

PID 2131

Proteínas con repeticiones ARM en *Arabidopsis thaliana*: su papel biológico putativo en la interacción polen-estigma

Acosta, María Gabriela; Ahumada, Miguel; Mistrorigo Benintende, Domingo; Lassaga, Sergio Luís; Casco, Víctor Hugo*

AUTORES: Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. (Oro Verde, Entre Ríos, Argentina).

*Director del proyecto, Doctor en Ciencias Biológicas. Director del Laboratorio de Microscopía Aplicada a estudios moleculares y celulares de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos.

CONTACTO: vcasco@gmail.com

Resumen

La súperfamilia de proteínas con repeticiones armadillo / β -catenina poseen repeticiones armadillo en tándem (ARM) y se ha postulado que desempeñan diferentes funciones tales como el desarrollo de las plantas, la morfogénesis, la defensa, la muerte celular y la transducción de señales a través de la señalización hormonal. En la base de datos disponible en web para *Arabidopsis* (TAIR), se encontraron 113 loci estrechamente relacionados con familia de las proteínas con repeticiones armadillo / β -catenina. Este amplio grupo de proteínas se estudió en los tejidos florales por *Western blot* utilizando anticuerpos dirigidos contra la región más conservada de la súperfamilia de las proteínas ARM. Las secuencias de aminoácidos obtenidos en TAIR fueron alineadas y el árbol filogenético resultante permitió inferir sus relaciones evolutivas. El principal hallazgo fue la gran similitud entre el producto del gen de At5g01830 (PUB16) (*A. thaliana*) y ARC1 (*Brassica napus*). Con el fin de hallar una posible función para PUB16 se llevaron a cabo ensayos biológicos de estrés utilizando tratamientos hormonales y solución salina. La expresión génica mediante RT-PCR mostró que algunas de las proteínas de súperfamilia ARM se expresan tanto en condiciones de estrés salino como hormonal. En este estudio se reveló que, sólo en presencia de giberelinas (GA₃), se hizo evidente la expresión de ARNm-At5g01830. Para verificar morfológicamente el creciente número de granos de polen germinados en flores tratadas con GA₃, se empleó el test de microscopía de epifluorescencia. Estos resultados sugieren que PUB16 participaría en la vía de señalización mediada por GA₃ favoreciendo la autopolinización.

Palabras clave: interacción polen estigma; giberelinas; ubiquitina ligasas E3

Abstract

The armadillo repeat super-family proteins (ARM repeat super-family proteins) possess tandem armadillo repeats and have been postulated to play different roles in plant development, morphogenesis, defense, cell death, and signal transduction through hormone signalling. In The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR), we found 113 loci closely related to ARM repeat family proteins. This extensive group of proteins was studied in flowers tissues by western blot using antibodies directed against the most conserved region of the ARM repeat family proteins. The amino acid residues sequences from TAIR were aligned and the resulting phylogenetic tree allows us to inferring their evolutionary relationships. The main finding was the high similarity between the gene product of PUB16 (At5g01830, *A. thaliana*) and ARC1 (*Brassica napus*). In order to search a possible role for PUB16 we carried out stress bioassays using hormonal and saline approaches. Gene expression using RT-PCR showed that some of the ARM

repeat super-family proteins are expressed both under salt or hormonal stress conditions. Particularly these studies allowed to detect and semi-quantify PUB16 gene expression in normal or stress growth conditions. In this approach it was revealed that, only in presence of GA, the expression of mRNA-PUB16 became evident. To morphologically verify the increasing number of germinated pollen grain in gibberellins treated flowers, we used epi-fluorescence microscopy assay. These results suggest that PUB16 may participate in GA signaling pathway favoring self-pollination.

Keywords: Pollen – stigma interaction; Gibberellins; E3-ubiquitin ligases.

Introducción

La súperfamilia de las proteínas con repeticiones armadillo están presentes en animales y plantas y son conocidas por jugar roles clave en varios procesos celulares que incluyen la transducción de señales, la regulación de las actividades del citoesqueleto, el proceso de importación nuclear, la regulación transcripcional y la ubiquitinación. Este tipo de proteínas poseen dominios con repeticiones armadillo (ARM). Cada repetición está constituida por múltiples repeticiones de 42 residuos de aminoácidos, que se encuentran en los proteomas de todos los organismos eucariotas

Los dominios ARM están altamente conservados y las súper hélices derechas se encuentran involucradas en interacciones proteína-proteína. Mientras que los dominios de repeticiones armadillo se encuentran en todos los eucariotas, en plantas, algunos de ellos han evolucionado en dominios únicos, tales como las combinaciones de dominios U-box y ARM, con funciones especializadas. Los dominios de proteínas específicos de plantas U-box-ARM constituyen el grupo más grande de la familia de las proteínas con repeticiones ARM en todos los genomas analizados y los datos más recientes han implicado a estas proteínas como ubiquitinas ligasas E3. Los estudios más recientes sobre las funciones de estas proteínas no se han dilucidado para la mayoría de estas proteínas con repeticiones ARM en plantas, aunque se ha sugerido su importancia en múltiples procesos tales como autoincompatibilidad (*SI*), señalización hormonal y resistencia a las enfermedades (Coates, 2006). En relación con el mecanismo de *SI*, se ha observado que, en muchas especies de plantas, durante el proceso de polinización los granos de polen se depositan sobre los pistilos de las flores de la misma planta o plantas genéticamente idénticas, disparando los mecanismos de autoincompatibilidad. En plantas, las proteínas U-box están también involucradas en muchas vías específicas de señalización (González-Lamothe *et al.*, 2006), desempeñando roles en el control tanto de autoincompatibilidad como de pseudoautoincompatibilidad (Liu, 2007); así como también en respuestas al estrés abiótico (Yan, 2003).

La polinización es un paso crucial del ciclo de vida de las angiospermas, la más importante interacción célula-célula en plantas con flores y este es el sistema de reproducción sexual que han adoptado las plantas con flores, donde el pistilo está completamente desarrollado y compuesto por el estigma, el estilo y el ovario (Dong, 2005). Este proceso es influenciado por varios factores: tipos de estigmas (por ejemplo estigma seco o húmedo) y receptividad del estigma (definido como la capacidad de capturar polen por adhesión). El estadio apropiado del desarrollo del estigma es crucial para la receptividad: sobre el estigma maduro, el polen maduro puede adherirse, hidratarse y germinar. Una polinización eficiente entre los granos de polen y el pistilo dependen de la capacidad del grano de polen de adherirse eficientemente a la superficie estigmática (Wheeler, 2001).

La polinización puede ser clasificada en dos categorías, autopolinización o autogamia y polinización cruzada o alogamia. En la naturaleza existe siempre un soporte para la polinización cruzada debido a que este proceso asegura el mantenimiento de las especies y contribuye a incrementar la variabilidad genética en función de proveer a las especies la adaptación a las nuevas condiciones ambientales

(Nasrallah *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2004). Para evitar la autofecundación y promover el cruzamiento, muchas plantas han adoptado mecanismos de *SI* (Huang, 2006). En las plantas *SI*, el polen no germina sobre un estigma que expresa los mismos alelos *S* (esterilidad) que el polen paterno (Kusaba, 2001).

