCAAATTTGTAA 1200
	* ** *

Figura 6.3.4.1. Alineamiento de parálogos de *LsUFO*. La caja negra muestra la sección correspondiente a la sonda diseñada para trabajos de hibridación *in situ*.

Sequense (5'->3')	Sonda	Tamaño (pb)	Orientación	Tm (°C)	Longitud (pb)
GAACGAGTGGTCGAAAATCAAGC	LsUFO	109	Sentido	55.3	23
CTTAGCTTTCTCCACTGCAGCC			Antisentido	56.7	22

Tabla 6.3.4.1. Oligonucleótidos propuestos para la amplificación de las sondas síntesis de cDNA de las sondas sentido y antisentido de de *LsUFO*, *LsLFY* y *TbLFY1*

6.3.5 Posibles patrones de expresión de *LsUFO* con base en lo conocido en otras angiospermas y su posible relación con la arquitectura de la inflorescencia.

El resolver los patrones de expresión *in situ* de *LsUFO* será fundamental para reflexionar en torno a si éstos se ajustan a lo documentado en especies como *O. sativa*, *A. majus* o si son más similares a lo observado en *A. thaliana*. También existe la posibilidad de que *LsUFO* presente un patrón de hibridación *sui generis*, donde sólo se exprese en el centro del meristemo floral y que por lo tanto, sea el factor que sesgue la expresión de *LsAP3* y el posterior desarrollo central de estambres en *L. schismatica*, como ha sido sugerido anteriormente (Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b; Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Figura 6.3.5.1).

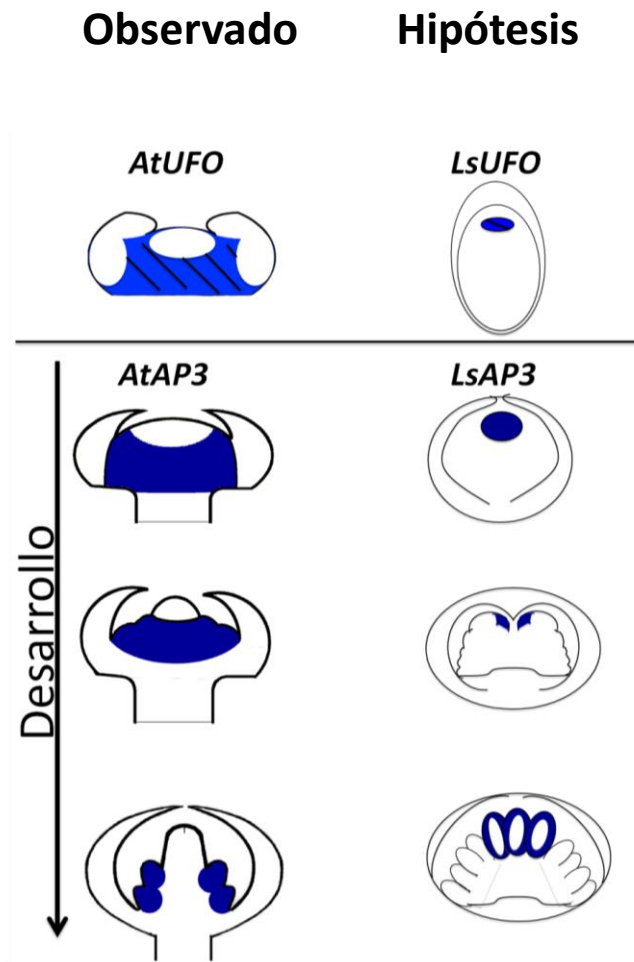


Figura 6.3.5.1. En *Arabidopsis* *LFY* se expresa por todo el meristemo floral y *UFO* restringe la expresión de *AP3* (azul oscuro), al expresarse en los verticilos dos y tres (azul claro). De acuerdo a la hipótesis propuesta por Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b, en *Lacandonia schismatica* la expresión de *LFY* (blanco) tendría lugar por todo el meristemo y la expresión de *UFO* (azul claro) quedaría confinada al verticilo central en el cuarto verticilo donde coinciden la expresión de *LFY* y *UFO* y por lo tanto el gen *LsAP3* puede ser activado (azul oscuro). Las regiones donde coincide la expresión de *LFY* y *UFO* y en consecuencia donde *AP3* puede ser activado y llevarse a cabo la función B se señalan con líneas negras diagonales. Modificado de Álvarez-Buylla *et al.*, 2010b.

Por otro lado si bien la filogenia de *LsUFO* va acorde con la filogenia de especies conocida (es decir, *LsUFO* se agrupa claramente con ortólogos de monocotiledóneas), la caja F de *LsUFO* presenta una mayor similitud con los ortólogos de algunas dicotiledóneas como *Arabidopsis*.

A nivel de estructura del gen, también hay un mayor parecido con *UFO* -el cual carece de intrones al igual que *LsUFO* que con *AP01*. Lo anterior podría sugerir que desde el punto de vista funcional, *LsUFO* regula a *LsAP3* y otros genes blanco de manera más similar a lo

documentado en dicotiledóneas que en monocotiledóneas (APO1). Sin embargo, esta sugerencia habrá que corroborarla experimentalmente, ya que *FIM* de *Antirrhinum* además de regular a los genes B también regula a los C.

Por otro lado, en la petunia la expresión constitutiva de *ALF* (el ortólogo de *LFY*) y *DOT* es suficiente para activar los genes B, C, D y E en brotes florales. El papel de activación de genes B y C es consistente con la función de *FIM* (Souer *et al.*, 2008; Ingram *et al.*, 1997). Por otro lado, en el chícharo el ortólogo de UFO, Stamina pistilloidea (*Stp*), es requerido para el desarrollo normal de pétalos y estambres, sugiriendo que *Stp* regula la función B (Simon *et al.*, 1994) como sucede en UFO. Además, en este último ejemplo la producción normal de carpelos en mutantes *stp* posiblemente refleja una producción temprana del primordio carpelar o la inhabilidad de *Stp* para regular genes homeóticos de clase C (Taylor *et al.*, 2001).

	Especie	Ortólogo	Regulación de función B	Regulación de función C	Referencia
<i>Monocots</i>	<i>Oryza sativa</i>	APO1	-	√	Ikeda <i>et al.</i> 2007
<i>Dicots</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	UFO	√	-	Ingram <i>et al.</i> 1995
	<i>Antirrhinum majus</i>	FIM	√	√	Simon <i>et al.</i> 1994
	<i>Petunia x hybrida</i>	DOT	√	√	Souer <i>et al.</i> 2008
	<i>Lotus japonicus</i>	Pfo	√	-	Zhang <i>et al.</i> 2003
	<i>Pisum sativum</i>	Stp	√	-	Taylor <i>et al.</i> 2001

Tabla 6.3.5.1. Regulación de los genes de clase B y/o C por UFO y sus homólogos.

Por último, la divergencia en cuanto a las actividades regulatorias de ortólogos de UFO en diferentes linajes de angiospermas (Tabla 6.3.5.1), quizá esté más relacionado con el tipo de inflorescencia existente (que en términos generales se pueden dividir en inflorescencias

determinadas o cimosas vs indeterminadas o racemosas). En este sentido, hay evidencia que sugiere que desde una perspectiva evolutiva, los tipos de inflorescencia existentes pueden estar relacionados unos con otros a través de cambios en los genes encargados de la regulación espacio-temporal del desarrollo del meristemo floral, así como con el agotamiento (o no) del meristemo de inflorescencia (Rijkema *et al.*, 2010). En este sentido, *Oryza* tiene una panícula (inflorescencia determinada) mientras que *Lacandonia* y *Arabidopsis* tienen racimos (inflorescencias indeterminadas (Prusinkiewicz, *et al.*, 2007).

7. CONCLUSIONES

LEAFY (LsLFY)

- Se caracterizó un ortólogo de LFY para *L. schismatica* (LsLFY). En la secuencia genómica parcial amplificada de LsLFY se encontraron un intrón y dos exones. Es necesario completar la amplificación de este gen para determinar si existen otros intrones.
- Se caracterizaron dos parálogos parciales para *T. brevistylis* (TbLFY1 y TbLFY2). Estudios anteriores demostraron la existencia de dos genes parálogos de AP3 en *T. brevistylis* (Cappello *et al.*, sin publicar, citado en: Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Estos datos podrían sugerir la creación de nuevos módulos en la red de regulación floral descrita en *Arabidopsis*, que podría estar relacionada con homeosis documentada ocasionalmente en algunas plantas de *T. brevistylis*.
- La mayoría de las sustituciones encontradas en homólogos de LFY de *L. schismatica* y *T. brevistylis* se encuentran en el dominio de unión a DNA (dominio C terminal), el cual se ha propuesto como fuente de evolución de este factor de transcripción. Lo anterior permite sugerir que LsLFY, TbLFY1 y TbLFY2 podrían tener funciones distintas a las descritas para otros ortólogos de este gen en angiospermas. Es posible que las sustituciones encontradas modifiquen el plegamiento de la proteína y con ello su actividad bioquímica.
- Estudios anteriores para LFY de *Arabidopsis* respaldan la hipótesis de que algunos de los sitios en los que difieren LsLFY, TbLFY y TbLFY2 del resto de las angiospermas son importantes para la complementación de la actividad de ortólogos de *lfy* en mutantes de *Arabidopsis*. En experimentos posteriores deberá comprobarse si estas mutaciones pueden favorecer una interacción novedosa con otras proteínas regulatorias como UFO o AP3 y si dichas interacciones están relacionadas con el fenotipo homeótico de *Lacandonia*.

