

**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Cinvestav Irapuato

**“Caracterización funcional del gen *DRINK ME (bZIP30)* en la
regulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*”**

Tesis que presenta
M.C. Paulina Lozano Sotomayor

Para Obtener el Grado de
Doctora en Ciencias

En la Especialidad de
Biología de plantas

Director de la Tesis: Dr. Stefan de Folter

Irapuato, Gto.

Julio 2016

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas, el cual pertenece a la Unidad de Genómica Avanzada CINVESTAV-Irapuato, en el programa de posgrado en Biotecnología de Plantas, bajo la asesoría del Dr. Stefan de Folter.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto que aquí se presenta, durante el periodo Agosto 2010- Agosto 2014 a través de la beca CONACYT 219883.

A la Unidad de Genómica Avanzada por facilitar los medios y la infraestructura necesaria para el desarrollo de los estudiantes de posgrado.

Al Dr. Stefan de Folter por recibirme en su equipo de trabajo, por confiar en mi, por su paciencia y por aceptar el compromiso de llevar a término mi formación como estudiante de posgrado.

A la Dra. Nayelli Marsch Martínez por toda la asesoría recibida y por haber contribuido activamente en la realización de este proyecto

A los miembros de mi comité de revisores: **Dr. Stewart Gillmor, Dr. Raúl Alvarez, Dra. Gertrud Lund, Gerardo Acosta y Dr. Rafael Montiel** por sus críticas constructivas, su trabajo y empeño en el seguimiento de mi proyecto.

Al Dr. Ricardo Chávez Montes por toda su ayuda-asesoría que fue fundamental en el aspecto laboral y personal durante mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Francisco Madueño y Marina Silvestre de la universidad Politécnica de Valencia-España, por su valiosa colaboración a este proyecto.

A la M.C. Karla Lorena González Aguilera por su labor como Señorita Auxiliar y facilitarnos el acceso a reactivos y equipo en el trabajo cotidiano en el laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas.

A Dora Anguiano y Diana Barbosa por su invaluable y siempre efectiva labor en la realización de trámites administrativos

A los miembros del Laboratorio de Genómica Funcional del desarrollo de Plantas: Victor, Irepan, Karla, Ricardo, Humberto, Dani Gondolieris, Bianca Galliani (estancia), Virgy Borelli (estancia), Paulo Cázarez, Joana, Gerardo Armas, Jeaneth, Noé, Valentín, Marisela, Carlos, Yolis y Fatis. Por el trabajo en equipo, por la crítica, la ayuda y por hacer muy grata la estancia en el laboratorio.

A la Dra. Maria Jazmín Abraham Juárez y la M.C. Bianca María Galliani por su asesoría en los experimentos de histología.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por escucharme y permitirme llegar a este momento

A mis padres: Rosa María Sotomayor y Aurelio Lozano, por la vida, por no bajar la guardia, por su infinito amor, por exigir, por aceptarme y motivarme a cumplir metas

A mis hermanas Rocío y Claudia, por ser las mejores compañeras de vida, por su apoyo y su amor incondicional

A mis sobrinos: Juan Ma, Dario, Israel, Sofi y Romi por llenar mi corazón de amor y ser mi motor siempre

A mi esposo Marco Antonio García Revilla, por encontrarme y cambiar mi vida, por ser mi persona favorita y hacer de la vida algo muy bello

A Ma. Felicitas Oliva Macías †, por su ejemplo, su fortaleza y todas las palabras no dichas que hicieron eco y me ayudaron a superar las dificultades de los últimos 6 años

A Luis y a Pandis, por cuidarme y por ser la mejor parte de todos los días

INDICE

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Organización de tejidos meristemáticos en Arabidopsis.....	3
2.2 Ciclo celular.....	7
2.3 Desarrollo reproductivo en Arabidopsis.....	11
2.4 La mutante <i>pit1-D</i>	14
2.5 Familia de factores de transcripción tipo bZIP.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos específicos.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento.....	19
6.2 RT-PCR semicuantitativo.....	20
6.3 Construcción de líneas sobreexpresantes.....	20
6.4 Selección de mutantes sencillas y dobles.....	21
6.5 Mediciones y conteos.....	22
6.6 Microscopía.....	22
6.7 Histología.....	22
6.8 Hibridación <i>IN-SITU</i>	23
6.9 Análisis filogenético.....	23
6.10 Análisis estadísticos.....	24
6.11 Análisis de microarreglos.....	24
6.12 Análisis de dos híbridos en levadura (Y2H) y complementación bimolecular de fluorescencia.....	25
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Caracterización de <i>bZIP30</i> (<i>DRINK ME – DKM</i>), patrón de expresión, localización celular de la proteína y fenotipo de sobreexpresión.....	25
7.2 Caracterización de la pérdida de función del gen <i>DKM</i> y su parálogo <i>DRINK ME LIKE</i> (<i>DKML</i>).....	31
7.3 Análisis de microarreglos en plantas <i>35S::DKM</i>	38
7.4 Inducción de la transcripción de los genes <i>JAG</i> y <i>OFPI</i>	40
7.5 Versión represora de <i>DKM</i>	41
7.6 Efecto de la alteración de la expresión de <i>DKM</i> en tejidos meristemáticos.....	43
7.7 Interacciones proteína-proteína.....	49
8. DISCUSIÓN.....	51
8.1 El gen <i>DKM</i> regula negativamente el crecimiento y desarrollo reproductivo de Arabidopsis.....	51
8.2 <i>DKM</i> afecta división y elongación celular.....	52
8.3 <i>DKM</i> como un regulador del desarrollo del meristemo.....	55
9. CONCLUSIONES.....	58
10. PERSPECTIVAS.....	59
11. BIBLIOGRAFÍA.....	60
12. ANEXOS.....	72
12.1 Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.....	70
12.2 Datos de expresión del gen <i>DKM</i> en la plataforma GENEVESTIGATOR.....	71
12.3 Datos de expresión del gen <i>DKML</i> en la plataforma GENEVESTIGATOR.....	72
12.4 Mapa del plásmido CZN252.....	73

12.5 Factores de transcripción sobreexpresados (z-score ≥ 2) y reprimidos (z-score ≤ 2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM	74
12.6 Genes relacionados a hormonas que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ 2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM.....	77
12.7 Genes que codifican para proteínas de la familia P450 que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ 2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM.....	79
12.8 Genes con función en ciclo celular que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ 2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM.....	79
12.9 Genes con función en pared celular que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ 2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM.....	81