Los miembros de las Brassicaceae poseen estigmas secos y selectividad temprana en la captura del polen luego de la polinización (Heslop-Harrison and Shivanna, 1977; Dickinson, 1995). Una vez que los granos de polen entran en contacto con la papila estigmática, sólo los granos de polen reconocidos como compatibles son aceptados, permitiendo a las plantas ignorar a los pólenes foráneos. Estas interacciones compatibles parecen ser específicos de especie dentro de la familia, pero claramente pueden ocurrir más allá del nivel de especies (Hulskamp *et al.*, 1995a). Por ejemplo, el éxito de las polinizaciones medido por la penetración de los tubos polínicos en el estigma, han sido observados en cruza interespecíficas e intergenéricas en las Brassicaceae (Sampson, 1962; Hiscock and Dickinson, 1993; Lelivelt, 1993).

Arabidopsis pertenece a la familia de las Brassicaceae y posee estigmas secos con papilas unicelulares grandes que interactúan directamente con el polen (Nasrallah, 2000). Los eventos secuenciales desde la adhesión del polen continuando con el crecimiento del tubo polínico a través del pistilo hasta el óvulo y la fertilización han sido documentados cuidadosamente a nivel ultraestructural en *Brassica spp* y *Arabidopsis thaliana* (Hill and Lord, 1987; Elleman and Dickinson, 1990; Elleman *et al.*, 1992; Kandasamy *et al.*, 1994; Hulskamp *et al.*, 1995b; Lennon *et al.*, 1998).

La interacción polen-pistilo mejor caracterizada, es la respuesta *SI* en *Brassica* (Heslop-Harrison and Shivana, 1977). La ruptura de la barrera de la *SI* en flores en estadios avanzados es un fenómeno conocido como pseudoautocompatibilidad o *SI* transitoria. Esta ha sido descrita como una estrategia de garantía reproductiva que permite la autopolinización cuando las oportunidades de cruzamiento se han agotado (Liu, 2007 and Tsuchimatsu *et al.*, 2010). El fenómeno de *SI* parece ser controlado esporófiticamente por un locus *S* simple, con múltiples alelos o variantes y con un conjunto de relaciones complejas de dominancia entre alelos (Bateman, 1955; Thompson and Tylor, 1966; Tarutani *et al.*, 2010). Sus componentes son el determinante masculino: la proteína rica en cisteína locus-*s SCR* (Suzuki *et al.*, 1999; Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000; Takayama *et al.*, 2001 and Shiba *et al.*, 2001); y la determinante femenina: la glicoproteína del locus-*s SLG*, secretada por el estigma hacia la pared celular; el receptor quinasa de la proteína del locus-*s SRK* localizado en la membrana plasmática del estigma y su blanco, la proteína con repeticiones ARM 1: ARC1, también producida en el estigma (Nasrallah, 2000).

ARC1 es una proteína requerida en el pistilo de *Brassica* para el rechazo del polen autoincompatible. Esta proteína funciona corriente debajo del SRK. ARC1 promueve la ubiquitinación y la degradación proteosomal de factores de compatibilidad en el pistilo, los cuales llevan al rechazo del polen (Stone *et al.*, 2003). ARC1, un regulador positivo de la autoincompatibilidad de *Brassica*, fue originalmente identificado en un rastreo de proteínas que interactúa activamente con el dominio SRK quinasa y une al dominio quinasa fosforilado a través de su dominio ARM (Gu *et al.*, 1998). El dominio SRK quinasa activa puede también causar la re-localización de ARC1 desde el citosol al proteasoma asociado al RE cuando es transitoriamente expresado en células BY-2 del tabaco (Stone *et al.*, 2003). Una segunda quinasa en la señalización de autoincompatibilidad de *Brassica*, la proteína quinasa citoplasmática Ser/Thr, designada como proteína quinasa del locus-M (MLPK), también causa la relocalización de ARC1 a la región perinuclear y fosforila muy eficientemente a ARC1 *in vitro*, sugiriendo que MLPK puede coregular a ARC1 en conjunción con SRK (Samuel *et al.*, 2008; Murase *et al.*, 2004 and Kakita *et al.*, 2007a; Kakita *et al.*, 2007b).

El modelo propuesto predice siete dominios ARM en el extremo C-terminal en ARC1 (Stone *et al.*, 2003). La súperfamilia de las proteínas con repeticiones ARM comparte una estructura tridimensional conservada de repeticiones armadillo de hélices alfa de superhélices de giro a derecha (Coates, 2007) y ellas median diferentes procesos celulares incluyendo transducción de señales, regulación del citoesqueleto, importación nuclear, regulación transcripcional y ubiquitinación (Samuel *et al.*, 2006). Existen cientos de proteínas eucariotas con estas unidades estructurales en tándem. El primer miembro

de la familia de genes caracterizados en detalle fue el fenotipo mutante del segmento de polaridad del gen *armadillo* de *Drosophila* (Riggleman *et al.*, 1989). En mamíferos, su homólogo β -catenina, se conoce que funciona en varios mecanismos que ocurren durante el desarrollo, regulando la expresión génica y la adhesión célula - célula (Coates, 2007).

La existencia de la familia de proteínas con repeticiones ARM en plantas, parece estar relacionada con diferentes funciones en transducción de señales y del desarrollo, incluyendo la morfogénesis, defensa y muerte celular, permitiendo predecir un mecanismo que ha sido conservado a través de la evolución eucariótica. Un gran subconjunto de proteínas de *Arabidopsis* (i. e. ARABIDILLO-1 and -2) similares a β -catenina contienen dominios ARM; ellas son parte de la familia de los U-box (PUB) de plantas (Mudgil *et al.*, 2004; Samuel *et al.*, 2006; Coates, 2007). En este trabajo se analizan, comparan y predicen las relaciones entre la súperfamilia de las proteínas con repeticiones ARM, presentes en el genoma de *Arabidopsis* (Acosta *et al.*, 2010a). Se han identificado secuencias nucleotídicas que codifican proteínas con repeticiones ARM similares a β -catenina, presentes in *A. thaliana*, en los que el ARNm no se verifican en plantas bajo condiciones normales de crecimiento, pero que comienzan a expresarse bajo la adición de giberelinas exógenas. La expresión del gen At5g01830 que codifica para el polipéptido PUB16 bajo tales condiciones, sugiere que puede estar involucrada en la activación de la floración vía la activación por giberelinas. Finalmente, se ha implementado un ensayo de polinización para detectar y estudiar sistemas de si y sc.

Materiales y métodos

Condiciones de crecimiento de las plantas

Las plantas de *A. thaliana* (L.) Ecotipo salvaje Columbia-0 [Col-0] fueron crecidas en una mezcla de suelo estéril (autoclavado antes de su uso), vermiculita-perlita y humus. Las cámaras de crecimiento fueron ajustadas a 23 °C y 70% de humedad con un fotoperiodo de luz / oscuridad bajo iluminación fluorescente suplementada por luz incandescente que produce una intensidad de 100-150 mE/m².s. La solución Hoagland modificada fue utilizada para irrigar las plantas de acuerdo a [44]: (NO₃)₂Ca.4H₂O 0,55 mM; NO₃K 0,52 mM; SO₄Mg.7H₂O 0,22 mM; PO₄H₂K 0,11 mM; BO₃H₃ 0,046 μ M; SO₄Zn.7H₂O 0,00076 μ M; SO₄Cu.5H₂O 0,00031 μ M; Cl₂Mn.4H₂O 0,0078 μ M; MoO₄Na₂.2H₂O 0,00045 μ M; SO₄Fe.7H₂O 9 mM; NaOH 25mM. La frecuencia de irrigación fue dos veces por semana con 200 ml de solución de Hoagland modificada por placa (15 cm X 55 cm) conteniendo 64 potes (una planta / pote).