UNUSUAL FLORAL ORGANS (LsUFO)

- Se caracterizó un ortólogo de *UFO* para *L. schismatica* y *T. brevistylis*, respectivamente. Ambas secuencias comparten un 72.1% de similitud.
- A nivel estructural, el gen *LsUFO* carece de intrones, de forma similar a *UFO* de *Arabidopsis* y en contraste con *APO1* de *O. sativa*, que presentan dos exones y un intrón. Este gen, así como su transcrito tiene un tamaño de 1,197 pb. La proteína de *LsUFO* es de 399 aminoácidos.
- Los ortólogos de *LsUFO* y *TbUFO* constituyen un pequeño clado con *UFO*, *FIM*, *APO1*, *DOT*, *STP* y *PFO*. Este pequeño grupo de proteínas están implicadas en el desarrollo floral. Los ortólogos de ambas triuridáceas se agrupan dentro del clado de homólogos de monocotiledóneas.
- Se caracterizó la caja F en la porción N-terminal de *LsUFO*. La información de esa región para la secuencia de *TbUFO* no se encuentra disponible pero su alta homología con otras proteínas como *LsUFO* en la región en la que se obtuvo información a partir del transcriptoma sugiere que ambas podrían regular la identidad de los órganos florales y la determinación del meristemo floral mediante el marcaje de proteínas para su degradación.
- La secuencia de aminoácidos de *LsUFO* a nivel de la caja F presenta una alta homología con dicotiledóneas y a nivel de estructura genómica presenta un mayor parecido con *UFO* de *Arabidopsis* que con *APO1* de *O. sativa* lo que podría sugerir que *LsUFO* regula a genes B o a genes B y C como sucede en dicotiledóneas, en contraste con la regulación exclusiva de genes C por parte de *APO1*.
- Las sustituciones novedosas de aminoácidos en la caja F, podrían sugerir una divergencia bioquímica de *LsUFO*, respecto a lo reportado para otras embriofitas. E indicar la capacidad de interactuar con posibles blancos novedosos que actúan como sustratos específicos en el complejo SCF, el cual marca proteínas para su degradación mediada por el proteosoma. En relación al fenotipo homeótico de *Lacandonia schismatica*, es posible que estos nuevos blancos sean reguladores negativos de *LsAP3*.

CONCLUSIONES GENERALES

- En este análisis exploratorio hay pruebas sugerentes de que la regulación en *trans* de *LsAP3* es la base molecular que subyace el fenotipo homeótico de *Lacandonia schismatica*
- Las modificaciones encontradas a nivel de secuencia de aminoácidos en LsLFY, LsUFO, TbLFY1 y TbLFY2 podrían estar relacionados con cambios en la red de regulación genética, así como ser el prerrequisito para el reclutamiento y/o la interacción de nuevas proteínas blanco que estén relacionadas con el fenotipo homeótico de *L. schismatica*.

8. PERSPECTIVAS

Con base en lo descrito en el presente trabajo, se proponen realizar y/o concluir los siguientes experimentos con el fin de avanzar el conocimiento del papel de los ortólogos de UFO y LFY en el fenotipo homeótico de *L. schismatica* y en las flores atípicas de *T. brevistylis*:

- Completar la amplificación de *LsLFY* hacia el extremo 5' terminal y de los ortólogos de *LFY* en *Triuris brevistylis*, así como de *TbUFO*.
- Contrastar la propuesta previa del papel que el patrón de expresión espacio-temporal de *UFO-LFY* pueda tener en el desarrollo de estambres centrales en *L. schismatica* (Pineyro-Nelson *et al.*, 2010; Garay-Arroyo *et al.*, 2012) con los patrones que se documenten mediante ensayos de hibridación *in situ* de *LFY* y *UFO* en *Lacandonia schismatica* y *Triuris brevistylis*.
- Realizar ensayos de complementación con los ortólogos de *LFY* y *UFO* de estas triuridáceas mexicanas en líneas mutantes de *ufo* y *lfy* en *Arabidopsis*, para determinar si su función bioquímica se encuentra conservada.
- Dada la poca información sobre ortólogos de *UFO*, sobre todo en monocotiledóneas es importante clonar más ortólogos de este gen en otros linajes de este clado con el fin de realizar análisis funcionales que ayuden a determinar si existe una conservación funcional de este gen a lo largo de las angiospermas y si éste es capaz de modificar la estructura floral de diferentes linajes de plantas con flor. Además, dado que se ha observado que los ortólogos de *UFO* son capaces de activar diferentes genes homeóticos, deben hacerse análisis para determinar si esto se debe a posibles modificaciones en las afinidades de unión a sus promotores y/o de sus proteínas blanco.
- Determinar el número de ortólogos y el patrón de expresión de *AP3* y *LFY* en otros miembros de la tribu Triuridae para analizar si hay una correlación entre el número de duplicaciones en estos genes con el fenotipo de *Lacandonia schismatica*.
- Identificar si los dos parálogos de *TbLFY* son funcionales y su papel en el desarrollo floral de *T. brevistylis*.

- Determinar si las mutaciones encontradas en el presente trabajo en la secuencias de aminoácidos de TbLFY1, TbLFY2 y LsLFY pueden afectar el plegamiento y función de este factor de transcripción, mediante la determinación de la estructura tridimensional de éstas proteínas.
- Realizar ensayos de mutagénesis dirigida en la secuencia de UFO y LFY de *Arabidopsis*, para evaluar el efecto que tienen las mutaciones puntuales encontradas en la caja F de LsUFO y en los dominios de dimerización y de unión a DNA en LsLFY, TbLFY1 y TbLFY2 en interacciones proteína-proteína y proteína-DNA mediante ensayos de uno, dos o tres híbridos en levadura.

9. REFERENCIAS

- Aagaard, J. E., Olmstead, R. G., Willis, J. H. & Phillips, P. C. (2005). Duplication of floral regulatory genes in the Lamiales. *American journal of botany*, 92:1284-93.
- Álvarez-Buylla E. R., Benítez-Keinrad M., Corvera-Poiré A., Cador, Á. C., Folter, S. D., Buen, A. G. D., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruíz, R. & Piñeyro-Nelson, A. (2010a). Flower development. En: *The Arabidopsis book USA: ASPB*, 1–57.
- Álvarez-Buylla, E. R., Ambrose, B. A., Flores-Sandoval, E., Englund, M., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., de la Torre-Bárcena, E., Matías, S., Martínez, E., Piñeyro-Nelson A., Engström, P. & Meyerowitz, E. (2010b). B-function expression in the flower center underlies the homeotic phenotype of *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae). *The Plant Cell*, 22:3543-59.
- Ambrose B. A., Espinosa-Matías S., Vázquez-Santana S., Vergara-Silva F., Martínez E., Márquez-Guzmán J. & Álvarez-Buylla E. R. (2006). Comparative developmental series of the Mexican triurids support a euanthial interpretation for the unusual reproductive axes of *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae). *American Journal of Botany* 93:15-35.
- Amoutzias, G. D., Robertson, D. L. & Bornberg-Bauer, E. (2004). The evolution of protein interaction networks in regulatory proteins. *Comparative and Functional Genomics*, 5:79-84.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Society*, 105-121.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W. & Elledge, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 86:263-74.
- Becker, A. & Theissen, G. (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29:464-489.
- Blázquez, M a, Soowal, L. N., Lee, I., & Weigel, D. (1997). LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development*, 124:3835-44.

- Blázquez, M. A. & Weigel D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*. 404:889-92.
- Bombliès, K.** (2003). Duplicate FLORICAULA/LEAFY homologs zfl1 and zfl2 control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development*, 130:2385-2395.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. & Meyerowitz, E. M.** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1:37-52.
- Buzgo M, Soltis P. S., Kim S. & Soltis D. E.** (2005). The making of the flower. *Biologist* 52: 149–154
- Chae, E., Tan, Q. K.-G., Hill, T. A. & Irish, V. F.** (2008). An *Arabidopsis* F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. *Development*, 135:1235-45.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)** (2006) Protocolos de laboratorio. <http://www.cimmyt.org/spanish/docs/manual/protocols/Lab-geneticaMolecular.pdf>.
- Coen, E. S. & Meyerowitz, E. M.,** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31–37.
- Craig, K. L. & Tyers, M.** (1999). The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72:299-328.
- Davis, J. I., Stevenson, D., Petersen, G., Seberg, O., Campbell, L. M., Freudenstein, J. V., Goldman, D. H., Hardy, C. R., Michelangeli, F. A., Simmons, M. P., Specht, C. D., Vergara-Silva, F. & Gandolfo, M.** (2004). A Phylogeny of the Monocots, as Inferred from *rbcL* and *atpA* Sequence Variation, and a Comparison of Methods for Calculating Jackknife and Bootstrap Values. *Systematic Botany*, 29:467-510.
- Deshaies, R. J.** (1999). SCF and Cullin/RING H2-Based Ubiquitin Ligases *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 15:435-67.
- Dietrich M. R.** (2000). From hopeful monsters to homeotic effects: Richard Goldschmidt's integration of development, evolution, and genetics. *American Zoologist* 40:738–747.
- Durfee, T., Roe, J. L., Sessions, R. A., Inouye, C., Serikawa, K., Feldmann, K. A., Weigel, D. & Zambryski, P. C.** (2003). The F-box-containing protein UFO and AGAMOUS participate in antagonistic pathways governing early petal development in

Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 8571-6.