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organización del meristemo apical de inflorescencia (SAM) y del meristemo apical radicular (RAM).....	4
Figura 2. Representación de las rutas básicas que controlan las transiciones G1-S y G2-M durante el ciclo celular en Arabidopsis.....	8
Figura 3. Desarrollo reproductivo de Arabidopsis.....	13
Figura 4. Comparación entre plantas Ws-3 y <i>pit1-D</i> a los 60 días de edad.....	15
Figura 5. Comparación entre el fenotipo más frecuente en flores <i>pit1-D</i> y flores Ws-3.....	16
Figura 6. Localización del elemento activador (AIE) en <i>pit1-D</i>	17
Figura 7. Expresión de <i>DKM</i> durante el ciclo de vida de Arabidopsis.....	26
Figura 8. Análisis del perfil de expresión de <i>DKM</i> utilizando hibridación <i>in situ</i> ...	27
Figura 9. Detección de la localización celular de la proteína DKM en raíces de plántulas de Arabidopsis.....	27
Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de <i>DKM</i>	28
Figura 11. La sobreexpresión de <i>DKM</i> afecta la fertilidad.....	30
Figura 12. Esquema de la localización del T-DNA en la línea insercional para el gen <i>DKM</i>	31
Figura 13. Árbol filogenético del grupo I de la familia de factores de transcripción tipo bZIP.....	32
Figura 14. Perfil de expresión de los genes <i>DKM</i> y <i>DKML</i> en tejidos reproductivos.....	33
Figura 15. Esquema de la localización del T-DNA en la línea insercional para el gen <i>DKML</i>	34
Figura 16. Efecto de la pérdida de función y sobreexpresión de <i>DKM</i> en elongación radicular.....	35
Figura 17. Fenotipo de plantas <i>35S::DKM</i> , <i>dkm</i> , <i>dkm</i> , <i>dkm dkml</i> y plantas silvestres a los 19 días de edad.....	36
Figura 18. Fenotipos analizados en plantas silvestres y mutantes <i>dkm</i> , <i>dkml</i> y <i>dkm dkml</i>	37

Figura 19. Ensayo de inducción de la sobreexpresión de <i>DKM</i>	40
Figura 20. Análisis del patrón de expresión del promotor del gen <i>JAG</i> en el fondo <i>35S::DKM</i> , a diferentes estadios de desarrollo del gineceo.....	41
Figura 21. Fenotipos de plantas <i>35S::DKM:SRDX</i>	42
Figura 22. Alteraciones en el meristemo apical de plantas <i>35S::DKM</i>	43
Figura 23. Comparación del meristemo radicular de plántulas <i>Ws-3</i> y <i>35S::DKM</i> .	44
Figura 24. Análisis del dominio de proliferación celular y de transición en el meristemo radicular de plántulas <i>35S::DKM</i>	45
Figura 25. Comparación del meristemo radicular de plántulas <i>Col-0</i> , <i>dkm</i> , <i>dkml</i> y <i>dkm dkml</i>	46
Figura 26. Interacciones proteína-proteína.....	48

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Análisis estadístico de los fenotipos estudiados en plantas sobreexpresantes y con pérdida de función para el gen <i>DKM</i> y su ortólogo <i>DKML</i> ...	28
Tabla 2. Selección de genes expresados diferencialmente en plantas <i>35S::DKM</i>	39

1. RESUMEN

En el presente trabajo se describe la función del gen *DRINK ME* que afecta negativamente el desarrollo de *Arabidopsis*. El gen *DRINK ME* (*DKM*; bZIP30) es un miembro de la familia de factores de transcripción tipo bZIP que se expresa en tejidos meristemáticos como el meristemo de inflorescencia (IM), meristemo floral (FM) y el meristemo del margen del carpelo (CMM). La alteración en la expresión de *DKM* afecta el tamaño del meristemo apical (SAM), la organización del meristemo radicular (RAM), la elongación radicular en plántulas y en el desarrollo reproductivo afecta el tamaño del IM, el número de botones florales y el correcto desarrollo del gineceo, que es la estructura reproductiva femenina y que resulta determinante para la fertilidad y la reproducción sexual. Resultados de microarreglos indican que la sobreexpresión de *DKM* afecta la expresión de genes previamente reportados como reguladores del ciclo celular, pared celular, la iniciación de órganos, elongación celular, homeostasis de hormonas y la actividad meristemática. Dicho resultado junto con el fenotipo de plantas que sobre-expresan la versión dominante negativa de *DKM* nos permite proponer que *DKM* funciona principalmente como un represor de la transcripción. Por otro lado, *DKM* puede interactuar en levadura y en planta con proteínas involucradas en el mantenimiento del SAM como WUSCHEL, KNAT1/BP, KNAT2 y JAIBA, además de interactuar con proteínas involucradas en el desarrollo del tejido medio del gineceo como HECATE, BELL1 y NGATHA1. En conjunto, nuestros resultados demuestran la relevancia de *DKM* como regulador negativo del crecimiento y desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*.

ABSTRACT

Here, we describe an uncharacterized gene that negatively influences Arabidopsis development. *DRINK ME (DKM; bZIP30)* is a member of the bZIP transcription factor family, and is expressed in meristematic tissues such as the inflorescence meristem (IM), floral meristem (FM), and carpel margin meristem (CMM). Altered *DKM* expression affects shoot apical meristem (SAM) size, root apical meristem (RAM) organization, root length in seedlings and in reproductive phase the IM size, floral bud number and correct development of the gynoecium, which is the female reproductive structure and is determinant for fertility and sexual reproduction. A microarray analysis indicates that *DKM* overexpression affects the expression of cell-cycle, cell wall, organ initiation, cell elongation, hormone homeostasis, and meristem activity genes. This result and the phenotype of plants that overexpress the dominant negative version of *DKM* led us to propose that this gene works principally as a repressor. Furthermore, *DKM* can interact in yeast and *in planta* with proteins involved in SAM maintenance such as *WUSCHEL*, *KNAT1/BP*, *KNAT2* and *JAIBA*, and with proteins involved in medial tissue development in the gynoecium such as *HECATE*, *BELL1* and *NGATHA1*. Taken together, our results highlight the relevance of *DKM* as a negative modulator of Arabidopsis growth and reproductive development.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Organización de tejidos meristemáticos en Arabidopsis

El correcto crecimiento en plantas requiere de dos procesos: 1.- La iniciación de un primordio de un órgano en los costados del meristemo. 2.- El mantenimiento del conjunto de células indiferenciadas con nuevas rondas de división celular que puedan reemplazar las células que ya migraron y se incorporaron en los primordios de órganos (Gallois *et al.*, 2002). Los meristemos albergan células madre pluripotentes. Los meristemos se pueden mantener por si solos durante todo el ciclo de vida de las plantas generando células que entran a diferenciación (Czesnick and Lenhard, 2015). El crecimiento de las plantas ocurre gracias a la actividad de los meristemos, principalmente el meristemo apical (SAM), localizado en la parte apical del tallo, y el meristemo radicular (RAM), localizado en la región apical de la raíz (Gaillochet and Lohman, 2015) (**Figura 1**).

La función principal del meristemo apical (SAM) es producir las células que formarán los órganos aéreos de la planta. La población de células madre en el meristemo están sujetas a una fina regulación y la pérdida del equilibrio en el mantenimiento de las células madre puede resultar en fenotipos de agrandamiento o agotamiento del meristemo (Gaillochet, *et al.*, 2015; Gaillochet and Lohmann, 2015). El meristemo apical de la inflorescencia está organizado en diferentes secciones, las cuales se esquematizan en la **Figura 1A**. La zona central (CZ) localizada en la parte más apical del meristemo, está formada por un grupo de células con una baja actividad mitótica. La CZ constituye el reservorio de células madre que se auto-renueva y es la fuente que abastece de células a la zona rib (RZ) y a la zona periférica (PZ), dichas zonas tienen una tasa de división alta. La zona rib (RZ), localizada justo en la parte central del meristemo produce células que se incorporarán en el núcleo o “core” de células madre (Carles and Fletcher, 2003). Cuando se forma un primordio, sets de células en la PZ y en la RZ se especializan y son las que originan tejidos jóvenes (Carles and Fletcher, 2003; Reddy *et al.*, 2004)

El dominio frontera es la región que se encuentra entre el meristemo y el recién formado primordio (hoja o flor). Dicha región está compuesta por células especializadas con baja tasa de división celular, formas alargadas y superficie cóncavas, que tienen la función de separar la actividad meristemática del crecimiento determinado de un órgano (Aida and Tasaka, 2006; Breuil-Broyer 2004) (**Figura 1A**).