Inducción de estreses

Para los tratamientos con ABA (100 μ M y 200 μ M durante 2, 4, 8, 11 o 24 horas) 50 flores seleccionadas al azar de diferentes plantas (estadio 13 de acuerdo a [48]), fueron colocadas en un disco de poliestireno con pequeños hoyos conteniendo soluciones de ABA. Todo el sistema fue colocado en una caja de Petri. Para ambas concentraciones de ABA y los 5 tiempos ensayados, el experimento fue replicado dos veces. Las flores tratadas con ABA fueron congeladas en N₂ líquido hasta su uso para extracciones de ARN o proteínas. Como controles del experimento la fitohormona ABA fue reemplazada por (bdH₂O).

El tratamiento con GA fue realizado en plantas florecidas (estadio 13 de acuerdo con [48]) usando el rociado triple cada dos días con 100 μ M y 1000 μ M de GA₃ en condiciones de crecimiento controladas en cámara. Los experimentos fueron replicados dos veces. De cada replica se colectaron aleatoriamente 50 flores estresadas y almacenadas en N₂ líquido hasta su uso para extracción de ARN y proteínas. Como control experimental, el GA fue reemplazado por el vehículo (bdH₂O).

El estrés salino fue realizado usando 50 mM y 100 mM de NaCl durante diez días desde el estadio de roseta hasta el de 8 hojas de acuerdo a [50]. Subsiguientemente, se retornó a la irrigación con la solución de Hoagland. Los experimentos fueron replicados dos veces. De cada réplica se colectaron

aleatoriamente 50 flores, las que fueron congeladas y almacenadas en N₂ líquido hasta su uso para extracción de ARN y proteínas. Como controles experimentales el NaCl fue reemplazado por solución de Hoagland.

2.2 Identificación de proteínas de la súperfamilia con repeticiones

ARM en el genoma de *Arabidopsis*

2.2.1 Análisis de Secuencias: Las secuencias fueron obtenidas a partir de la base de datos TAIR (The *Arabidopsis* Information Research: <http://www.arabidopsis.org/>) y el alineamiento local de secuencias múltiples fue realizado utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) disponible *on line* a través del NCBI (National Center for Biotechnology Investigation). El posterior alineamiento múltiple de secuencias fue realizado utilizando el programa bioinformático Clustal XI 2.0 [45] (<http://www.clustal.org/clustal2/>).

2.2.2 Predicción de la estructura secundaria: ésta fue predicha usando bases de datos disponibles en el sitio web. Los dominios presentes fueron definidos por las bases de datos SMART (Simple Modular Architecture Research Tool: <http://smart.embl-heidelberg.de/>), Pfam (domains Proteins and families protein database: <http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/pfam.html>) y UniProt (Universal Protein Resource: <http://www.uniprot.org/>).

2.2.3 Análisis filogenéticos: los árboles *neighbor joining* fueron construidos a partir de alineamientos múltiples usando el software *NJ plot* <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html> [46].

2.3 Ensayo de Polinización y microscopía de epifluorescencia

Para la microscopía óptica y de fluorescencia, flores individuales abiertas (los estadios florales fueron definidos antes [47] [48]) a partir inflorescencias control o estresadas fueron disecadas, los órganos externos fueron removidos bajo un microscopio de disección. Los test de polinización [49] fueron realizados sobre 30 pistilos, fijados por 1 hora en etanol/ácido acético 3:1 vol/vol]. Después del lavado con agua destilada los pistilos fueron ablandados en NaOH 1N por 10 min a 65 °C luego neutralizados en búfer fosfato salino 50 mM (pH 7.5). Finalmente las muestras fueron teñidas por 2 horas con azul de anilina (Sigma) en 50 mg/ml en 50 mM búfer fosfato salino (pH 7,5) y montado sobre portaobjetos. Como control de la tinción específica, se usaron estigmas no polinizados. Se examinaron y cuantificaron los granos de polen adheridos y penetrando en pistilos control comparados con los tratados con GA₃, por microscopía de epifluorescencia usando luz UV (filtro de excitación 395 nm y filtro de emisión 420 nm) (Olympus BX50).

2.4 RT-PCR

El ARN total fue aislado usando Trizol (Invitrogen). La calidad del ARN y su concentración fue medida por espectrometría UV a 260, 230 y 280 nm, su integridad fue chequeada en gel de agarosa a 1,5 % y tratada con ADNasa I, libre de ARNasas (Fermentas). ADNc de primera hebra fue sintetizado a partir de 2 µg de ARN total tratado con ADNasa en 20 µl de volumen de reacción, usando la transcriptasa reversa M-MuLV (Fermentas). Un décimo del ADNc *first-strand* fue usado como molde en 25 µl en una PCR de 25 ciclos (96 °C por 2 min, 94 °C por 1 min a 66,8 °C por 1 min y 72 °C por 1min) usando cebadores específicos. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados con luz UV antes de la síntesis del ADNc (*First Strand cDNA Synthesis*, Fermentas). Como control interno se utilizó β-tubulina (At5g62700). Cebadores

F1: GAGAATGCTGATGAGTGCATGG / R1: CAGGGAACCTCAGACAGCAAGT (para Tubulina) y

F2: AATCGCCGGGATCAAGCACC / R2: GTGGCGGCGGAAATCTGGAG (para At5g01830).

Extracción de ADN: 50 mg de tejido fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizados usando un micropilón. La extracción de ADN genómico fue realizada usando un equipo *NucleoSpin® Plant II Genomic ADN kit* de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para chequear la integridad genómica del ADN se corrió un gel de agarosa 1,5% [51].

2.5 Western blot

Los extractos de proteínas totales de *A. thaliana* fueron obtenidos por congelamiento en N₂ y triturado de 50 mg de tejido floral de acuerdo a [52]. La concentración de proteínas totales fue determinada en el sobrenadante por el ensayo de Bradford [53], usando BSA como estándar. Las muestras fueron cargadas en dos SDS-PAGE 10 % estándares [54], transferidas a membranas de PVDF y sobre estas se realizó el ensayo de western blot [51]. La elección del anticuerpo primario se basó en la evaluación previa (WebLogo 3.0 software: <http://weblogo.threeplusone.com/>) del grado de conservación de los residuos de aminoácidos en las repeticiones ARM de *A. thaliana* (no mostrado). Debido a su bajo nivel de conservación se usó un anticuerpo que cubre una amplia área de las repeticiones ARM. Se seleccionó el anticuerpo policlonal anti-ARMC8 (H-300: sc-98534, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) que reconoce 7 repeticiones ARM de las 14 presentes en la proteína. ARMC8 es un anticuerpo policlonal dirigido contra los residuos de aminoácidos 311-610 mapeados dentro de la región interna del ARMC8 de origen humano.

2.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando los resultados del test de polinización en tejidos florales estresados (+GA) y tejidos florales control (-GA). Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza usando el software SAS (Statistical Analysis Systems, SAS. Institute, Inc., 1999). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey de las diferencias medias ($\alpha = 0,05$) fue realizado por número de granos de polen por estigma en plantas tratadas con giberelinas (+GA) vs plantas control (-GA).