Ferrandiz-Maestre, C. (1996). Morfogénesis floral de mutantes homeóticos de *Pisum sativum* L. Aislamiento y caracterización molecular de genes de la familia MADS. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. pp92.

Flores-Sandoval, E. (2007). Conservación funcional parcial de los genes de la función B de *Lacandonia schismatica* en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México pp 3-29.

Frohlich, M. W. (2003). An evolutionary scenario for the origin of flowers. *Nature reviews. Genetics*, 4:559-66.

Gagne, J. M., Downes, B. P., Shiu, Shan, Durski, A. M. & Vierstra, R. D. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:11519-11524.

Gandolfo, M. A. (2004) Triuridaceae. En: Smith, N., Mori, S.A., Henderson, A., Stevenson, D.W. & Heald, S.V. (eds.). Flowering plants of the Neotropics. *Princeton University Press*, New Jersey, 487–488.

Garay-Arroyo, A., Piñeyro-Nelson, A., García-Ponce, B., Sánchez, M. D. L. P. & Álvarez-Buylla, E. R. (2012). When ABC becomes ACB. *Journal of Experimental Botany*, 63:2377-95.

Hamès, C., Ptchelkine, D., Grimm, C., Thevenon, E., Moyroud, E., Gérard, F., Martiel, J., Benloch, R., Parcy, F. & Müller, C. W. (2008). Structural basis for LEAFY floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins. *The EMBO journal*, 27: 2628-37.

Hepworth, S. R., Klenz, J. E. & Haughn, G. W. (2006). UFO in the Arabidopsis inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. *Planta*, 223:769-78.

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

- Horwitz, A., Affar, E. B., Heine, G. F., Shi, Y. & Parvin, J. D.** (2007). A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:6614-9.
- Ikeda, K., Ito, M. & Nagato, Y.**, (2007). Rice ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1, encoding an F-box protein, regulates meristem fate. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*,51:1030-40.
- Ikeda, K., Nagasawa, N. & Nagato, Y.** (2005). ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1 temporally regulates meristem identity in rice. *Developmental Biology*, 282:349-60.
- Ikeda-Kawakatsu, K., Maekawa, M., Izawa, T., Itoh, J. & Nagato Y.** (2012). ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 2/RFL, the rice ortholog of Arabidopsis LEAFY, suppresses the transition from inflorescence meristem to floral meristem through interaction with APO1. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 69:168-80.
- Ingram, G. C., Goodrich, J., Wilkinson, M. D., Simon, R., Haughn, G. W. & Coen, E. S.** (1995). Parallels between UNUSUAL FLORAL ORGANS and FIMBRIATA, genes controlling flower development in Arabidopsis and Antirrhinum. *The Plant Cell*, 7:1501-10.
- Jones D. T., Taylor W. R. & Thornton J. M.** (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*. 8: 275-82.
- Jonkers, W., & Rep, M.** (2009). Lessons from fungal F-box proteins. *Eukaryotic Cell*, 8:677-95.
- Kipreos, E. T. & Pagano, M.** (2000). Protein family review: The F-box protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 1:3002.1–3002.7
- Krizek, B. A. & Meyerowitz, E. M.** (1996). The Arabidopsis homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*, 122:11-22.
- Lamb, R. S., Hill, T. A, Tan, Q. K. G. & Irish, V. F.** (2002). Regulation of APETALA3 floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development*, 129:2079-86.
- Laufs, P.** (2003). Separable roles of UFO during floral development revealed by conditional restoration of gene function. *Development*, 130:785-796.

- Lee, I., Wolfe, D. S., Nilsson, O. & Weigel, D.** (1997). A LEAFY co-regulator encoded by UNUSUAL FLORAL ORGANS. *Current Biology*, 7:95-104.
- Levin, J. Z., & Meyerowitz, E. M.** (1995). UFO: an Arabidopsis gene involved in both floral meristem and floral organ development. *The Plant cell*, 7:529-48.
- Lippman, Z. B., Cohen, O., Alvarez, J. P., Abu-Abied, M., Pekker, I., Paran, I., Eshed, Y. & Zamir, D.,** (2008). The making of a compound inflorescence in tomato and related nightshades. *PLoS Biology*, 6:e288.
- Liu, C., Thong, Z. & Yu, H.** (2009). Coming into bloom: the specification of floral meristems. *Development*, 136:3379-91.
- Lohmann, J.U. & Weigel, D.,** (2002). Building beauty: the genetic control of floral patterning. *Developmental Cell*, 2:135-42.
- Long, J. A. & Barton, M. K.** (1998). The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development*, 125:3027-35.
- Maas, Rübsamen T.** (1986) Triuridaceae. En: Flora Neotropica, Vol. 40/42, *Saprophytes Pro Parte*, New York Botanical Garden Press, USA, pp55.
- Maas-van de Kamer, H. & Weustenfeld, T.** (1998) Triuridaceae. In: Kubitzki, K. (ed.), The families and genera of vascular plants vol. 3. Springer, Germany, pp. 452–458.
- Maas-van de Kamer, H.** (1995). Triuridiflorae Gardner’s delight? In Monocotyledons: Systematics and Evolution, P.J. Rudall, P.J. Cribb, D.F. Cutler, and C.J. Humphreys, eds (London: Kew-Royal Botanic Gardens), pp. 287–301.
- Maas-van der Kamer H, & Maas P.** 1994. Triuridopsis, a new monotypic genus in Triuridaceae. *Plant Systematics & Evolution*. 192, 257–262.
- Maizel, A., Bush, M., Tanahashi, T., Perkovic, J., Kato, M., Hasebe, M. & Weigel, D.** (2005). The Floral Regulator LEAFY Evolves by Substitutions in the DNA Binding Domain. *Science*, 308:260-263.
- Márquez-Guzmán, E., Engleman, E. M., Martínez-Mena, A., Martínez, E., Ramos C.** (1989). Anatomía reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76:124–127.
- Martínez E. & Ramos C. H.** (1989). Lacandoniaceae (Triuridales), a new family of Mexican plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76:128–135.
- Martínez E. & Gómez L. D.** (1994) Triuridaceae/Lacandoniaceae. En: Davidse, G., Sousa,

- M., Chater, A., (eds.). Flora Mesoamericana. Vol 6. Alismataceae a Cyperaceae. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp 18–19.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, a, Lenhard, M., Jürgens, G. & Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, 95:805-15.
- McKim, S. & Hay, A.** (2010) Patterning and evolution of floral structures marking time. *Current Opinion in Genetic Development*.20:448-53.
- Mellerowicz, E. J., Horgan, K., Walden, A., Coker, A. & Walter, C.** (1998). PRFLL a *Pinus radiata* homologue of FLORICAULA and LEAFY is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta*, 206: 619-29.
- Mellerowicz, E. J., Horgan, K., Walden, a, Coker, a, & Walter, C.** (1998). PRFLL a *Pinus radiata* homologue of FLORICAULA and LEAFY is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta*, 206:619-29.
- Melo, A. & Alves, M.** (2012). The discovery of *Lacandonia* (Triuridaceae) in Brazil. *Biologia*, 25:21-25.
- Mouradov, E., Glassick, T., Hamdorf, B., Murphy, L., Fowler, B., Marla, S. & Teasdale, R. D.** (1998). NEEDLY, a *Pinus radiata* ortholog of FLORICAULA/LEAFY genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95:6537-42.
- Mouradov, E., Tichtinsky, G. & Parcy, F.,** (2009). The LEAFY Floral Regulators in Angiosperms: Conserved Proteins with Diverse Roles. *Journal of Plant Biology*. 52:177-185.
- Nam, J., de Pamphilis, C. W., Ma, H. & Nei, M.** (2003). Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants. *Molecular Biology and Evolution* 20:1435-47.
- Ni, W., Xie, D., Hobbie, L., Feng, B., Zhao, D., Akkara, J. & Ma, H.** (2004). Regulation of Flower Development in Arabidopsis by SCF Complexes. *Plant Physiology*, 134:1574-1585.
- Parcy, F., Nilsson O., Busch, M A., Lee, I. & Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning, *Nature*, 395:561-6.

- Parcy, F.** (2005). Flowering: a time for integration. *The International Journal of Developmental Biology*, 49:585-93.
- Pelaz, S., Ditta, G. S. & Yanofsky, M. F.** (2000). B and C Floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405, 9-12.
- Pelaz, S., Tapia-López, R., Álvarez-Buylla, E. R., & Yanofsky, M. F.** (2001). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 11:182-4.
- Piñeyro Nelson, A. A.** (2013). De los mecanismos moleculares a la morfogénesis, el desarrollo y la evolución: el caso de la flor homeótica de *Lacandonia schismatica*. Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 220.
- Piñeyro-Nelson, A., Garay-Arroyo, A., Flores-Sandoval E., Álvarez-Buylla, E. & García-Ponce, B.,** (2010). Development and Evolution of the Unique Floral Organ Arrangement of *Lacandonia schismatica*. *International Journal of Plant Developmental Genetics*, 4:86-97.
- Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L. D. & Coen, E.** (2007). Evolution and development of inflorescence architectures. *Science*, 316:1452-6.
- Riechmann, J. L. & Ratcliffe, O. J.** (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion In Plant Biology*, 3:423-34.
- Rijkema, A. S., Vandenbussche, M., Koes, R., Heijmans, K. & Gerats, T.** (2010). Variations on a theme: changes in the floral ABCs in angiosperms. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21:100-7.
- Risseuw, E. P., Daskalchuk, T. E., Banks, T. W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D. & Crosby W.** (2003). Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 34:753-767.
- Rottmann, W. H., Meilan, R., Sheppard, L. a, Brunner, a M., Skinner, J. S., Ma, C., Cheng, S., Jouanin, L., Pillate, G. & Stauss, S.** (2000). Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 22:235-45.
- Rudall P. & Bateman R.** (2006). Morphological phylogenetic analysis of Pandanales: testing contrasting hypotheses of floral evolution. *Systematic Botany* 31:223–238.