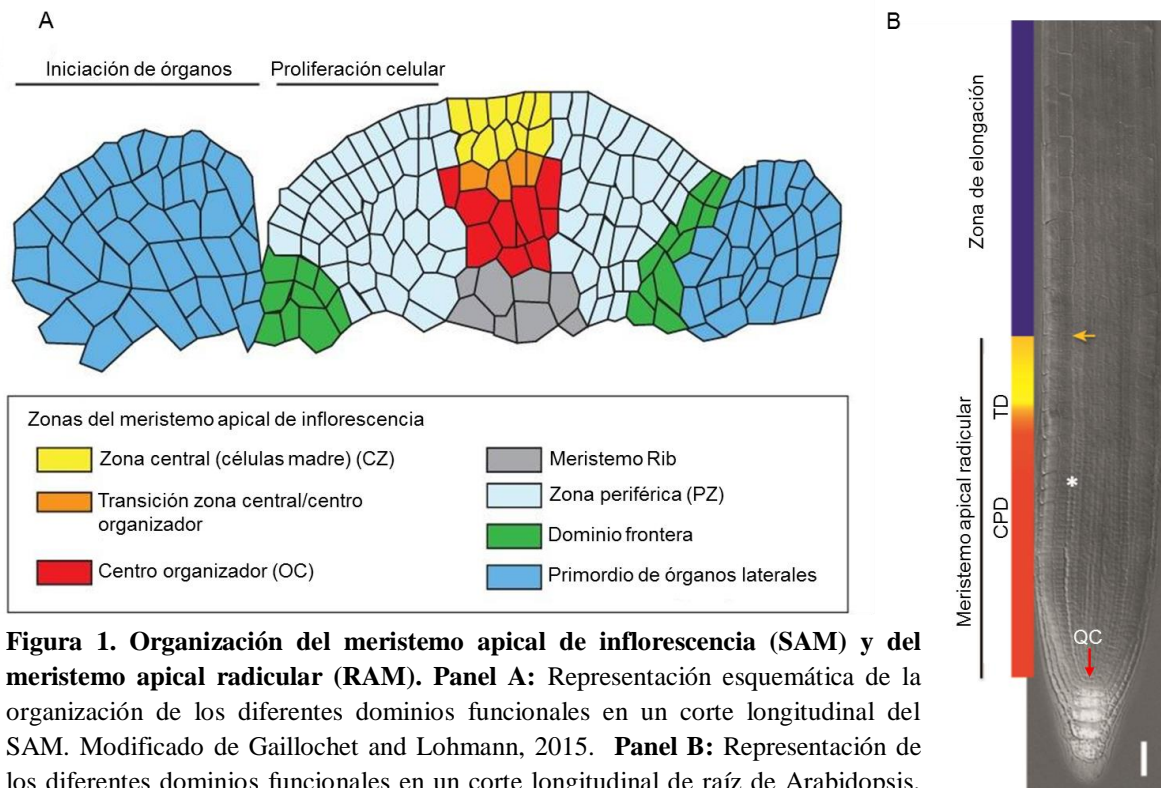


Figura 1. Organización del meristemo apical de inflorescencia (SAM) y del meristemo apical radicular (RAM). Panel A: Representación esquemática de la organización de los diferentes dominios funcionales en un corte longitudinal del SAM. Modificado de Gailloch et al., 2015. **Panel B:** Representación de los diferentes dominios funcionales en un corte longitudinal de raíz de Arabidopsis. TD=Transition Domain; CPD=Cell Proliferation Domain; QC=Quiescent Center. Modificado de Ivanov and Dubrovsky, 2013.

Se ha propuesto que la parte creciente de la raíz de Arabidopsis está organizada en dos secciones: el meristemo, donde las células mantienen una activa proliferación con crecimiento lento (CPD), y la zona de elongación donde las células comienzan a crecer (**Figura 1B**). Entre dichas secciones está la zona de transición (TD), donde las células dejan de dividirse pero no han empezado a elongarse (Ivanov and Dubrovsky, 2013) (**Figura 1B**). En el meristemo hay un grupo de células llamado centro quiescente (QC) (**Figura 1B**) que se dividen lentamente y que organizan, mantienen en división y previenen la diferenciación

de las células madre que están alrededor (Cruz-Ramírez *et al.*, 2013; van den Berg *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2006).

Durante el desarrollo vegetativo la proliferación de células en el meristemo apical está encaminada a mantener la población de células madre, lo cual es dependiente de la actividad del gen *WUSCHEL* (*WUS*), que es un factor de transcripción homeodominio y se expresa en el centro organizador (OC) del meristemo apical. *WUS* es necesario y suficiente para mantener la identidad de células madre mediante la interacción con el gen *CLAVATA3* (*CLV3*) (Revisado en Perales and Reddy, 2012). Recientemente se ha demostrado que *WUS* regula la actividad del SAM en dos formas diferentes: influenciando la señalización de citocininas y controlando la proliferación celular mediante la represión transcripcional de *HECATE1* (*HEC1*). *HEC1* codifica para un factor de transcripción tipo bHLH que en un principio se reportó como un gen que regula, junto con otros miembros de la misma familia, el desarrollo del tracto de transmisión (Schuster *et al.*, 2014; Gremski *et al.*, 2007). Uno de los principales reguladores del desarrollo y mantenimiento del meristemo apical es el gen *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) que codifica para un factor de transcripción KNOX clase 1, el cual se expresa en el SAM pero no en los primordios de órganos laterales. La actividad de *STM* es necesaria desde la embriogénesis y durante todo el ciclo de vida de *Arabidopsis*. En el meristemo apical se requiere la función de *STM* y *WUS* para mantener el pool de células madre en división y en un estado indiferenciado (Gallois *et al.*, 2002; Lenhard *et al.*, 2002). Mientras que *STM* actúa induciendo la síntesis de citocininas para inhibir la diferenciación celular y organizando células no-diferenciadas para el auto-mantenimiento del meristemo (Long *et al.*, 1996; Endrizzi *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1996; Scofield *et al.*, 2007), *WUS* previene que las células del centro organizador del meristemo se diferencien en órganos laterales (Scofield *et al.*, 2007; Perales and Reddy, 2012). Por lo anterior se ha propuesto que ambos genes tienen funciones complementarias para el mantenimiento del meristemo y activan rutas genéticas independientes.

STM interactúa proteína-proteína y es regulado a su vez por *JAIBA* (*JAB*) que codifica para un factor de transcripción HD-ZIP clase-II. Se ha visto que *JAB* regula la determinación del meristemo floral y de inflorescencia mediante la interacción con otras proteínas como *CRABS CLAW* (*CRC*), *BREVIPEDICELLUS* (*BP*) y *KNAT2* (Zúñiga-Mayo *et al.*, 2012).

La pérdida de la función de JAB causa defectos esporofíticos en tejido reproductivo masculina y femenino, de manera particular afecta el correcto desarrollo del gineceo en diferentes etapas (Zúñiga-Mayo *et al.*, 2012).