3. Resultados y discusión

En los estudios del proteoma de *Arabidopsis* se han encontrado un gran número de proteínas con repeticiones ARM y asociaciones de dominios semejantes a las repeticiones ARM [2] [42] [55] [56] [57]. La familia de proteínas con repeticiones ARM pertenece a las PUB y algunas de ellas comparten estructuras 3D muy similares. (Fig. 1; [2]). Tal como fue previamente postulado por Mudgil et al. 2004 [42], el poco número de repeticiones ARM observados en AtPUBs y la homología estructural 3D exhibida por PUB16, PUB17 y ARC1 en nuestros estudios, puede estar relacionado con la adquisición de funciones novedosas. La mayoría de las proteínas de la familia con repeticiones ARM funciona como ubiquitina ligasas E3 [56] en la regulación de los procesos de muerte celular [58] y defensa [59] mediante la degradación dependiente de proteasoma. Este patrón ubiquitina-proteasoma es usado por el patrón de señalización de GA, similar a lo que ocurre con auxina y jasmonato, para controlar la expresión génica a través de la degradación proteica [60] [61]. Ya que el GA se comporta como “florigen” para plantas de días largos [62] y siendo una clase de hormona involucrada en la regulación del desarrollo floral en *Arabidopsis* [63], se ha analizado cómo la expresión génica en floración es afectada tanto bajo condiciones de crecimiento normal como en los tratamientos con GA. Como fitohormona antagonista a GA, se decidió usar ABA, debido a que está altamente ligada a la expresión de ubiquitina ligasas E3 en otros modelos [64] [65].

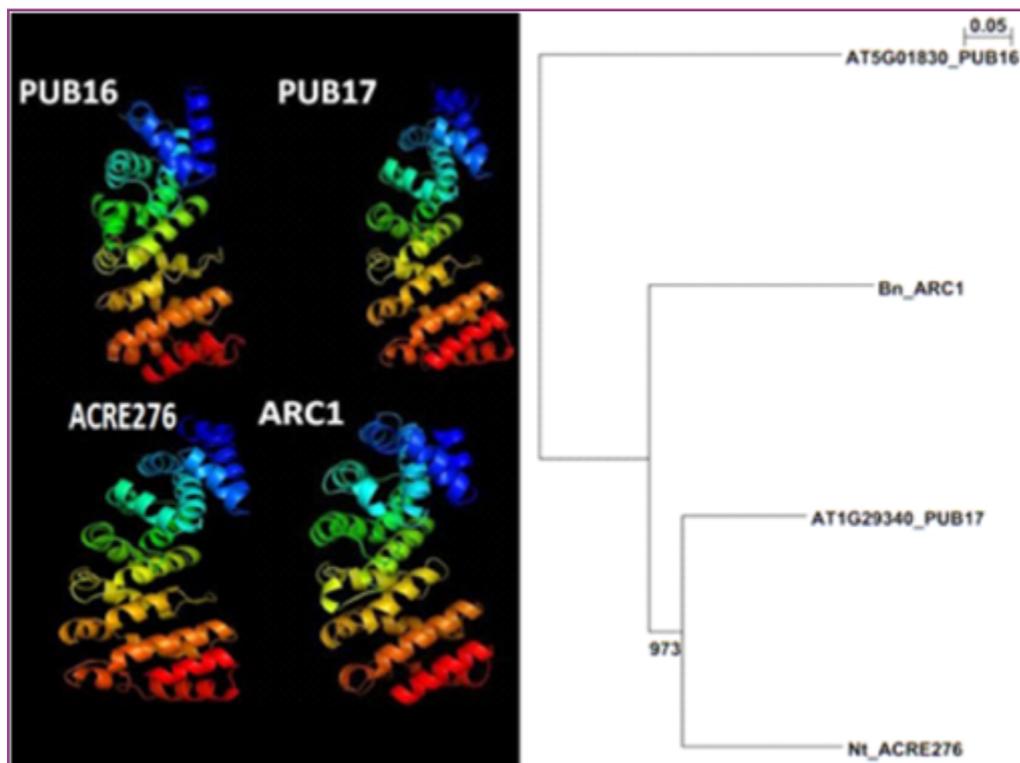


FIGURA 1. Estructura 3D y relaciones evolutivas predichas de las proteínas con repeticiones ARM

A la izquierda: visualización molecular utilizando la herramienta PyMol en la que pueden observarse las similitudes en el extremo C-terminal con repeticiones ARM con patrones de plegamiento de: ACRE276, ARC1, PUB16 y PUB17 (Acosta 2010). A la derecha: se muestra el árbol filogenético resultante de la relación evolutiva entre ellos. Se usó el software iTol disponible *on line* (Interactive tree of life [<http://itol.embl.de/upload.cgi>]) [77]. El algoritmo *Neighbor Joining* se usó para la construcción y se indica en cada nodo los valores de *bootstrap*. Las distancias evolutivas se muestran a la derecha de la figura

La caracterización de la súperfamilia de proteínas con repeticiones ARM, fue realizada utilizando la técnica de *western blot* usando como anticuerpo primario el ARMC8.

El ensayo de *immunoblot* permitió identificar la mayoría de las proteínas con repeticiones ARM de *A. thaliana*, agrupadas en tres clústeres bien definidos en todas las plantas estresadas (30 a 37 kDa; 55 a 60kDa y 75 a 80 kDa). Por el contrario, se observaron solo dos bandas en condiciones de crecimiento normales (55 a 60kDa y 75 a 80 kDa) (no mostrado).

Para determinar si esta es una única proteína o un clúster, se comparó el peso molecular de los 113 *loci* para polipéptidos putativos disponible en el sitio web TAIR. De acuerdo a esto, los candidatos fueron agrupados en 3 clústeres de pesos moleculares: grupo A, entre 75 a 80 kDa; grupo B, entre 55 a 60 kDa; y grupo C, entre 30 a 37 kDa. El grupo A corresponde a cinco proteínas con repeticiones ARM putativas: AT5G01830, AT1G60190, AT5G67340, AT4G31520 y AT4G36550; el grupo B corresponde a las seis proteínas con repeticiones ARM putativas: AT1G23940, AT4G31890, AT5G50900, AT5G22820, AT2G45720 y AT3G1518; y el grupo C corresponde a ocho proteínas con repeticiones ARM putativas: AT3G43260, AT4G15830, AT5G11550, AT3G58180, AT1G08315, AT5G14510, AT3G01450 y AT1G15165. A partir de este estudio podemos remarcar dos hechos importantes: primero, la expresión de todas las proteínas con repeticiones ARM de los grupos A y B se incrementó en las condiciones de estrés y segundo, la aparición de una nueva banda correspondiente al grupo C sólo condiciones de estrés. A partir de estos resultados puede concluirse que en grupo C se encontrarían las proteínas con

repeticiones ARM expresadas específicamente en el tejido floral bajo las condiciones de estrés evaluadas.

A continuación se realizó una búsqueda bioinformática en función de decidir cuál de los tres grupos de proteínas putativas con repeticiones ARM debe ser enfocada para los estudios de expresión génica. Se realizó el alineamiento de 113 loci para los polipéptidos putativos disponibles en el sitio web TAIR comparando sus secuencias de residuos de aminoácidos con los de ARC1. Esta comparación produjo 57 candidatos finales, de los cuales sólo 19 poseen secuencias U-box además de las secuencias repeticiones ARM. Dentro de este grupo hay dos proteínas cuyas secuencias están estrechamente relacionadas a ARC1: AT1G29340 (PUB17) y AT5g01830 (PUB16), de las que PUB17 es ampliamente conocida y estudiada, seguida de PUB16. PUB17 actúa como una ubiquitina ligasa E3 putativa y contiene cuatro repeticiones ARM y un dominio U-box. Su homólogo funcional ACRE276 es requerida en muerte celular y defensa en Solanaceae [59]. El alineamiento BLASTp ARC1/PUB17 produce 58 % de identidad y 74 % de similitud (valor-E = 0), mientras que ARC1/PUB16 exhibe un 34 % de identidad y un 51 % de similitud (valor-E = 1e-75). Los porcentajes de identidad obtenidos a partir del programa bioinformático ClustalX fueron: PUB16/ARC1: 31; ACRE276/PUB16: 35; PUB17/PUB16: 36; ACRE276/ARC1: 53; PUB17/ARC1: 60 y ACRE276/PUB17: 68 (Fig. 2). PUB16 contiene tres repeticiones ARM y un dominio U-box, así puede inferirse que puede funcionar como ubiquitina ligasa E3. Sin embargo, la similitud de los residuos de aminoácidos no permite deducir funciones similares en los mecanismos de reconocimiento en *B. napus* y *A. thaliana*.