- Rudall P.** (2003). Monocot pseudanthia revisited: floral structure of the mycoheterotrophic Family Triuridaceae. *International Journal of Plant Sciences* 164:S307–S320.
- Samach, A., Klenz, J. E., Kohalmi, S. E., Risseuw, E., Haughn, G. W. & Crosby, W. L.** (1999). The UNUSUAL FLORAL ORGANS gene of *Arabidopsis thaliana* is an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Science*, 20:433-445.
- Simon, R., Carpenter, R., Doyle, S. & Coen, E.** (1994). Fimbriata controls flower development by mediating between meristem and organ identity genes. *Cell*, 78:99-107.
- Siriwardana, N. S. & Lamb, R. S.** (2012a). The poetry of reproduction: the role of LEAFY in *Arabidopsis thaliana* flower formation. *The International Journal of Developmental Biology*, 56:207-21.
- Siriwardana, N. S. & Lamb, R. S.** (2012b). A conserved domain in the N-terminus is important for LEAFY dimerization and function in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*, 71:736-49.
- Soltis, D. E., Bell, C. D., Kim, S. & Soltis, P. S.** (2008). Origin and early evolution of angiosperms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1133:3-25.
- Soltis, D. E., Ma, H., Frohlich, M. W., Soltis, P. S., Albert, V. a, Oppenheimer, D. G., Altman, N. S., dePamphilis, C. & Leebens-Mack, J.** (2007). The floral genome: an evolutionary history of gene duplication and shifting patterns of gene expression. *Trends in Plant Science*, 12:358-67.
- Souer, E., Rebocho, A. B., Bliet, M., Kusters, E., de Bruin, R. M. & Koes, R.** (2008a). Patterning of inflorescences and flowers by the F-Box protein DOUBLE TOP and the LEAFY homolog ABERRANT LEAF AND FLOWER of petunia. *The Plant Cell*, 20:2033-48.
- Southerton, S. G., Strauss, S. H., Olive, M. R., Harcourt, R. L., Decroocq, V., Zhu, X., Llewellyn, D. J., Peacock, W. J. & Dennis E. S.,** (1998). Eucalyptus has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene LEAFY. *Plant Molecular Biology*, 37:897-910.
- Stevens P. F.** (1991). *Lacandonia schismatica*: a challenge to some recent theories of floral morphogenesis? *Flower Newsletter* 12:32–33.

- Taylor, S., Hofer, J. & Murfet, I.** (2001). Stamina pistilloida, the Pea ortholog of Fim and UFO, is required for normal development of flowers, inflorescences, and leaves. *The Plant Cell*, 13:31-46.
- Theissen G. & Becker A.** (2004). Gymnosperm orthologues of class B floral homeotic genes and their impact on understanding flower origin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23:129–148.
- Theissen, G. & Melzer, R.** (2007). Molecular mechanisms underlying origin and diversification of the angiosperm flower. *Annals of Botany*, 100:603-19.
- Vandenbussche, M., Zethof, J., Royaert, S., Weterings, K. & Gerats, T.** (2004). The Duplicated B-Class Heterodimer Model: Whorl-Specific Effects and Complex Genetic Interactions in *Petunia hybrida* Flower Development. *Society*, 16:741-754.
- Vergara-Silva, F., Espinosa-Matías, S., Ambrose, B. A., Vázquez-Santana, S., Martínez-Mena, A., Márquez-Guzmán, Martínez, E., Meyerowitz, E., M. & Álvarez-Buylla, E. R.** (2003). Inside-out flowers characteristic of *Lacandonia schismatica* evolved at least before its divergence from a closely related taxon. *International Journal of Plant Sciences* 164:345-357.
- Wang, H., Chen, J., Wen, J., Tadege, M., Li, G., Liu, Y., Mysore, K. S., Ratet P. & Chen, R.** (2008). Control of compound leaf development by FLORICAULA/LEAFY ortholog SINGLE LEAFLET1 in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 146:1759-72.
- Weigel D. & Nilsson O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*. 377:495-500.
- Weigel, D, Álvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F. & Meyerowitz, E. M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, 69:843-59.
- Zhang, S., Sandal, N., Polowick, P. L., Stiller, J., Stougaard, J. & Fobert, P. R.** (2003). Proliferating Floral Organs (Pfo), a *Lotus japonicus* gene required for specifying floral meristem determinacy and organ identity, encodes an F-box protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 33:607-19.

10. PROGRAMAS UTILIZADOS

Abascal, F., Zardoya, R. & Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21:2104-5.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
NCBI. Aminoacid explorer:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa_explorer.cgi

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*, 5:1-19.

Geneious version 6.0 created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com>
ExPASy Bioinformatics resource portal. Translate tool. Available from <http://web.expasy.org/translate/>

Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E., Eddy, S. & Bateman, A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 38: D211-22. Available from <http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>

Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., Mc Gettigan P., Mc William H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T. & Higgins D. (2007). Clustal W & Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948. Available from <http://www.clustal.org>


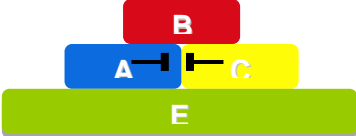
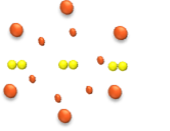
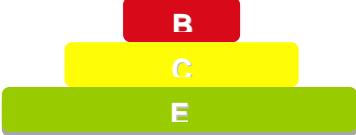






Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research*, 35 (Web Server issue), W43-6. Available from <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Sigrist, C., de Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B. A., Hulo, N., Bridge, A. & Bougueleret, L. (2012). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic acids research*, 41: 344-347. Available from <http://prosite.expasy.org/>

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-9.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13:134. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

APÉNDICE 1: Mutantes homeóticos en *Arabidopsis thaliana* que permitieron proponer el modelo ABC y el modelo del cuarteto floral

Genotipo	Función afectada	Fenotipo				Diagrama floral	Modelo
		Verticilo 1	Verticilo 2	Verticilo 3	Verticilo 4		
Silvestre		Sépalos	Pétalos	Estambres	Carpelos		
<i>apetala2</i>	A	Carpelos	estambre	✓	✓		
<i>apetala3 pistillata</i>	B	✓	Sépalos	Carpelos	✓		
<i>Agamous</i>	C	✓	✓	Pétalos	Desarrollo de la flor se repite		
<i>sepallata1/2/3</i>	E	sépalos	sépalos	Sépalos	Desarrollo se repite		

APÉNDICE 2: Protocolo corto de extracción de DNA de pequeñas cantidades de tejido liofilizado. (Modificado de protocolo largo de extracción de DNA de maíz del Centro de Internacional y Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT)).

Se parte de una muestra de 300 a 400 mg de tejido fresco. Se congela el tejido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se liofiliza. Para evitar problemas en la molienda de preferencia moler inmediatamente después de liofilizar. Se muele en el agitador hasta que quede un polvo muy fino y se puede guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción.

EXTRACCIÓN

Es importante preparar el CTAB el mismo día de la extracción y tener listos un día antes los tubos eppendorf etiquetados y estériles así como todo el material que se utilizará.

1. Poner en microtubo de 2 mL el equivalente de 40 a 45 mg del material liofilizado.
2. Agregar 1ml de buffer de extracción CTAB previamente calentado a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. En la campana de extracción, agregar 10 mL de Beta-mercaptoetanol y dar otro vortex de igual intensidad, por 15 seg.
4. Agitar suavemente durante 2 h a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el horno.
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente por 10 min.
6. Abrir tubos en campana de extracción y agregar 500 mL de solución de cloroformo: octanol (24:1).
7. Agitar suavemente por inversión aproximadamente 100 veces.
8. Centrifugar tubos a 3600 rpm por 10 min a temperatura ambiente.
9. En campana de extracción, tomar 600 μL del sobrenadante y pasar a un tubo de 2 mL nuevo, previamente rotulado.
10. Agregar 400 μL de isopropanol frío ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
11. Poner tubos en agitador orbital a mediana velocidad y dejar mezclando por 15 min, o hasta que se obtenga un máximo de precipitado, a temperatura ambiente.
12. Centrifugar los tubos a 14,000 rpm, preferentemente a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 min.
13. Decantar sobrenadante con cuidado y agregar 1 mL de ETOH al 70 % frío (a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

14. Mezclar por inversión y decantar el sobrenadante, dejar secando los tubos invertidos sobre una toalla absorbente a temperatura ambiente, hasta que se haya evaporado el EtOH y la pastilla esté traslúcida pero no completamente seca.
15. Resuspender el pellet en aproximadamente 100 µL de H₂O dd o TE-8
16. Agregar RNAasa (1:1000) por 20 min a temperatura ambiente.
17. Correr alícuota de 1 µL de DNA con LB en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio y marcador de Lambda cortado con HindIII (100 ng totales) para estimar los ng de DNA por µL.