El desarrollo de los órganos florales es un proceso que se lleva a cabo con un fino control espacio-temporal de la división y expansión celular. En flores, cada órgano crece principalmente mediante proliferación celular seguido de una serie de expansiones celulares direccionales para finalmente esculpir la forma de cada órgano (Dinneny *et al.*, 2004; Anastasiou and Lenhard, 2007). El gen *JAGGED* (*JAG*) codifica para un factor de transcripción C2H2 y promueve la proliferación celular actuando predominantemente en las regiones distales de los órganos florales (Dinneny *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2004). Recientemente se ha reportado que la actividad ectópica de *JAG* en el meristemo, promueve la entrada a la fase-S del ciclo celular de forma temprana lo cual sugiere que en tejidos meristemáticos *JAG* puede bloquear los puntos de control o (check-points) que evitan que células inmaduras entren en fase de síntesis (Schiessl *et al.*, 2012; Schiessl *et al.*, 2014). Schiessl y colaboradores han demostrado que dicha regulación ocurre mediante la represión directa de *JAG* a dos inhibidores del ciclo celular, *KRP2* y *KRP4*, los cuales controlan la transición G1/S del ciclo celular (Schiessl *et al.*, 2014). Por otro lado, y sin dejar de ser consistentes con el rol que se le asigna a *JAG* en la transición de meristemo a primordio, se ha reportado que *JAG* reprime directamente, en primordios florales, dos genes reguladores del meristemo *BP* y *BELL 1* (*BEL1*) (Schiessl *et al.*, 2012). *BP* también conocido como *KNATI* codifica para un factor de transcripción KNOX clase-1 que en un principio se caracterizó como un gen regulador del meristemo y de la especificación del destino celular en maíz y Arabidopsis (Freeling and Hake, 1985; Lincoln *et al.*, 1994). Posteriormente en Arabidopsis se le ha denominado “replum factor” (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007) ya que regula la expresión del gen *REPLUMLESS* (*RPL*) el cual especifica la identidad del replum en el gineceo de Arabidopsis (Byrne *et al.*, 2000; Roeder *et al.*, 2003; Smith and Hake, 2003, Bhatt *et al.*, 2004; Marsch-Martinez *et al.*, 2014). *BEL1* codifica para un factor de transcripción homeodominio que en principio se reportó como un gen que regula la formación de los integumentos laterales en los óvulos (Modrusan *et al.*, 1994), se ha reportado que al formar heterodímero con *BP* funcionan como activadores de la transcripción, además de que recientemente se ha visto que interactúa con un regulador

negativo del desarrollo *OVATE FAMILY 1 (OFPI)* (Hackbusch *et al.*, 2005). OFP1 es un represor transcripcional de la elongación celular que a su vez también interactúa con BP, y se expresa principalmente en raíces y frutos. La sobreexpresión de *OFPI* causa una reducción en la longitud de los órganos aéreos desde cotiledones, roseta, órganos florales y frutos (Chen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007).

2.2 Ciclo celular

El desarrollo en plantas requiere un fino y coordinado acoplamiento entre crecimiento celular, división celular y diferenciación; eventos que son influenciados por hormonas vegetales (Li *et al.*, 2009; del Pozo *et al.*, 2005, De Veylder *et al.*, 2007). El ciclo de división celular es un proceso unidireccional altamente regulado que tiene como propósito originar a partir de una célula dos células hijas, las cuales en la mayoría de los casos, son idénticas a la madre. Dicho proceso requiere la duplicación de los componentes celulares, incluyendo: el material genético, organelos y otras estructuras macromoleculares (Gutierrez, 2009). En plantas, durante el proceso de desarrollo, las células nuevas se originan en los meristemos donde pasan por varios ciclos de división celular antes de abandonar el programa de ciclo celular y comenzar el proceso de diferenciación (De Veylder *et al.*, 2002). El ciclo de división celular consiste de 4 etapas, G1, S, G2 y M. En la Figura 3 se muestra la maquinaria básica que regula las transiciones entre las etapas G1-S y G2-M, dicha maquinaria esta a su vez regulada por auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citocininas y brasinoesteroides (del Pozo *et al.*, 2005) (**Figura 2**).

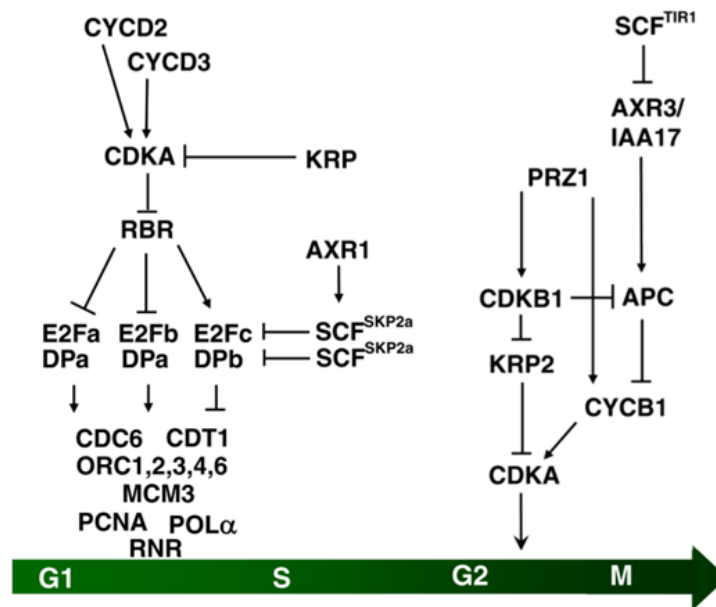


Figura 2. Representación de las rutas básicas que controlan las transiciones G1-S y G2-M durante el ciclo celular en Arabidopsis (Modificado de Gutierrez, 2009). Los puntos más regulados en el ciclo celular se encuentran entre las fases G1-S y G2-M, que corresponden a la replicación del DNA y la mitosis (Oakenfull et al., 2002). En plantas, proteínas **CYCLIND (CYCD)**, responden a señales extracelulares como hormonas (brasinosteroides y citocininas) y niveles de carbohidratos, factores que promueven la división celular en plantas (Oakenfull et al., 2002). Las proteínas **CYCLIN DEPENDENT KINASE (CDK)** tienen comportamiento cíclico. La acumulación de ciclinas en la etapa G1 estimula la actividad de **CYCLIN DEPENDENT KINASE A (CDKA)**, la cual inhibe la acción de represores del ciclo celular. La actividad de CDKA es regulada negativamente por miembros de la familia de proteínas **Kyp-RELATED-PROTEIN (KRP)** (del Pozo et al., 2005). Complejos **CYCD/CDK**'s fosforilan e inactivan a la proteína **RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR)** (Boniotto et al., 2001), con lo cual se disocian diferentes complejos RBR-E2F/DP. **E2Fa**, **E2Fb** y **E2Fc** participan en la transición G1-S (de Jager et al., 2001). **E2Fa** y **E2Fb** actúan como activadores de genes necesarios para que el ciclo continúe hacia la fase S, mientras que **E2Fc** actúa como represor de la proliferación celular (Gutiérrez, 2005; Inzé and De Veylder, 2006; De Veylder et al., 2007). El gen **AUXIN RESISTANT1 (AXR1)** codifica para una proteína que se requiere para la modificación y activación del complejo **Skp1-Cullin1-F-box (SCF)** (del Pozo and Estelle, 1999), el cual es un complejo multiproteínico que cataliza la ubiquitinación de proteínas que son destinadas a degradación via proteosoma (Ni et al., 2004). E2Fb induce la expresión del gen **CELL DIVISION CONTROL (CDC6)** en la fase-S temprana (de Jager et al., 2001; Castellano et al., 2001). El gen **CHROMATIN LICENSING and DNA REPLICATION FACTOR1 (CDT1)** es crucial para la proliferación celular y la estabilidad del genoma y es regulado a dos niveles: a nivel transcripcional por E2Fc y a nivel post-transcripcional por fosforilación de CDK (Castellano et al., 2004). Los factores de transcripción E2F (a, b y c) regulan diferentes subunidades del complejo **ORIGIN OF RECOGNITION COMPLEX (ORC)** como **ORC1, 2, 3, 4, 6** que son proteínas que se requieren para la replicación del ADN (Diaz-Trivino et al., 2005; Gutierrez, 2009). El gen **MINI-CHROMOSOME MAINTENANCE3 (MCM3)** está involucrado en la iniciación de la replicación del ADN durante la transición G1/S y es activado a nivel transcripcional por E2Fa/DPa (Stevens et al., 2002). El gen **PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)** es regulado negativamente a nivel transcripcional por E2Fc (Egelkrou et al., 2002). La **DNA POLIMERASA α (POL α)** está involucrada en la replicación del DNA y es activada a nivel transcripcional por el complejo E2Fa/DPa (Vlieghe et al., 2003). **RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE (RNR)** es una familia de proteínas que catalizan la producción de