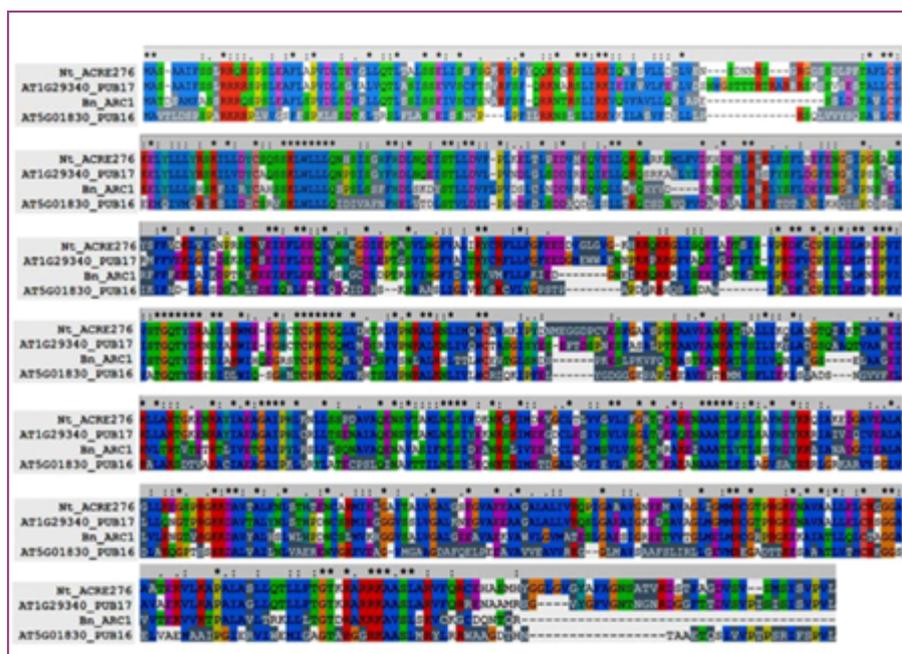


FIGURA 2. Alineamientos múltiples entre ACRE276, ARC1, PUB17 y PUB16

Las secuencias alineadas fueron: Nt_ACRE276, Bn_ARC1, At1g29340_PUB17 y At5g01830_PUB16. El esquema de colores por defecto es el establecido de acuerdo a ClustalX. En cajas grises muestra segmentos de bajo score. Un “*” (asterisco) indica posiciones que tienen un residuo único y completamente conservado. A “:” indica conservación entre grupos de propiedades muy similares – con scores > 0,5 en la matriz de PAM Gonnet 250. Un “.” indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares - scores =< 0,5 en la matriz Gonnet PAM 250

PUB17 es una ubiquitina ligasa E3 y ha sido postulado que forma un complejo de señalización con una quinasa similar a SRK1 análoga al complejo SRK/ARC1/ tioredoxina de *B. napus* durante el rechazo del polen autoincompatible en *Brassica* [36] [66].

Dado que PUB17 ha sido completamente caracterizada y su posible función ha sido inferida [59], se decidió estudiar PUB16, que de acuerdo al alineamiento y el análisis filogenético es otra proteína con repeticiones ARM similar a ARC1 de *A. thaliana*.

PUB16 podría pertenecer a las proteínas con repeticiones ARM del grupo A detectado en el western blot y su caracterización hipotética fue realizada usando la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) que provee libremente una fuente de la secuencia de proteínas e información funcional. Las cinco secuencias pertenecientes al grupo A (AT4G31520, AT5G01830, AT1G60190, AT5G67340 y AT4G36550) sólo han sido evidenciadas a nivel transcripcional. De acuerdo a estos resultados, no se puede establecer cuál de los cinco posibles péptidos corresponden a la banda de expresión observada en los resultados de nuestros *western blot* y deberán ser clarificados en experimentos futuros.

Consecuentemente, como un primer paso se decidió comenzar los estudios para evaluar los niveles de expresión de PUB16 a nivel transcripcional en diferentes condiciones de estrés y en condiciones normales en los mismos estadios de floración. Los estudios de expresión usando técnicas de RT-PCR para estudios de semi-cuantificación de PUB16 revelaron que en presencia de GA₃ 1000 µM, se da una significativa expresión génica de esta molécula; mientras que no existe expresión en condiciones normales (-GA) o bajo tratamiento con ABA (Fig. 3) o con NaCl (no mostrado).

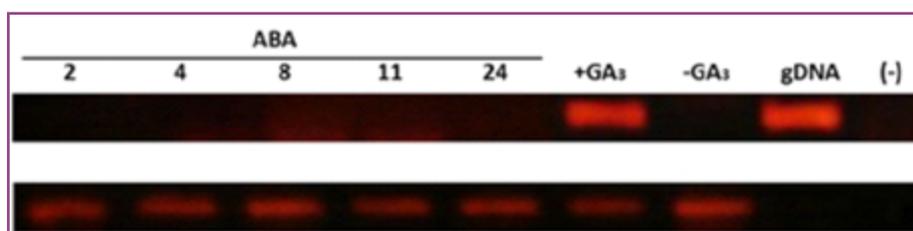


FIGURA 3. Geles de agarosa de RT-PCR teñidos con bromuro de etidio. Amplificación de dos productos: 241 pb (PUB16, arriba) y 151 pb (control interno β -tubulina, debajo). El tratamiento con ABA 100 µM fue realizado por 2, 4, 8, 11 y 24 horas pero sólo se expresó el control interno, así como también en condiciones normales (-GA). Solo con GA₃ 1000 µM (+GA) se observó la expresión del gen de PUB16. Control positivo: gDNA como molde de PCR; control negativo: PCR sin cDNA molde (-). También se realizaron controles de la RT-PCR: ARN tratado con y sin ADNasa sujetos a retro-transcripción (no mostrado)

Recientes estudios realizados por Griffiths *et al.*, 2007 [67] han demostrado que los genes involucrados en el proceso de floración solo son expresados si el sistema de represión llevado adelante por la proteína nuclear DELLA es desensamblado por el patrón de señalización de GA. De acuerdo a esto, el polipéptido PUB16 podría estar involucrado en el patrón de regulación de la degradación por proteosoma mediada por la ubiquitina ligasa E3, específicamente, la regulación (que promueve la disminución de su expresión) involucrada en la inhibición de sc.

Asimismo, los fenotipos de las plantas también fueron afectados por la adición de GA exógeno. Plantas estresadas (+GA) exhiben menos altura y florecen antes que las crecidas normalmente (-GA). Este cambio en la altura de las plantas corresponde al clásico efecto de GA que regula el crecimiento e influencia varios procesos del desarrollo incluyendo la elongación del tallo. Estos resultados son consistentes con estudios previos que demostraron que experimentos fisiológicos y genéticos en *Arabidopsis*, han implicado al GA en el patrón autónomo de floración. La aplicación exógena de GA acelera la floración en *Arabidopsis* de tipo salvaje [68].