Solución amortiguadora con CTAB para extracción¹							
		1 RXN	5 RXN	10 RXN	20 RXN	50 RXN	60 RXN
Soluc. Concentrada	[FINAL]	10 mL	50 mL	100 mL	200 mL	500 mL	600 MI
dH₂O		6.5 mL	32.5 mL	65.0 mL	130.0 mL	325.0 mL	390.0 MI
1M Tris-7.5	100 mM	1.0 mL	5.0 mL	10.0 mL	20.0 mL	50.0 mL	60.0 mL
5M NaCl	700 mM	1.4 mL	7.0 mL	14.0 mL	28.0 mL	70.0 mL	84.0 MI
0.5M EDTA-8.0	50 mM	1.0 mL	5.0 mL	10.0 mL	20.0 mL	50.0 mL	60.0 MI
CTAB²	1 %	0.1 g	0.5 g	1.0 g	2.0 g	5.0 g	6.0 g
14M BME³	140 mM	0.1 mL	0.5 mL	1.0 mL	2.0 mL	5.0 mL	4.0 MI

¹ Utilice la solución recién elaborada; calentar a 60-65 °C antes de agregar CTAB y BME.

² CTAB= bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio.

³ Agregar BME (β-mercaptoetanol) bajo una campana de extracción, justo antes de usarse.

Apéndice 3: Vector de clonación

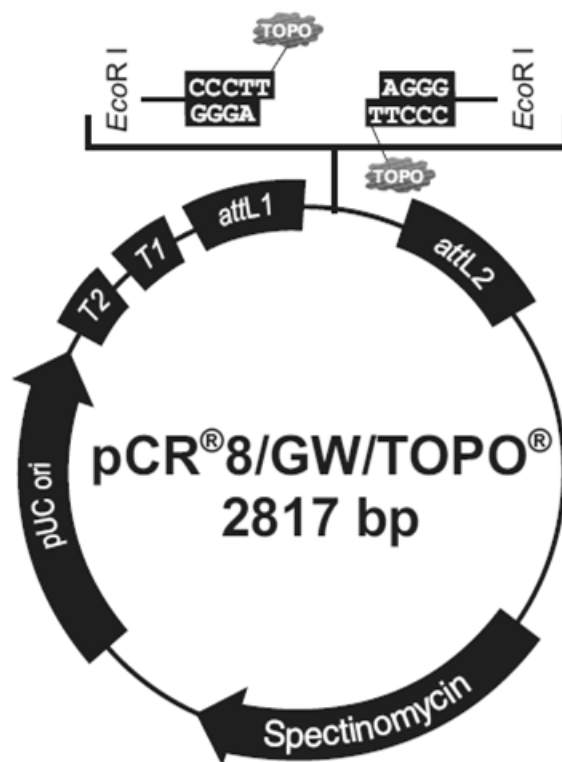


Figura A.3.1. Vector de clonación TOPO[®] (Invitrogen) de 2.8kb . Tomado de:
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr8gwtopo_map.pdf

Apéndice 4. Secuencias consenso para *LsUFO*, *TbUFO*, *LsLFY*, *TbLFY* y *TbLFY2* generadas a partir de datos experimentales y de la información del transcriptoma de *L. schismatica* y *T. brevistylis*.

LEAFY

1. Consenso de *LsLFY*: Secuencia de DNA genómico

>*Consenso1_LsLFY_DNAg*

CGGCCGCCCACGCAGCAGGCAGCCGCGGCGGAGCTGGAGGGCGTTTTTCGAGGGGTACGGTGTGCGGGC
 AGCGACGTCGTCTCGGGTGGCGGCGCTTGGTTTTACGGCGTTCGACGCTGGCGGTGATGACGGACGCCGA
 GCTGGACGACATGGCCACCCTCCTCTCCACCATTTCGGGTGGGATATCCTCGTAGGTGAGCGGTACGGC
 ATTCGCGCCGCCCTCCGTTCCCTCCGTGGACGCCTCCTCCCTCCGCCTGCAGGTACGCCTCCCCACCTCC
 CGGGTCACAGACTTGTCCAACGACTTACCTTCTTCTTTATTATTATTATTTTTTTTTTTACTTATCAGGTGAG
 AGTGAGAGTGGGATCGTCAAGCAGCCGCCGCCCGCCGCGCAGCCTGGGCGGCCAGAAGGCGGCGAA
 GAAACCCAAGAAAGCGGCTTCCACGCTTCGGAATCAGACAGCGGCGAGTCGGACGGGAAGGCGTCGG
 CATCGGCGTTCGGCACGGAAGAAACCCAAGAAAGTGGTTTTCCACGCTCCAGAGTCGGATGGCGTCGAGT
 CGGATGGGCGGGCGTCTGCGGCGATAGTGGCAAGGCAGAGGGAGCACCCGTTTCATCGTGACGGAGCCC
 GGGGAGGTGGCCAGGTGCAAGAAGAACGGGCTGGACTACCTGTTCCACCTCTACGACCAGTGCCTGGA
 GTACCTCCTCGAGGTGCAGTCGCTGGCGAGGGAGAGGGGGGAGAAGTGCCCCACAAAGGTCACAAACC
 AGGTGTTCCGGCACGCCGAGCGGGGGCGGCGCAAATCAACAAGCCCAAGATGCGCCACTACGTCCACT
 GCTACGCCCTCCACTGCGTCGACCCCTCCGCTCCAACGCTCTCCGCCGGGAGTTCAAGTCCCGGGGGNA
 CCGGCGTTCGGCGGTGGCGGGAAGCGTGTACCAGCCCTGGTCTCCATCGCCGCTCGCGCCATGGCT
 GGGACGCCGACGCCCTCTTCGCTCCACCCTCGCGTCGCGGTGTGGTACGTTCCCAAAAAGCTCCGGGA
 GCTATGCTACCTCGAACGCAGCCGCGCCATGTGCGCCGAGGGATAACCGCCGGCCGTTGGTTGCGCCGA
 CAGCCTCCCCACATGTCCACCATCATGTACTAAGCTGAGATGAGAATGAGATCGAGTGGTTCGAGGTCC
 C

2. Caracterización de *LsLFY* y *TbLFY*: Secuencia de DNAc

>*Consenso_LsLFY_DNAc*

CGGCCGCCCACGCAGCAGGCAGCCGCGGCGGAGCTGGAGGGCGTTTTTCGAGGGGTACGGTGTGCGGGC
 AGCGACGTCGTCTCGGGTGGCGGCGCTTGGTTTTACGGCGTTCGACGCTGGCGGTGATGACGGACGCCGA
 GCTGGACGACATGGCCACCCTCCTCTCCACCATTTCGGGTGGGATATCCTCGTAGGTGAGCGGTACGGC
 ATTCGCGCCGCCCTCCGTTCCCTCCGTGGACGCCTCCTCCCTCCGCCTGCAGGTGAGAGTGAAGTGGGA
 TCGTCAAGCAGCCGCCGCCCGCCGCGCAGCCTGGGCGGCCAGAAGGCGGCCGAAGAAACCCAAGAAA
 GCGGCTTCCCACGCTTCGGAATCAGACAGCGGCGAGTCGGACGGGAAGGCGTCGGCATCGGCGTCGGC
 ACGGAAGAAACCCAAGAAAGTGGTTTTCCACGCTCCAGAGTCGGATGGCGTCGAGTCGGATGGGCGGG
 CGTCTGCGGCGATAGTGGCAAGGCAGAGGGAGCACCCGTTTCATCGTGACGGAGCCCGGGGAGGTGGCC
 AGGTGCAAGAAGAACGGGCTGGACTACCTGTTCCACCTCTACGACCAGTGCCTGGAGTACCTCCTCGAG
 GTGCAGTCGCTGGCGAGGGAGAGGGGGGAGAAGTGCCCCACAAAGGTCACAAACCAGGTGTTCCGGCA
 CGCCCGAGCGGGGGCGGCGCAAATCAACAAGCCCAAGATGCGCCACTACGTCCACTGCTACGCCCTCCA
 CTGCGTCGACCCCTCCGCTCCAACGCTCTCCGCCGGGAGTTCAAGTCCCGGGGACCGGCGTCGGCGC
 GTGGCGGGAAGCGTGTACCAGCCCTGGTCTCCATCGCCGCTCGCGCCATGGCTGGGACGCCGACGC
 CCTCTTCGCTCCACCCTCGCGTCGCGGTGTGGTACGTTCCCAAAAAGCTCCGGGAGCTATGCTACCTC
 GAACGCAGCCGCGCCATGTGCGCCGAGGGATAACCGCCGGCCGTTGGTTGCGCCGACAGCCTCCCCAC
 ATGTCCACCATCATGTACTAAGCTGAGATGAGAATGAGATCGAGTGGTTCGAGGTCC

> *Consenso_TbLFY1_DNAc*

GAGGTACGGGGTGCGGGCAGCGATGTTGGAGAGGAGCGCGAGGTACGGGGTGCGGGCAGCGACCCCT
 CCCGGTTGGCGGCGCTGGGATTCACGGCGTTGACGCTGGCCGGGATGACCGACGCCGAGCTGGACGACA
 TGACCGCCGTCTCTCCACCAATTCCGGTGGGATATCCTCGTCGGGGAGCGCTACGGCATCCTTGCCGC
 CCTCCGCTCCCTCCGCTCCGCTCTTCCCTCCCCCGCCCCCTCCTCCTCCTCGCCAACCACCACCCACT
 CCTCCTCCTCCCCGCAGGCAAGAAAGCCCAACGCCGACGAGCAAGCAGGCGGGCAGGACGCCTAAG