desoxirribonucleotidos para la replicación y reparación del DNA (Wang et al., 2006).. El factor de transcripción *AUXIN RESISTANT 3 (AXR3)* es degradado por ubiquitinación vía el complejo SCFTR1 (Blilou et al. 2002). *PROPORZI (PRZI)* es un activador transcripcional que regula el cambio de proliferación celular a diferenciación celular en respuesta a citocininas y auxinas (Sieberer *et al.*, 2003). Miembros de la familia de proteínas **CYCLIN DEPENDENT KINASE B (CDKB)** tienen su pico en la fase G2 y en mitosis (Porceddu et al., 2001; Boudolf et al., 2004). El complejo **ANAPHASE PROMOTING COMPLEX (APC)**, es un complejo multiproteínico que se activa en la fase M y se mantiene hasta la fase G1, dicho complejo ubiquitina ciclinas tipo A y B (McLean et al., 2011). Las ciclinas tipo B (**CYCLIN B1-CYCB**) controlan la transición G2-M en asociación con CDKA's y CDKB's. (Renaudin et al., 1996).

Las etapas en dicho ciclo no se suceden de manera independiente entre ellas, existe una estricta comunicación cruzada (o “crosstalk”) entre ellas que permite que ocurran de manera coordinada (Gutierrez, 2009; Inzé and De Veylder, 2006). Existen puntos de control clave que permiten que el ciclo se desarrolle de manera apropiada, por ejemplo: (a) el incremento en la masa celular determina el tiempo en que tiene que iniciar la fase S; (b) existen pausas entre la replicación del DNA (fase S) y la segregación de los cromosomas a las células hijas (fase M) (Huntley and Murray, 1999).

La identificación de la maquinaria de regulación del ciclo de división celular en humano y en levadura ha facilitado y acelerado el entendimiento del mecanismo en plantas. En *Arabidopsis*, la familia de CDKs (ciclinas dependientes de cinasas) está compuesta por 12 miembros clasificados en 6 grupos (A-F), además de tener un conjunto de genes CDK-like (Mengues *et al.*, 2005). A excepción de los grupos C y E, el resto de los grupos han tenido un rol descrito en ciclo de división celular (Gutierrez, 2009). CDKA regula la transición G1/S y G2/M, lo cual ocurre también en el ciclo celular de levaduras, mientras que el mRNA y la proteína de CDKB tienen sus picos más altos en la transición G2/M (Porceddu *et al.*, 2001; Boudolf *et al.*, 2004). CDKD y CDKF actúan como cinasas activadoras de CDKs (CAKs) fosforilando y, como consecuencia, produciendo un cambio conformacional que permite que CDKA y CDKB reconozcan su substrato y a su vez fosforilen una serie de genes que contribuyen la entrada a la fase M (Boudolf *et al.*, 2004; Gutierrez, 2009). Además de las CDKs, la maquinaria de ciclo celular requiere de la actividad de ciclinas. Se han reportado 32 ciclinas con función en ciclo celular (Inzé and De Veylder, 2006), las cuales se han agrupado de acuerdo a la etapa del ciclo celular en la que participan. Las ciclinas tipo A (10 ciclinas) y las ciclinas tipo B son llamadas también ciclinas mitóticas ya

que participan en la transición de la fase S a la fase M y de la fase G2 a la fase M respectivamente (Wang et al., 2004; Inzé and De Veylder, 2006). Las ciclinas tipo D (10 ciclinas) son específicas de la fase G1 (Wang et al., 2004; Inzé and De Veylder, 2006). Se ha reportado solo una ciclina tipo H en Arabidopsis y regula la actividad de CDKF;1 (Wang et al., 2004; Inzé and De Veylder, 2006). Se ha reportado que la ciclina A2;3 (CYCA2;3) regula negativamente la endoreduplicación, proceso en el cual el DNA es duplicado de manera sucesiva en ausencia de mitosis, este proceso es regulado por la actividad de CDKs (Imai *et al.*, 2006). Otros elementos de la maquinaria regulatoria del ciclo celular son las proteínas Kip-Related-Protein (KRPs), las cuales regulan el correcto progreso del ciclo celular y la integración de señales de desarrollo con el núcleo de la maquinaria de ciclo celular y tienen actividad represora sobre proteínas CDKs (De Veylder *et al.*, 2001; Gutierrez, 2009). Se han aislado 7 genes de Arabidopsis que codifican para KRP's (KRP1-7), y en un principio se proponía que interactuaban e inhibían específicamente CDKs tipo A y ciclina D (Wang *et al.*, 1998; De Veylder *et al.*, 2001), sin embargo algunas KRPs también pueden interactuar con CDKs tipo B (Nakai *et al.*, 2006; Pettkó-Szandtner *et al.*, 2006). En un principio se propuso que preferentemente las proteínas KRP funcionaban como inhibidores o represores del ciclo celular como es el caso de KRP2, que actúa como un inhibidor del crecimiento reduciendo la proliferación celular en hojas (De Veylder *et al.*, 2001). Posteriormente se reportó que al sobreexpresar KRP6 se acelera la entrada al ciclo mitótico pero se retrasa la progresión de dicho ciclo en raíces de Arabidopsis (Vieira *et al.*, 2014). Las proteínas retinoblastoma (Rb) y E2F/DP son reguladores clave que controlan el inicio de la replicación de ADN. Cuando los factores de transcripción E2F/DP están unidos a RB, son inactivos, pero se vuelven activos cuando Rb es fosforilado por complejos específicos CDK/ciclinas de la fase G1, lo cual estimula la transcripción de genes necesarios para la transición G1/S y para la progresión de la fase S (Vandepoele *et al.*, 2002). La citocinesis es un proceso que implica la formación del fragmoplasto que es un arreglo de citoesqueleto que concentra y permite la fusión de vesículas al centro de la célula que se va a dividir, en medio de los dos núcleos de las células hijas que se van a separar después de la mitosis (Otegui and Staehelin, 2000; Gutierrez, 2009). El fragmoplasto consiste en dos sets opuestos de microtúbulos y filamentos de actina además de una serie de proteínas desconocidas (Otegui and Staehelin,

2000). Dentro de las proteínas reportadas como necesarias para la formación del fragmoplasto y consecuentemente del plato celular durante la citocinesis están las proteínas kinesina-12A y kinesina-12B (Lee *et al.*, 2007).