Finalmente, el análisis morfológico fue realizado para confirmar si existe un incremento significativo en los porcentajes de autopolinización en las flores rociadas con GA. Este método permitió corroborar que *A. thaliana* L. es autocompatible con granos de polen producidos por la misma planta. Las plantas

rociadas con GA exhiben mayor número de granos de polen germinados sobre la superficie estigmática (+GA) que las plantas control (-GA) (Fig. 4). Es bien conocido que la fitohormona GA regula y participa en el desarrollo y fertilidad de las flores de *A. thaliana* L. Sin embargo, no está claro cómo GA regula los últimos estadios del desarrollo floral luego del establecimiento de sus identidades dentro de los meristemas florales [63].

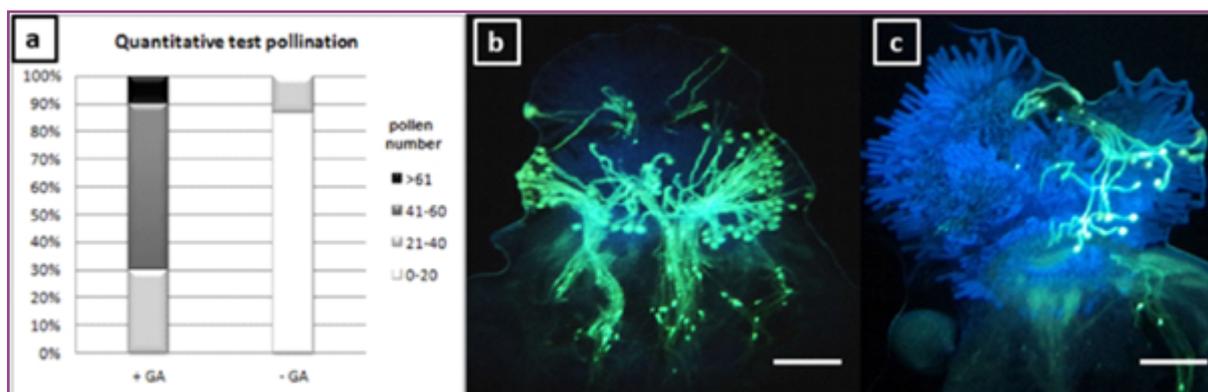


FIGURA 4. Polinización en pistilos con y sin GA

(a). Análisis de varianza usando el test de Tukey de diferencia de las medias. Dicho test permitió determinar que la aplicación de GA₃ (+GA) en las plantas incrementa significativamente ($p < 0.001$) el número de granos de polen sobre los pistilos comparados con las plantas control (-GA). El análisis cuantitativo se realizó usando flores autopolinizadas (estadio 13, Bowman 1994), las que fueron clasificadas en cuatro clases de acuerdo al número de granos de polen (adheridos y tubos penetrando el estigma): 0-20, 21-40, 41-60 and >60 granos de polen. Puede observarse un incremento notable en el número de granos de polen germinados en condiciones de estrés en los granos de polen teñidos con azul de anilina, (b). +GA y (c). -GA. Barra = 50 μ m (ImageJ: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Nuestros resultados muestran que el ARNm para PUB16 fue específicamente detectado bajo estrés hormonal por GA exógeno (+GA) mientras que estuvieron ausentes sin GA (-GA). Adicionalmente por western blot se observó una expresión incrementada a nivel proteico en los cinco polipéptidos putativos clasificados en el grupo A, entre los cuales podría estar expresado nuestro candidato PUB16.

Los estudios bioinformáticos *in silico*, permitieron demostrar que las estructuras secundarias y terciarias de la proteína PUB16 putativa, PUB17 y ARC1 exhiben un patrón altamente similar, sugiriendo funciones similares para las tres moléculas.

La proteína PUB17, como ACRE276 (homólogo funcional de proteínas con repeticiones ARM en *Nicotiana tabacum*) podría tener actividad ubiquitina ligasa E3 requerida para la muerte celular en plantas. PUB16 de modo similar a ARC1, en sistemas autoincompatibles, puede ser clave en el patrón de señalización en sistemas autocompatibles y sus niveles de expresión podrían ser regulados por GA.

El presente trabajo sugiere que GA promueve la expresión del gen PUB16; sin embargo, ya que su sustrato aún no ha sido identificado, no puede proponerse cómo actúa. Los estudios de transducción de la señalización vía GA, usando métodos genéticos, han llevado a la identificación de componentes de señalización positivos y negativos [69]. Entre estos, los más exhaustivamente caracterizados son las proteínas DELLA. El mecanismo molecular por el cual las proteínas DELLA suprimen la respuesta a GA no está aún claro. El genoma de *A. thaliana* contiene cinco genes DELLA (RGA, GAI, RGL1, RGL2, and RGL3). Recientemente, se ha descubierto una cascada principal de señalización vía GA [70]: GA se une a su receptor soluble GA IN SENSITIVE DWARF1 (GID1), disparando su interacción con las proteínas DELLA [67]. Esta interacción estimula la unión de la proteína a una ubiquitina ligasa E3 vía proteínas F-box específicas, conduciendo a poliubiquitinación y degradación a la proteína DELLA por el proteosoma 26S.

Mientras que esta relativamente simple cascada de señalización por GA involucra tres macromoléculas principales: un receptor, una proteína DELLA y una proteína F-box, otros estudios han identificado factores adicionales que afectan la respuesta a GA [71]. Sería sumamente interesante clarificar si los genes ubiquitin ligasas E3 son blanco de las proteínas DELLA o si también pueden interactuar con estas proteínas como cofactores específicos. Los estudios de interacciones han sido usados para identificar candidatos [72] y los ensayos *in vitro* de ubiquitinación pueden usarse para confirmar la capacidad de las ligasas E3 para ubiquitinar estos substratos potenciales [73], [74], [75]. Sin embargo, al presente no se han identificado el blanco potencial de ARC1.

Adicionalmente a la identificación de los roles biológicos de proteínas PUB putativas, la comprensión de cómo son activadas estas ligasas E3 es un paso importante en la dilucidación de sus funciones fisiológicas.

Conclusiones

La súperfamilia de proteínas con repeticiones ARM podría estar involucrada en interacciones proteína-proteína. Su análisis en esta planta modelo, permitirá una mejor comprensión del mecanismo de polinización a nivel celular y su posible participación en su vía de señalización. El patrón de señalización vía GA, aunque es poco conocido, se cree que está relacionado a la fertilidad de las plantas. Por este motivo, resulta de interés estudiar que genes son expresados tanto bajo condiciones normales como bajo estrés hormonal y asimismo resulta importante caracterizar temporal y funcionalmente su comportamiento.

En este trabajo, la comparación de secuencias reveló homologías estructurales significativas entre ARC1 y PUB16. Esta estrecha relación permite inferir que pueden existir patrones de transducción similares en dos especies de Brassicaceae diferencialmente involucrados en la regulación de la hidratación del grano de polen en los mecanismos de reconocimiento del polen propio y no propio. Los resultados obtenidos, muestran que el agrupamiento de la súperfamilia de proteínas con repeticiones ARM de *A. thaliana* está compuesto por tres grupos de acuerdo a los pesos moleculares. De acuerdo a nuestros estudios de expresión génica, la adición exógena de GA promueve la expresión génica de PUB16, aunque esto no ocurre bajo condiciones normales de crecimiento o en presencia de ABA. Estos resultados son también consistentes con reportes previos donde se postula que la expresión génica de la súperfamilia de proteínas con repeticiones ARM en plantas está sujeta tanto a estreses hormonales [76] o salinos [50]. Por otra parte, estos resultados sugieren que *A. thaliana* podría usar algún patrón de señalización vía GA que favorece la autopolinización, la fructificación y la producción de semillas bajo estrés hormonal. El análisis más profundo de la súperfamilia de proteínas con repeticiones ARM podría mejorar la comprensión de su rol biológico relacionado con diferentes vías de señalización.