AAAGCGGCGGCGGGTGTAAATGGTAACAGCAACAAGGCAGCGGGAGCACCCGTTACGGTGACGGAGCC
 GGGCGAGGTGGCGAGGGGAAAAAGAACGGGATCGACTATCTCTTCCATCTCTACGACCAGTGCATGGC
 CTACCTGCTAGAGGTGCAGTTGCTGGCGCGGGAGAGGGGGCGGAAGCCACCGGCGAAGGTGGCGAACG
 AGGTGTTTCGAGCACGTCCGGGGAGCCGGCGCGGGGCACATCAACAAGCCCAAGATGCGGGCTGTACGTC
 CACTGCTACGCACTCCACTGCCTCGACCCCCGCACCTCCGACGCGCTCCGCCGGGAGTACAAGCCGCGA

> *Consenso_TbLFY2_DNAc*

CAGCTCCCCAGGTAACCCGCTCCTTCTCCTCTCAGCCAACCAGAAGAAAGGCAGCGGGAGGAGCTCCC
 GTTCACTCTGACGGCGCCGGGGGAGGTGGCGCGGAACGGTGTGGACGAGCTCTTCCACCTCTACGACGA
 GTGCATGGCGTATCTGCTGGAGGTGCAGTCGCTGGCGCGGGAGAGAGGGGCGGGAGGTGCCGGCGAAGA
 TAACGAACGAGGTGTTCCGGCACGCACGGGGCGCTGGAGGAGAAGGGTGCATCATACCAAGCCGAAG
 ATGCGGCTGTACGTCCACTGCTACGCCCTCCATTGCCTCGACCCCCGTTTCTCCGACACCATAACGCCGTG
 TGTACAAGTCGTTGGGGGGAAGCGTCGGGTCTGGCGGGAGGCCTGCTTCCAACCCGTGGTCACCATCG
 CCGCCGCGGACACGGCGGGGATGTCGACGCCCTCTTCTCCTCCACCCAGCCTCGCCGTCTGGCACGT
 CCCATACGACTCCGGCAGCTCTGCTACATCCAGCGCCTTGTGCGCCGACGACGCAGGCTTGCCTCCGGCC
 GTCAGCGGCGTCCCTCACACGCCCCCATCACCATATACGGAGAGAGTGGGAAAGAGGCTGCCGGCGTC
 TTCTTTCC

3. Caracterización de LsLFY y TbLFY: Secuencia de aminoácidos

> *Consenso1_LsLFY_362aa*

RPPTQAAAAELEGVFEGYGVRAATSSRVAALGFTASTLAVMTDAELDDMATLLSHHFRWDILVGERYGIR
 AALRSLRGRLLPPPAGESGIVKQPPRRRSLGGQKAAKKPKKAASHASESDSGESDGKASASASARKKPK
 KVVSHAPESDGVESDGRASAAIVARQREHPFIVTEPGEVARSKKNGLDYLFHLYDQCVEYLLEVQSLARER
 EKCPKVTNQVFRHARAGAAQINKPKMRHYVHCYALHCVDPASNALRREFKSRGTGAVGAWREACYQPLV
 SIAASRHGWDADALFASHPRVAVWYVPKKLRELCYLERASRAHVAAGIPPAVGCADSLPHMSTIMY-
 AEMRMRSSGRGP

> *Consenso_TbLFY1_229aa*

RYGVRAAMLEERSARYGVRAATPSRLAALGFTALTLAGMTDAELDDMTAVLSHQFRWDILVGERYGILAA
 RSLRLRFP PPPPPPPRQPPTSSSSPAGKKAQRRSSKQAGRTPKAAAGVMVTATRQREHPFTVTEPGEVAR
 GKKNIDYLFHLYDQCMA YLLEVQLLARERGRKPPAKVANEVFEHVRGAGAGHINKPKMRLYVHCYALHC
 LDPRTSDALRREYKPR

> *Consenso_TbLFY2_209aa*

SSPGNPLLLPLSQPEERQREELPFTLTAPGEVARNGVDELFLHYDECMAYLLEVQSLARERGREVPAKITNEV
 FRHARGAGGEGCIITKPKMRLYVHCYALHCLDPRFSDTIRRVYKSLGGSVGSWREACFQPVVTIAAARHGGD
 VDALFSSHPSLAVWHVPYRLRQLCYIQLRVADDAGLPPAVSGVPHTPPITIYGESGKEAAGVFF

UNUSUAL FLORAL ORGANS

1. Consenso de LsUFO: Secuencia de DNA genómico

> *Consenso_LsUFO_DNAg*

AGAAGTTCCACCATGGAAGGCTTTTTTTTTCTTGTAACTCCTCTGGCGTTGCCATGGATCCCCGCATATG
 GCGTCGCCTTCCACAACCTCTCATCGACCGCATCCTCGCTTTCTTACCCCCAGCAGCTTTCTCCGTGCC
 GCTCCGTATGTCGTAGGTGGTATGCCCTCTTGTCTCCACCTACTTCTCGACCTCCACGATCATCTTTCC
 CCTCGTGTGCCCTTTTTCTCTTCTCCTGCTCCCCTCCTTCCCATCCTCATTACCTCCACCTCCACCACA
 ACTGCGTCTCTGACACCAAATCAACACATGGCATCCAATCCCTTTTGACCACTTACATACCTGACG
 GATTAACCTCCGGCCGCTCCACGGCGGCGTAGTCTGTTGGATTTAGATGCCGCTGGCTCCAAGACCCT
 TCTCCTATCCAACCCCTTTCAAAGCTTGTGCTCACCTCCCCCATCCCGTTGTGCAGTTTGTGGCCTA
 CTGTTGGCCTTGGCATCGGCCACTCATCCATTACAGCCATCATTGCAGGGGACGACATGATAACACCATT
 CTCTGTAATGAATATATCATCTGAACGCTTCAACAACAGATGTATCTAGTGGCTTCTGCTCTCCTTGGACA
 ATGGTAAGTGCTCTTCTCGACTCTCCGATATGAAAACAGGACGCATGTTATTCGCAGATGAAAGTTCT
 ACTGTATGAGCTTCGGCCATTTCGCTGTTCTTGCCTACAACCCCGACGAGAACGAGTGGTCGAAAATCA
 AGCCACCGATGCAGAAATACTTGGCGTCGCCGAGCTTGGTGGTGTGCTGGGGTAGGATAATGTTGGTGG

CTGCAGTGGAGAAAGCTAAGCTCAGCATTCCACAGAGTGTGCGAGTCTGGGAGTTGCGAGGCTGCCGGA
 GGACTTGGGAAGAAATTGGTAGGATGCCAATGGACATCTATCGTCAGTTTGCCGAGGCGGAGAGGGGA
 AGGGGGTTCGAGTGCAGTGGAAACGGTGTGCTCATAGCCGTTACAATGTGCGGTTCTGTGGACGTTTTGC
 TTTTTGACTTGGAGAGGAAGCAGTGGAGATGGGTGCCACGGTGGCCATTAACCGCCACGGAGGGGAAA
 TGTGGCTCAGAGGGATGTCTACGAGCCACAGCTTGGGACGCCGCTTATTGGGAGCTTTTGTCCACGGC
 ATCTGTCATTGCAAATTTGTAATTTTAATTATTGCAAGTGTTTTTGGTCTACTAAGGCCAAAAAATTTAA
 ATACCCTAGGAGACTTACTGTAGTCTTTAGTTCCTCAACTT