2.3 Desarrollo reproductivo en *Arabidopsis*

El ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* se divide en fase vegetativa y fase reproductiva. Durante la fase vegetativa el meristemo apical produce hojas y primordios axilares a los costados. Una vez que la planta recibe del medio ambiente el estímulo apropiado, el meristemo apical se convierte en meristemo de inflorescencia, el cual es determinado y se encargará de producir meristemas florales, posteriormente cada meristemo floral se convertirá en una flor, la cual está compuesta por sépalos, pétalos, estambres y carpelos o gineceo (ordenados concéntricamente) y tiene como función preservar la reproducción (Irish, 2010).

El desarrollo floral ha sido descrito detalladamente por Smyth y colaboradores (Smyth *et al.*, 1990) en veinte etapas. Durante las dos primeras etapas, el primordio o meristemo floral se forma y se separa del meristemo de inflorescencia (**Figura 3A**). En la etapa 3 se forman los primordios de los sépalos, los cuales en la etapa 4 cubren parcialmente el meristemo floral. En la etapa 5 se forman los primordios de pétalos y estambres y el meristemo floral se expande para formar una especie de plataforma donde se formará el gineceo a partir de la etapa 6. El gineceo es el órgano más complejo que tiene *Arabidopsis* (Trigueros *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2009), consiste en dos carpelos fusionados verticalmente a manera de un tubo hueco que se elonga durante las etapas 7 y 8. En los márgenes internos o tejido medio del gineceo, se forma un tejido con características meristemáticas llamado meristemo del margen del carpelo (CMM), el cual a partir de la etapa 9 da origen a la placenta, óvulos, septum y tracto de transmisión (**Figura 3B-C**) (Balanzá *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 1999; Azhakanandam *et al.*, 2008; Wynn *et al.*, 2011; Reyes-Olalde *et al.*, 2013). La función del gineceo es proteger a los óvulos, facilitar la polinización y fecundación de los óvulos y dispersar las semillas al final del proceso de desarrollo floral (Roeder and Yanofsky 2006; Balanzá *et al.*, 2006; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010; Bowman and Smyth, 1999; Reyes-Olalde *et al.*, 2013). En la etapa 10 aparecen los primordios de los óvulos y en la zona apical del gineceo se forman las papilas estigmáticas (. En la etapa

11 se forman los integumentos internos y externos de los óvulos y en la etapa 12 el gineceo y los diferentes tejidos que lo conforman (valvas, replum, septum, óvulos, estilo y estigma) son diferenciados y concluyeron su formación, por lo cual el gineceo está morfológicamente preparado para la fertilización. Durante la etapa 13, también llamada “antesis” la flor se abre y se auto-poliniza (**Figura 3D**). En la etapa 14 se lleva a cabo la fecundación (**Figura 3E**). A partir de la etapa 15 el fruto (gineceo fecundado) se elonga y el resto de los órganos florales empiezan a senescer hasta desprenderse y dejar solamente el fruto en la etapa 16. Durante la etapa 17 el fruto completa su maduración, en la etapa 18 se torna color amarillo y en la etapa 19 las valvas se separan del fruto y se desprenden. Finalmente en la etapa 20 las semillas se desprenden dejando solo el replum y el septum (Roeder and Yanofsky, 2006).

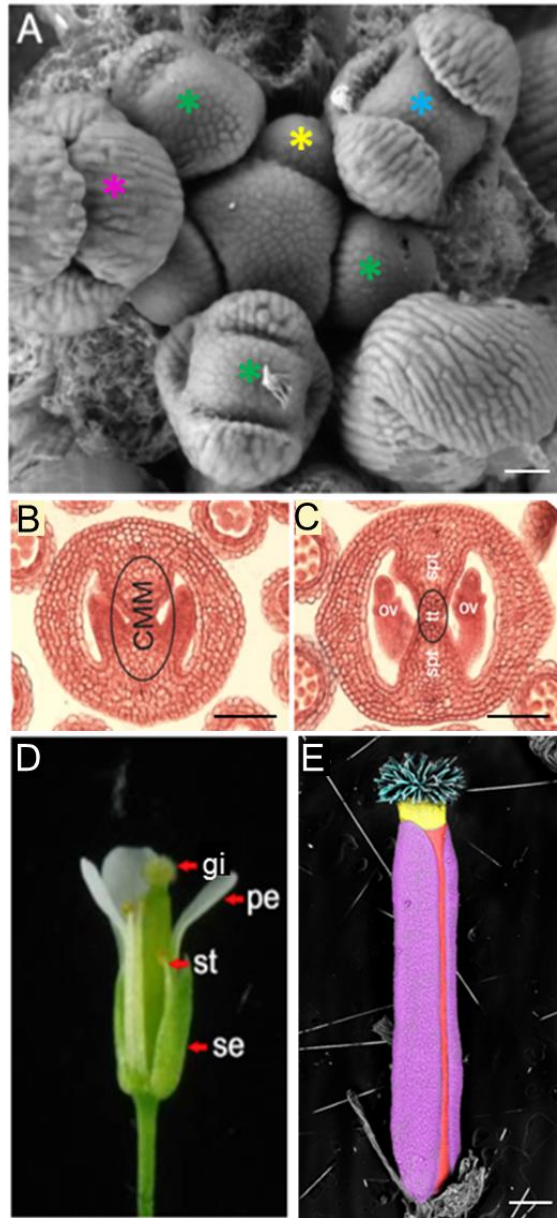


Figura 3. Desarrollo reproductivo de Arabidopsis. Panel A: Meristemo de inflorescencia. El asterisco amarillo indica un meristemo floral en estadio 2, asteriscos en verde indican meristemos florales en estadio 3, asterisco azul indica un meristemo floral en estadio 4, asterisco en rosa indica meristemo floral en estadio 5. **Panel B:** Gineceo en estadio 10 de la escala de desarrollo floral, CMM=Meristemo del margen del carpelo. **Panel C:** Gineceo en estadio 11 de la escala de desarrollo floral, ov=óvulos; spt=septum; tt=tracto de transmisión. Barras de escala 20 μm en (A); 100 μm en (C); 20 μm en (D y E). **Panel D:** Flor de Arabidopsis en estadio 13 de la escala de desarrollo floral. gi=gineceo; pe=pétalo; st=estambre; se=sépalo. **Panel E:** El gineceo de Arabidopsis está compuesto por diferentes tejidos, en color turquesa se señala el estigma, en color amarillo el estilo, en color rojo el replum y en color rosa los carpelos o valvas. (Fotografías: Paulina Lozano Sotomayor).