Referencias

- [1] Coates, J.C. (2007) Plant Cell Monographs: Plant Growth Signalling Ed. Bogre and Beemster, Springer, 299-314.
- [2] SAMUEL, M., SALT, J., SHIU, S. AND GORING, D. (2006) Multifunctional ARM repeat domains in plants. International Review of Cytology, 253, 1-26.
- [3] COATES, J.C., LAPLAZE, L. AND HASELOFF, J. (2006) Armadillo-related proteins promote lateral root development in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 103, 1621–1626.
- [4] GONZÁLEZ-LAMOTHE, R., TSITSIGIANNIS, D.I., LUDWIG, A.A., PANICOT, M., SHIRASU, K. AND JONES, J.D.G. (2006) The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. The Plant Cell, 18, 1067–1083.

- [5] LIU, P., SHERMAN-BROYLES, S. AND NASRALLAH, M.E. (2007) A cryptic modifier causing transient self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 17, 734–740.
- [6] YAN, J., WANG, J., LI, Q., HWANG, J.R., PATTERSON, C. AND ZHANG, H. (2003) AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132, 861–869.
- [7] DONG, J., KIM, S.T. AND LORD, E.M. (2005) Plantacyanin plays a role in reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138, 778–789.
- [8] WHEELER, M.J., FRANKLIN-TONG, V.E. AND FRANKLIN, F.C.H. (2001) The molecular and genetic basis of pollen–pistil interactions. *New Phytologist*, 151, 565–584.
- [9] NASRALLAH, M.E., LIU, P., SHERMAN-BROYLES, S., BOGGS, N.A. AND NASRALLAH, J.B. (2004) Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: implications for the evolution of selfing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 16070–16074.
- [10] SANCHEZ, A.M., BOSCH, M., BOTS, M., NIEUWLAND, J., FERON, R. AND MARIANI, C. (2004) Pistil Factors Controlling Pollination. *The Plant Cell*, 16, S98–S106.
- [11] HUANG, J., ZHAO, L., YANG, Q. AND XUE, Y. (2006) AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *The Plant Journal*, 46, 780–793.
- [12] KUSABA, M., DWYER, K., HENDERSHOT, J., VREBALOV, J., NASRALLAH, J.B. AND NASRALLAH, M.E. (2001) Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the S locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *The Plant Cell*, 13, 627–643.
- [13] HESLOP-HARRISON, Y. AND SHIVANNA, K.R. (1977) The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of Botany*, 41, 1233–1258.
- [14] DICKINSON, H. (1995) Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. *Sexual Plant Reproduction*, 8, 1–10.
- [15] HULSKAMP, M., KOPCZAK, S.D., HOREJSI, T.F., KIHL, B.K. AND PRUITT, R.E. (1995) Identification of genes required for pollen–stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 8, 703–714.
- [16] SAMPSON, D.R. (1962) Intergeneric pollen–stigma incompatibility in Cruciferae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 4, 38–49.
- [17] HISCOCK, S.J. AND DICKINSON, H.G. (1993) Unilateral incompatibility within the Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (S)-locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 744–753.
- [18] LELIVELT, C.L.C. (1993) Studies of pollen grain germination, pollen-tube growth, micropylar penetration and seed set in intraspecific and intergeneric crosses within three Cruciferae species. *Euphytica*, 67, 185–197.
- [19] NASRALLAH, J.B. (2000) Cell–cell signaling in the self-incompatibility response. *Current Opinion of Plant Biology*, 3, 368–373.
- [20] HILL, J.P. AND LORD, E.M. (1987) Dynamics of pollen tube growth in the wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae) 2. Morphology, cytochemistry, and ultrastructure of transmitting tissues, and path of pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 74, 988–997.
- [21] ELLEMAN, C.J., DICKINSON, H.G. (1990) The role of the exine coating in pollen–stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytologist*, 114, 511–518.
- [22] ELLEMAN, C.J., FRANKLIN-TONG, V. AND DICKINSON, H.G. (1992) Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytologist*, 121, 413–424.
- [23] KANDASAMY, M.K., NASRALLAH, J.B. AND NASRALLAH, M.E. (1994) Pollen–pistil Interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development*, 120, 3405–3418.
- [24] HULSKAMP, M., SCHNEITZ, K. AND PRUITT, R.E. (1995b) Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 7, 57–64.

- [25] LENNON, K.A., ROY, S., HEPLER, P.K. AND LORD, E.M. (1998) The structure of the transmitting tissue of *Arabidopsis thaliana* (L.) and the path of pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, 11, 49–59.
- [26] TSUCHIMATSU, T., SUWABE, K., SHIMIZU-INATSUGI, R., ISOKAWA, S., PAVLIDIS, P., STADLER, T., SUZUKI, G., TAKAYAMA, S., WATANABE, M. AND SHIMIZU, K. (2010) Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature*, 464, 1342–1346.
- [27] BATEMAN, A.J. (1955) Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity*, 9, 52–68.
- [28] THOMPSON, K.F. AND TAYLOR, J.P. (1966) Non-linear dominance relationships between S-alleles. *Heredity*, 21, 345–362.
- [29] TARUTANI, Y., SHIBA, H., IWANO, M., KAKIZAKI, T., SUZUKI, G., WATANABE, M., ISOGAI, A., AND TAKAYAMA, S. (2010) Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 466, 983–986.
- [30] SUZUKI, G., KAI, N., HIROSE, T., FUKUI, K., NISHIO, T., TAKAYAMA, S., ISOGAI, A., WATANABE, M. AND HINATA, K. (1999) Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of Sg haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics*, 153, 391–400.
- [31] SCHOPFER, C.R., NASRALLAH, M.E. AND NASRALLAH, J.B. (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286, 1697–1700.
- [32] TAKAYAMA, S., SHIBA, H., IWANO, M., SHIMOSATO, H., CHE, F.S., KAI, N., WATANABE, M., SUZUKI, G., HINATA, K. AND ISOGAI, A. (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 1920–1925.
- [33] TAKAYAMA, S., SHIMOSATO, H., SHIBA, H., FUNATO, M., CHE, F.S., WATANABE, M., IWANO, M. AND ISOGAI, A. (2001) Direct ligand–receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 413, 534–538.
- [34] SHIBA, H., TAKAYAMA, S., IWANO, M., SHIMOSATO, H., FUNATO, M., NAKAGAWA, T., CHE, F., SUZUKI, G., WATANABE, M., HINATA, K. AND ISOGAI, A. (2001) A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiology*, 125, 2095–2103.
- [35] STONE, S.L., ANDERSON, E.M., MULLEN, R.T. AND GORING, D.R. (2003) ARC1 Is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *The Plant Cell*, 15, 885–898.
- [36] GU, T.S., MAZZURCO, M., SULAMAN, W., MATIAS, D.D. AND GORING, D.R. (1998) Binding of an ARM repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95, 382–387.
- [37] SAMUEL, M.A., MUDGIL, Y., SALT, J.N., DELMAS, F., RAMACHANDRAN, S., CHILELLI, A. AND GORING, D.R. (2008) Interactions between the S-domain receptor kinases and AtPUB-ARM E3 ubiquitin ligase suggest a conserved signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 147, 2084–2095.
- [38] MURASE, K., SHIBA, H., IWANO, M., CHE, F.S., WATANABE, M., ISOGAI, A. AND TAKAYAMA, S. (2004) A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*, 303, 1516–1519.
- [39] KAKITA, M., MURASE, K., IWANO, M., MATSUMOTO, T., WATANABE, M., SHIBA, H., ISOGAI, A. AND TAKAYAMA, S. (2007) Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *The Plant Cell*, 19, 3961–3973.
- [40] KAKITA, M., SHIMOSATO, H., MURASE, K., ISOGAI, A., TAKAYAMA, S. (2007) Direct interaction between the S-locus receptor kinase and M locus protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Plant Biotechnology*, 24, 185–190.
- [41] RIGGLEMAN, B., WIESCHAUS, E. AND SCHEDL, P. (1989) Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Development*, 3, 96–113.