2. Consenso de *LsUFO* y *TbUFO*: Secuencia de DNAC

>Consenso *LsUFO* DNAC

AGAAGTTCCACCATGGAAGGCTTTTTTTTTCTTGTAACTCCTCTGGCGTTGCCATGGATCCCCGCATATG
 GCGTCGCCTTCCACAACCTCTCATCGACCGCATCCTCGCTTTCTTACCCCCAGCAGCTTTCTCCGTGCC
 GCTCCGTATGTCGTAGGTGGTATGCCCTCTTGTCTCCACCTACTTCCCTCGACCTCCACGATCATCTTCC
 CCTCGTGTGCCCTTTTTTCTCTTCTTCTCCTGCTCCCTCCTTCCCATTCTCATTACACTCCACCTCCACCACA
 ACTGCGGTCCCTCTGGACACCAAATCAACACATGGCATCCAATCCCTTTTGACCACTTCATACCTGACG
 GATTCACTCCGGCCGCTCCACGGCGGCGTAGTCTGTTGGATTTTCCAGATGCCGCTGGCTCCAAGACCCT
 TCTCCTATCCAACCCCTTTCAAAGCTTGTGCTCACCTCCCCCATCCCCTTGTGCACGTTTGTGGCCTA
 CTGTTGGCCTTGCCATCGGCCACTCATCCATTACAGCCATCATTGCAGGGGACGACATGATAACACCATT
 CTCTGTAATGAATATATCATCTGAACGCTTCCACAACAGATGTATCTAGTGGCTTCTGCTCTCCTTGGACA
 ATGGTAAGTGCTCTTCCCTCGACTCTCCGATATGAAAACAGGACGCGATGTTATTCGCAGATGAAAGGTTCT
 ACTGTATGAGCTTTCGGCCCATTCGCTGTTCTTGCCTACAACCCCGACGAGAACGAGTGGTCGAAAATCA
 AGCCACCGATGCAGAAATACTTGGGTCGCCGAGCTTGGTGGTGTGCTGGGGTAGGATAATGTTGGTGG
 CTGCAGTGGAGAAAGCTAAGCTCAGCATTCCACAGAGTGTGCGAGTCTGGGAGTTGCGAGGCTGCCGGA
 GGACTTGGGAAGAAATTGGTAGGATGCCAATGGACATCTATCGTCAGTTTGCCGAGGCGGAGAGGGGA
 AGGGGGTTCGAGTGCAGTGGAAACGGTGTGCTCATAGCCGTTACAATGTGCGGTTCTGTGGACGTTTTGC
 TTTTTGACTTGGAGAGGAAGCAGTGGAGATGGGTGCCACGGTGGCCATTAACCGCCACGGAGGGGAAA
 TGTGGCTCAGAGGGATGTCTACGAGCCACAGCTTGGGACGCCGCTTATTGGGAGCTTTTGTCCACGGC
 ATCTGTCATTGCAAATTTGTAATTTTAATTATTGCAAGTGTTTTTGGTCTACTAAGGCCAAAAAATTTAA
 ATACCCTAGGAGACTTACTGTAGTCTTTAGTTCCTCAACTT

> Consenso *TbUFO* DNAC

CTCTTCCGATCTAACTTCTTCAATTTCAACCACCTTTGGTACCCCAACTGCTCTACTCCTTGACACTACCA
 TCAACACTTGGCATCAAATCCAATTTGACCACTTCATTCTGAGGGATTCACACCTGTGTCTCCCATGG
 CGGCTAGTCTGCTGGGTTTCCAGATGATGCTGGCTTCAAGACCCTTCTCCTTTCCAATCCCCTTTCAAAGC
 ATGTAACCCACCTCCCTCCATCCCGTTGTGCACGCTATGGCCACTGTTGGCTTTACCATAGACCACTCC
 TCCGTTACAACATCATTGCAGGGGACGACATGGTAACACCTTTCTCAGTCAGGAATTTGACTTCTGAAT
 GCTTTAATGCTGATGTCTCTACTGGCAACTTCTCCTTGGACAATGACAAGCACCTTCCCAGGCTCTCT
 AATATGGAAACCCGACGCATGGTGTGTTGTAGATGAGAGGTTCTACTGTGTGAGCTTTCGGCTCTGTTGATG
 TTCTTGCCTATAAACCATGGAGAACCAGTGGTCAAGATCAAGCCACCCATGAAAAAGTACTTGGCGT
 CGCCACGCTCCTTGTGTTGCTGGGGTAGGTTAATTTTGGTAGCTGCAGTTGAGAAACGAAATCTCAGTGT
 CCCACAGAGCGTGACATTTGGATGCTTCAAGACTGCGGGCGGTCTTGGGGAAAAATAGGTAAGATGCC
 CACCGACATCTATCATCAGTTTGCAGAGGCTGAGGGTGGGAGGGGATTCGATTGCACTGGGAATGGTGG
 GCTCATAGCTATCACTATGCGTGGTGTGTGGATGTTTTGCTTTTTGACATGGAAAGAAAGCACTGGAGG
 TGGGTGCCAGGGTGCCCATTAAGCTCTCATGGGAGACAAATGTGGCTTAGGGGGATGTCTACGAGCCA
 CAGCTTGCCACACCTGTCATTTGAACAAATACTTCGAGTAGCATTACACCTAATTTATAAACTGATGATT
 TCACTATTGGTGTGCTGCTTTGTAAGTGTAAATGCATAGTTGGAGCTTTTTACTACTTGAACCTTCTGTGA
 ATTGTTCTTGTGTTGGCTCTAAGATTCTAGAGTTGTTAATTTTAGATGAGCTTTGTTAACTGTTGTTCTAG
 TAGCTGCACACCTGATTTATCTGTGGATGACTATACTTCACTAGTGTCCATGCCCTTATGTGTTGCATTGC
 TTGAGCTTGTACCTGGCTCTTCAATAAAGAAGACCTAGAGCTGGAAAAGGCTTTGCTTCTTTGTGTCTA
 TCAGTGTGTTGTGCAATTGTAACAGACGGCGACGGCGACGATGAGTGTCTGGAGACGACGGTGACGG
 ACTCGACTCCGTGTGGTGGCAGACGGCGAAGACGCGGCAGGGCGCCTGCGTCTCCTTGGAGGGTTTC
 TGCGGGCGGCTCCTCGCTCCCCCTCACCGCCGTGGGCCGTGGGAGCGCGGGCGTGGCCGGTCCGCGGC
 GCAGGGGGCGATTCTGGCGCTGGTGGAGGTT

3. Consenso de LsUFO y TbUFO: Secuencia de aminoácidos

>Consenso *LsUFO_aa*

MEGFFFFPCNSSGVAMDPRIWRRLPQPLIDRILAFLLPAAFFRARSVCRRWYALLFSTYFLDLHDHLSRPVFFL
 FLLPSFPSSLHSTSTTTAVLLDTKINTWHPIPFDFHIFPDGFTPAASHGGVVCWISDAAGSKTLLLSNPLSKLVA
 HLPPSRCARLWPTVGLAIGHSSITAIAGDDMITPFSVMNISSERFTTDVSSGFCSPWTMVSALPRLSDMKTGR
 MLFADERFYCMSFGPFAVLAYNPDENEWSKIKPPMQKYLRSPSLVVCWGRIMLVAAVEKAKLSIPQSVRVW
 ELRGCRRTWEEIGRMPMDIYRQFAEAERGRGFECTGNGVLIAVTMCGSVDVLLFDLERKQWRWVPRCPLTA
 HGGEMWLRGMSYEPQLGTPLIGSFCSTASVIANL

>Consenso *TbUFO_aa*

SSDLTSSISTTFGTPTALLLDTTINTWHQIQFDHFIPEGFTPVSSHGGLVCWVSDDAGFKTLLLSNPLSKHVTHL
 PPSRCARLWPTVGFTHSSVTIIAGDDMVTFFSVRNLTSECFNADVSTGNFSPWTMTSTLPRLSNMETGRM
 VFVDERFYCVSFGSVDVLA YKPMENQWSKIKPPMKKYLRSPSVLVCWGRILVAAVEKRNLSPQSVHIWM
 LQDCGRSWGKIGKMPDIYHQFAEAEGGRGFECTGNGGLIAITMRGCVDVLLFDMERKHWRWVPGCLSS
 HGRQMWLRGMSYEPQLATPVITNTSSITPNLTDDFTIGDAALVCIVGAFYVYLNSSVIVLVWLDSSCFMSFVN
 CCSSSCTPDLSDVDDYVSLVSMPLCVALLELVTLWLFNKEDLELEKALLLCVYQCCVQLQTATATMSVPGDDG
 DGLDSVWCRRRRRRGRAPASPWRVSAAPRLPLTAVGRRERGRGRSRRQGRFWRWWR

APÉNDICE 5: Homólogos de LsLFY utilizados en este trabajo

Gimnospermas	Coniferales	Pinaceae	<i>Pinus radiata</i>	PRFLL	AAD16982.1	
Angiospermas						
Basales			<i>Nymphaea odorata</i>	NodLFY	AAF77609.1	
			<i>Peperomia sp.</i>	PeLFY	AAF77611.1	
			<i>Liriodendron tulipifera</i>		ADR79440.1	
Monocotiledóneas	Liliales	Liliaceae	<i>Lilium longiflorum</i>		ABR13015.1	
		Alstroemeriaceae	<i>Alstroemeria ligtu subsp. Ligtu</i>	AlsLFY1	BAL70388.1	
			<i>Alstroemeria ligtu subsp. Ligtu</i>	AlsLFY2	BAL70386.1	
	Asparagales	Orchidaceae	<i>Orchis mascula</i>	OrcLFY	AB088439.2	Montieri, <i>et al.</i> 2004
			<i>Cypripedium molle</i>		AFJ80005.1	Guo, <i>et al.</i> 2012
		Amaryllidaceae	<i>Narcissus tazetta var. Chinensis</i>		ADR78683.1	Liu, <i>et al.</i> 2011
		Hyacintheae	<i>Hyacinthus orientalis</i>	HLY	AAS00458.1	
	Poales	Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	RFL	AB005620.1	Kyozuka, <i>et al.</i> 1998
		<i>Zea mays</i>	ZFL1	AAO43174.1	Bomblies, <i>et al.</i> 2003	

			<i>Zea mays</i>	ZFL2	AAO43173.1	Bomblies, <i>et al.</i> 2003
--	--	--	-----------------	------	------------	------------------------------