2.4 La mutante *pit1-D*

El presente trabajo surgió con la caracterización de la mutante *pit1-D* que se aisló en una población de mutantes por ganancia de función o “activation tagging” generada por Marsch-Martínez y colaboradores en el 2002 (Marsch-Martinez *et al.*, 2002), utilizando el sistema de transposones En-I de maíz. La técnica de mutagénesis por *activation tagging* ofrece la ventaja de poder identificar genes que tienen relevancia en algún proceso de desarrollo de interés, que hubieran sido difícilmente identificados utilizando mutaciones insercionales de T-DNA debido a redundancia genética. Dicho proceso es bastante común en un modelo como *Arabidopsis*, cuyo genoma ha pasado por diversos eventos de duplicación, estimándose que dos tercios del genoma está duplicado (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Otra limitante de la técnica de mutagénesis por silenciamiento es que no se pueden estudiar genes esenciales para la formación de los gametos o esenciales durante etapas tempranas del desarrollo del embrión que generarían mutantes letales. En la técnica de *activation tagging*, propuesta por Walden y colaboradores (Walden *et al.*, 1994), la expresión de un gen es potenciada gracias a una secuencia activadora o “enhancer”, incluso si ésta se encuentra lejos del promotor. En el caso de la mutante *pit1-D* se utilizó el promotor 35S del virus del mosaico de tabaco (CaMV). Se ha observado en diferentes mutantes, en las que se utiliza el promotor 35S CaMV, que dicho *enhancer* incrementa el patrón original de expresión del gen y no la expresión ectópica o constitutiva del mismo (Neff *et al.*, 1999; van der Graaff *et al.*, 2000; Weigel *et al.*, 2000). *pit1-D* presenta diferentes alteraciones en desarrollo como enanismo (**Figura 4**) y semi-esterilidad, esto último debido a defectos en el desarrollo del gineceo (**Figura 5**).



Figura 4. Comparación entre plantas *Ws-3* y *pit1-D* a los 60 días de edad. (Lozano-Sotomayor, Tesis de Maestría, 2010).

Se ha observado que en el 74% de los gineceos producidos ($n = 182$) por una planta de dos meses de edad se observan estructuras pistiloides en las que solo se identifica el estigma y una estructura tipo ginóforo, además de que se pierde toda la cámara ovárica y por lo cual no hay producción de semillas (**Figura 5**; Lozano-Sotomayor, 2010). En el restante 26% de los gineceos observados en *pit1-D* se pueden observar otros tres tipos de estructuras reproductivas: pistilos con una sola valva (18%), pistilos con dos valvas pero de tamaños diferentes (5%) y pistilos con dos valvas simétricas pero de menor tamaño con respecto a los pistilos silvestres (3%) (Lozano-Sotomayor, 2010).

En estudios previos hemos analizado, mediante microscopia electrónica, gineceos silvestres y las estructuras pistiloides más frecuentes encontradas en *pit1-D*, en estadios de desarrollo tempranos. Lo que observamos es que dichas estructuras pistiloides carecen de la forma de “tubo hueco” la cual posteriormente desencadena la formación de septum, tracto de transmisión y óvulos (**Figura 5E**; Lozano-Sotomayor, 2010).

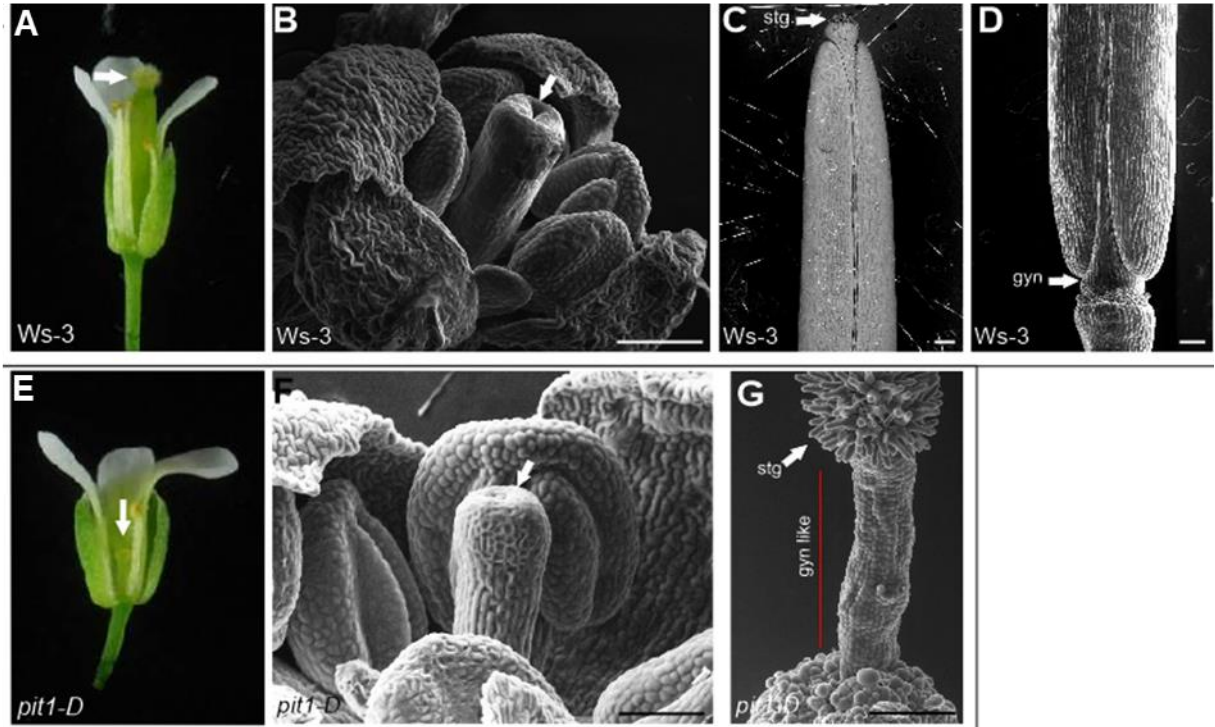


Figura 5. Comparación entre el fenotipo más frecuente en flores *pit1-D* y flores *Ws-3*. **Panel A:** Flor *Ws-3* en estadio 13 de la escala de desarrollo floral. La flecha señala el tamaño del gineceo. **Panel B:** Flor *Ws-3* en estadio 8. La flecha en blanco señala el crecimiento del gineceo en forma de tubo hueco. **Panel C:** Zona apical de un fruto *Ws-3* en estadio 17. La flecha en blanco señala el estigma (stg). **Panel D:** Zona basal de un fruto en estadio 17. La flecha en blanco señala el ginóforo. **Panel E:** Flor *pit1-D* en estadio 13 de la escala de desarrollo floral. La flecha señala el tamaño de la estructura pistiloide. **Panel F:** Flor *pit1-D* en estadio 8. La flecha en blanco señala la falta del tubo hueco en la estructura pistiloide. **Panel G:** Estructura pistiloide *pit1-D* proveniente de una flor en estadio 17. La flecha en blanco señala el estigma, la línea roja señala la estructura similar a un ginóforo. Barras de escala: 100 μm en (B, D, F, G); 200 μm en (C). (Modificado de Lozano-Sotomayor, Tesis de Maestría, 2010).

En la mutante *pit1-D*, el enhancer está localizado en la región intergénica entre el gen *AT2G21230* (*DRINK ME - DKM*) y el gen *SAUR12* (**Figura 6A**) y ambos genes tienen un aumento en el transcrito (**Figura 6B**), debido al elemento activador (AIE) o enhancer.