- [42] MUDGIL, Y., SHIU, S.H., STONE, S.L., SALT, J.N. AND GORING, D.R. (2004) A large complement of the predicted *Arabidopsis* ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiology*, 134, 59–66.
- [43] ACOSTA, M.G., LANGHI, D., LASSAGA, S.L. AND CASCO, V.H. (2010a) Bioinformatics and morphological studies of pollination mechanism as a process of cell-cell adhesion in *Arabidopsis thaliana*. *Agricultural Science Magazine*, 14, 3-15.
- [44] EPSTEIN, E. (1972) *Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives*. J. Wiley and Sons, Inc., New York, 68-82.
- [45] THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. AND GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- [46] PERRIERE, G. AND GOUY, M. (1996) www-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, 78, 364-369.
- [47] SMYTH, D.R., BOWMAN, J.L. AND MEYEROWITZ, E.M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2, 755-767.
- [48] BOWMAN, J. (1994) *Arabidopsis: An atlas of morphology and development*. Springer-Verlag, New York, 258-259.
- [49] ESCHRICH, W. AND CURRIER, H.B. (1964) Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Technology*, 39, 308-309.
- [50] BANZAI, T., HERSHKOVITS, G., KATCOFF, D.J., HANAGATA, N., DUBINSKY, Z., AND KARUBE, I. (2002) Identification and characterization of mRNA transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differential display in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant Science*, 162, 499–505.
- [51] SAMBROOK, D.W. AND RUSSELL, J. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 102-114.
- [52] WEIGEL, D. (2002) *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold spring harbour Laboratory Press. New York, 102-145.
- [53] BRADFORD, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- [54] LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- [55] AZEVEDO, C., SANTOS-ROSA, M.J. AND SHIRASU, K. (2001) The U-box protein family in plants. *Trends in Plant Science*, 6, 354–358.
- [56] ANDERSEN, P., KRAGELUND, B.B., OLSEN, A.N., LARSEN, F.H., CHUA, N., POULSEN, F.M. AND SKRIVER, K. (2004) Structure and biochemical function of a prototypical *Arabidopsis* U-box domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 40053–40066.
- [57] WIBORG, J., O'SHEA, C. AND SKRIVER, K. (2008) Biochemical function of typical and variant *Arabidopsis thaliana* U-box E3 ubiquitin-protein ligases. *Biochem J* 413: 447–457
- [58] THOMAS SG, FRANKLIN-TONG VE (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen. *Nature*, 429, 305–309.
- [59] YANG, C.W., GONZÁLEZ-LAMOTHE, R., EWAN, R.A., ROWLAND, O., YOSHIOKA, H., SHENTON, M., YE, H., O'DONNELL, E., JONES, J.D.G. AND SADANANDOM, A. (2006) The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANTU-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *The Plant Cell*, 18, 1084–1098.
- [60] ITOH, H., UEGUCHI-TANAKA, M., SATO, Y., ASHIKARI, M. AND MATSUOKA, M. (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *The Plant Cell*, 14, 57–70.

- [61] SPARTZ, A.K., LEE, S.H., WENGER, J.P., GONZALEZ, N., ITOH, H., INZÉ, D., PEER, W.A., MURPHY, A.S., OVERVOORDE, P.J. AND GRAY, W.M. (2012) The *SAUR19* subfamily of *SMALL AUXIN UP RNA* genes promote cell expansion. *The Plant Journal* doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04946.x
- [62] KOMEDA, Y. (2004) Genetic regulation of time to flowering *Arabidopsis thaliana* *Annual Review of Plant Biology*, 55, 521–35.
- [63] YU, H., ITO, T., WELLMER, F. AND MEYEROWITZ, E.M. (2004) Floral homeotic genes are targets of gibberellins signaling in flower *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 7827–7832.
- [64] WEISS, D. AND ORI, N. (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiology*, 144, 1240-1246.
- [65] ACOSTA, M.G., AHUMADA, M.A., LASSAGA, S.L. AND CASCO, V.H. (2010b) Abiotic stress effect on gene expression of ARM repeats proteins in *A. thaliana*. *Book of Abstracts - XXIII Meeting Argentina Plant Physiology*, 1, 205.
- [66] CABRILLAC, D., COCK, J.M., DUMAS, C. AND GAUDE, T. (2001) The S locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, 410, 220–223.
- [67] GRIFFITHS, J., MURASE, K., RIEU, I., ZENTELLA, R., ZHANG, Z.L., POWERS, S.J., GONG, F., PHILLIPS, A.L., HEDDEN, P. AND SUN, T.P. (2007) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18, 3399-3414.
- [68] BLÁZQUEZ, M.A., GREEN, R., NILSSON, O., SUSSMAN, M.R. AND WEIGEL, D. (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *The Plant Cell*, 10, 791–800.
- [69] SUN, T.P. AND GUBLER, F. (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 197–223.
- [70] UEGUCHI-TANAKA, M., ASHIKARI, M., NAKAJIMA, M., ITOH, H., KATOH, E., KOBAYASHI, M., CHOW, T.Y., HSING, Y.I., KITANO, H. AND YAMAGUCHI, I. (2005) *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437, 693–698.
- [71] HARTWECK, L.M. AND OLSZEWSKI, N.E. (2006) gibberellin insensitive *DWARF1* is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *The Plant Cell*, 18, 278–282.
- [72] YEE, D. AND GORING, D.R. (2009) The diversity of PUB E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1109-1121.
- [73] CHO, S.K., CHUNG, H.S., RYU, M.Y., PARK, M.J., LEE, M.M., BAHK, Y.Y., KIM, J., PAI, H.S. AND KIM, W.T. (2006) Heterologous expression and molecular and cellular characterization of *CaPUB1* encoding a hot pepper U-BoxE3 ubiquitin ligase homolog. *Plant Physiology*, 142, 1664–1682.
- [74] CHO, S.K., RYU, M.Y., SONG, C., KWAK, J.M. AND KIM, W.T. (2008) *Arabidopsis* *PUB22* and *PUB23* are homologous U-box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress. *The Plant Cell*, 20, 1899–1914.
- [75] SHEN, G., YAN, J., PASAPULA, V., LUO, J., HE, C., CLARKE, A.K. AND ZHANG, H. (2007) The chloroplast protease subunit *ClpP4* is a substrate of the E3 ligase *AtCHIP* and plays an important role in chloroplast function. *The Plant Journal*, 49, 228–237.
- [76] ALONSO-RAMÍREZ, A., RODRÍGUEZ, D., REYES, D., JIMÉNEZ, J.A., NICOLÁS, G., LÓPEZ-CLIMENT, M., GÓMEZ-CADENAS, A. AND NICOLÁS, C. (2009) Cross-talk between gibberellins and salicylic acid in early stress responses in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Signal Behavior*, 4, 750–751.
- [77] LETUNIC, I. AND BORK, P. (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an on line tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23, 127–128.