		Juncaceae	<i>Juncus effusus</i>	JunefLFY	AAF77077.1		
	Pandanales	Triuridaceae	<i>Lacandonia schismatica</i>	LsLFY			
			<i>Triuris brevistylis</i>	TbLFY1			
			<i>Triuris brevistylis</i>	TbLFY2			
Dicotiledóneas	Lamiales	Plantaginaceae	<i>Antirrhinum majus</i>	FLO	P23915.1	Coen, <i>et al.</i> 1990	
	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LFY	AAA32826.1	Weigel <i>et al.</i> 1992	
	Solanales	Solanaceae	<i>Petunia x hybrida</i>	ALF	AAC49912.1	Souer <i>et al.</i> 1998	
	Myrtales	Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i>	ELF1	O64953	Southerton <i>et al.</i> 1998	
	Fabales	Fabaceae	<i>Pisum sativum</i>	UNI	AAC49782.1	Hofer <i>et al.</i> 1997	
	Vitales	Vitaceae	<i>Vitis vinífera</i>		AAN14527.1	Carmona <i>et al.</i> 2002	
	Ranunculales	Papaveraceae	<i>Eschscholzia californica</i> <i>subsp. Califónica</i>		AAO49794.1	Busch and Gleissber, 2003	
	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Hevea brasiliensis</i>		AAT57872.1	Dornelas and Rodriguez, 2005	
			Salicaceae	<i>Salix discolor</i>		AAO73539.1	
			Salicaceae	<i>Populus trichocarpa</i>		AAB51533.1	Rottmann, <i>et al.</i> 2000
	Caryophyllales	Caryophyllaceae	<i>Silene coeli-rosa</i>		CAC86163	Allnutt, <i>et al.</i> 2007	

	Ericales	Balsaminaceae	<i>Impatiens balsamina</i>		CAI61979	Ordidge, <i>et al.</i> 2005
	Asterales	Asteraceae	<i>Chrysanthemum lavandulifolium</i>	DFL	AAT51708	Ma, <i>et al.</i> 2008

APÉNDICE 6: Homólogos de LsUFO utilizados en este trabajo

Clasificación		Taxa	Homólogo UFO	Código de acceso	Referencia	
Gimnospermas						
	Coniferales	Pinaceae	<i>Picea sitchensis</i>	ADE76251.1		
Monocotiledóneas						
	Pandanales	Triuridaceae	<i>Lacandonia schismatica</i>	LsUFO		
			<i>Triuris brevistylis</i>	TbUFO		
	Poales	Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	APO1	BAF75467.1	Ikeda <i>et al.</i> 2007
			<i>Andropogon hallii</i>		AFJ42435	
			<i>Andropterum stolzii</i>		AFJ42432	
			<i>Chrysopogon gryllus</i>		AFJ42437	
			<i>Cymbopogon flexuosus</i>		AFJ42431	
			<i>Dichanthium annulatum</i>		AFJ42436	
			<i>Loudetia sp.</i>		AFJ42429	

			<i>Mnesithea lepidura</i>		AFJ42430	
			<i>Phacelurus digitatus</i>		AFJ42434	
			<i>Schizachyrium sanguineum</i> var. <i>Hirtiflorum</i>		AFJ42433.1	
			<i>Sorghum bicolor</i>		XP_002438811.1	
			<i>Zea mays</i>	ZmFIMa		
			<i>Zea mays</i>	ZmFIMb		
Dicotiledóneas						
Rosids	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	UFO	CAA61508	Ingram <i>et al.</i> 1995
	Fabales	Fabaceae	<i>Lotus japonicus</i>	Pfo	AAN87351.1	Zhang <i>et al.</i> 2003
			<i>Medicago truncatula</i>		AAX28871	Wang <i>et al.</i> 2008
			<i>Glycine max</i>		XP_003524823.1	
			<i>Petunia x hybrida</i>	DOT	ACA61781	Souer <i>et al.</i> 2008
	Malpighiales	Salicaceae	<i>Populus trichocarpa 1</i>		XP_002303341.1	
			<i>Populus trichocarpa 2</i>		XP_002326440.1	
		Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>		XP_002528157.1	
	Vitales	Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>		XP_002275773.1	
Asterids	Lamiales	Plantaginaceae	<i>Antirrhinum majus</i>	FIM	AAB31352	Simon <i>et al.</i> 1994
			<i>Misopates orontium</i>		CAJ44131.1	

APÉNDICES

		Phrymaceae	<i>Mimulus guttatus</i>		AAS46000.1	Aagaard <i>et al.</i> 2005
	Solanales	Solanaceae	<i>Pisum sativum</i>	Stp	AAD01204	Taylor <i>et al.</i> 2001
			<i>Solanum lycopersicum</i>	AN	NP_001234215	Souer <i>et al.</i> 2009
			<i>Capsicum annuum</i>		ACI23253.1	Lippman <i>et al.</i> 2008

Apéndice 7. Porcentajes de similitud de los dominios conservados de LsLFY y LsUFO respecto a otras embriofitas.

Taxon	Extremo N-terminal		Extremo C-terminal		
	LsLFY (%)	TbLFY1 (%)	LsLFY (%)	TbLFY1 (%)	TbLFY2 (%)
<i>Pinus</i> PRL	42.5	38.4	61	65.4	46.4
<i>Nymphaea</i> NodLFY	52.1	47.9	56.4	65.4	45.6
<i>Liriodendron</i>	57.5	53.4	62.6	69.2	47.2
<i>Peperomia</i> PeLFY	50.7	49.3	55	64.5	44.5
<i>Alstroemeria</i> AlsLFY1	63	60.3	60.5	66.4	46.5
<i>Alstroemeria</i> AlsLFY2	63	60.3	60.5	66.4	46.5
<i>Cypripedium</i>	66.7	70	71.7	63.9	55
<i>Juncus</i> JunefLFY	56.2	52.1	58.5	65.4	48.3
<i>Hyacinthus</i>	59.7	55.6	58.5	65.4	46.5
<i>Lilium</i>	39.7	38.4	58.5	67.3	46.5
<i>Narcissus</i>	62.5	56.9	59.5	65.4	46.5
<i>Orchis</i> OrcLFY	66.7	59.7	55.1	63.9	42.9
<i>Oryza</i> RFL	61.1	55.6	57	66.4	47.5
<i>Zea</i> ZFL1	59.7	54.2	58	65.4	48.5
<i>Zea</i> ZFL2	59.7	54.2	57	66.4	47.5
LsLFY	-	74	-	73.8	57.1
TbLFY1	74	-	73.8	-	70
TbLFY2	-	-	57.1	70	-
<i>Antirrhinum</i> FLO	52.1	49.3	61	67.3	46.3
<i>Arabidopsis</i> LFY	57.5	52.1	62	66.4	46.3
<i>Chrysanthemum</i> DFL	56.2	52.1	60	67.3	47.8
<i>Eschscholzia</i>	54.8	50.7	57	65.4	44.3
<i>Eucalyptus</i> ELF1	60.3	56.2	61.5	69.2	46.8
<i>Impatiens</i>	54.2	48.6	61.5	67.3	47
<i>Petunia</i> ALF	53.4	50.7	61	67.3	46.5
<i>Pisum</i> UNI	57.5	53.4	60	66.4	45.8
<i>Populus</i>	54.8	52.1	64.4	67.3	48.5
<i>Salix</i>	54.8	52.1	64.4	67.3	47.4
<i>Silene</i>	53.4	50.7	60	67.3	45
<i>Vitis</i>	57.5	52.1	60.5	67.3	47

A.7.1. Porcentajes de similitud de los dominios N y C terminal entre LsLFY, TbLFY1, TbLFY2 y otras espermatofitas.

Taxón	UFO (Región comprendida del aminoácido 110 al 354)		Caja F
	Lacandonia LsUFO (%)	Triuris_Tb UFO (%)	Lacandonia LsUFO (%)
<i>Picea</i>	35.1	32.5	57.1
<i>Loudetia</i>	42.7	35.3	-
<i>Dichanthium</i>	43.1	35.9	-
<i>Andropterum</i>	41.7	34.1	-
<i>Cymbopogon</i>	42.2	34.5	-
<i>Chrysopogon</i>	42.6	34.3	-
<i>Andropogon</i>	42.7	34.5	-
<i>Mnesithea</i>	43.1	35	-
<i>Phacelurus</i>	43.1	34.8	-
<i>Schizachyrium</i>	41.9	35.6	-
<i>Sorghum</i>	42.7	34.5	53.1
<i>Oryza</i> APO1	44.4	35.6	63.3
<i>Zea</i> ZmFIMa	43.8	35.6	53.1
<i>Zea</i> ZmFIMb	42.3	33.8	53.1
<i>Lacandonia</i> LsUFO	-	65.2	-
<i>Triuris</i> TbUFO	65.2	-	-
<i>Arabidopsis</i> UFO	38.8	37.6	61.2
<i>Antirrhinum</i> FIM	41.5	40.4	71.4
<i>Capsicum</i> CA-AN	38.9	38.2	65.3
<i>Glycine</i>	39.9	38.1	67.3
<i>Lotus</i> Pfo	40.6	37.6	69.4
<i>Medicago</i> Stp	43.4	40.2	67.3
<i>Mimulus</i>	39.5	37	67.3
<i>Misopates</i>	40.2	39	73.5
<i>Petunia</i> DOT	39.9	-	61.2
<i>Pisum</i> Stp	42.7	39.4	63.3
<i>Populus</i> 1	39.5	35.2	67.3
<i>Populus</i> 2	40.6	36.3	69.4
<i>Ricinus</i>	41.6	35.3	65.3
<i>Solanum</i> AN	37.7	37	65.3
<i>Vitis</i>	41	39.4	65.3

A.7.2. Porcentajes de similitud entre la caja F de LsUFO y la región de 110 a 354 de LsUFO y TbUFO con respecto a otras espermatofitas.