Como parte de mi proyecto de investigación en el programa de Maestría en Biotecnología de plantas, realicé los ensayos de recapitulación que consistieron en generar líneas sobreexpresantes independientes *35S::DKM* y *35S::SAUR12*. En dichos experimentos observamos que la sobreexpresión de ambos genes causa un fenotipo de enanismo (**Figura 6C**). Sin embargo, solamente la sobreexpresión del gen *AT2G21230 - DKM* recapitula

parcialmente los fenotipos en desarrollo reproductivo que se observan en *pit1-D*. Por lo cual el proyecto de investigación del programa de doctorado se enfocó en caracterizar la función del gen *AT2G21230* (*DKM*) en el desarrollo de *Arabidopsis*. Cabe mencionar que es posible que la amplia gama de fenotipos observados en *pit1-D* sean resultado de la sobreexpresión de más de un gen lo cual resulta interesante por elucidar en trabajos posteriores.

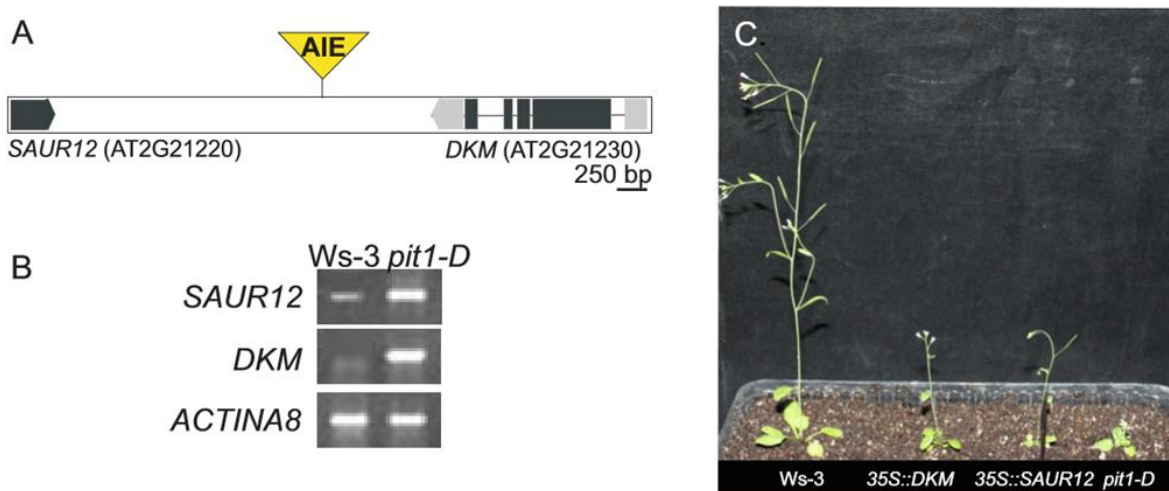


Figura 6. Localización del elemento activador (AIE) en *pit1-D*. Panel A: El AIE se ubica en el segundo cromosoma en la región intergénica entre el gen *SAUR12* y el factor de transcripción *DKM*. Panel B: RT-PCR semicuantitativo que muestra el aumento del transcrito de los genes *SAUR12* y *DKM* en plantas silvestre y en *pit1-D*. Panel C: Comparación entre planta silvestre Ws-3 y sobreexpresantes *DKM* y *SAUR12* a 30 días de edad. (Modificado de Lozano-Sotomayor, Tesis de Maestría, 2010).

2.5 Familia de factores de transcripción tipo bZIP

La familia de factores de transcripción tipo bZIP en el genoma de *Arabidopsis* está compuesta por 75 miembros divididos en 10 grupos de acuerdo a sus dominios (A, B, C, D, E, F, G, H, I y S) (Jakoby *et al.*, 2002). Se ha reportado que dichos factores de transcripción tienen función en la diferenciación de tejidos, determinación de número de órganos florales, fotomorfogénesis, elongación celular, en el control del balance de nitrógeno/carbono, metabolismo energético, señalización de hormonas, maduración de semillas y defensa contra patógenos (Weiltmer *et al.*, 2009; Cluis *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2008; Jakoby *et al.*, 2002). Hay dos genes bZIP reportados que tienen función en el desarrollo reproductivo:

UNFERTILIZED EMBRYO SAC4 (UNE4) y *PERIANTHIA (PAN)* (Pagnussat *et al.*, 2005, Running and Meyerowitz, 1996). Plantas con pérdida de función del gen *UNE4*, el cual pertenece al grupo I, presentan deficiencias en la atracción del tubo polínico durante la fecundación (Pagnussat *et al.*, 2005). *PAN*, quien pertenece al grupo D, en un principio fue reportado como un regulador del número de órganos florales (Running and Meyerowitz, 1996). Posteriormente se reportó que *PAN* está involucrado en la terminación del meristemo floral y la activación del gen *AGAMOUS (AG)*, el cual es un gen MADS-box clase C (Das *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2009). Recientemente se ha demostrado que *PAN* reprime a *AG* en el primer verticilo floral y que además tiene un rol en el desarrollo del meristemo del margen del carpelo (CMM) (Wynn *et al.*, 2014). En el presente estudio se caracterizó la función del gen *bZIP30 (At2g21230)*, que en nuestro grupo de trabajo renombramos como “*DRINK ME*” (*DKM*) en alusión a la pócima que tiene la propiedad de encoger a las personas que la ingieren en el cuento de “Alicia en el país de las maravillas” (Lewis Carroll, 1865), ya que al sobreexpresar el gen se obtienen plantas enanas con reducción de tamaño en prácticamente todos los órganos de la planta. El gen *DKM*, que pertenece al mismo subgrupo que el gen *UNE4*, y es uno de los genes más próximos al elemento activador en la mutante por ganancia de función *pit1-D*, al ser sobreexpresado recapituló parcialmente el fenotipo de *pit1-D* en los ecotipos Ws-3 y Col-0 y se demostró que tiene un papel en la regulación del desarrollo en tejidos meristemáticos en *Arabidopsis*.

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de plantas es un tema ampliamente estudiado en el que a pesar de que se ha generado bastante información sobre la regulación del mismo, constantemente se reportan nuevos genes con funciones regulatorias volviéndolo un proceso complejo. En el laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas estamos interesados en aportar conocimiento de nuevos mecanismos de regulación génica, en el programa de desarrollo de *Arabidopsis*, utilizando estrategias de genética reversa mediante el estudio de mutantes con ganancia de función, o con fenotipos de sobreexpresión, lo cual ha permitido la identificación de nuevos reguladores del desarrollo evitando el inconveniente de la alta redundancia genética que ocurre en *Arabidopsis*. En el presente trabajo se identificó un

factor de transcripción tipo bZIP que al ser sobreexpresado afecta de manera negativa la división celular en tejidos meristemáticos, lo cual tiene un fuerte impacto en crecimiento y fertilidad.

4. HIPOTESIS

El gen *DRINK ME*, el cual fue identificado durante la caracterización de la mutante por ganancia de función *pit1-D*, es un regulador negativo del desarrollo de *Arabidopsis* que afecta tanto la división como elongación celular mediante la formación de complejos proteínicos y la represión directa de genes.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Elucidar la función que tiene el gen *DRINK ME (DKM)* en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

5.2 Objetivos específicos

3.2.1. Caracterizar el efecto que tiene la sobreexpresión y pérdida de función del gen *DKM* en plantas de *Arabidopsis*.

3.2.2. Identificar los procesos biológicos en los que *DKM* puede tener una función.

3.2.3 Identificar genes que estén siendo regulados por *DKM*.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* que se utilizaron en el presente trabajo se germinaron en tierra (3:1:1, musgo:perlita:vermiculita) dentro de cámaras de crecimiento bajo

condiciones de día largo (16 horas luz, 22°C - 8 horas oscuridad, 20°C) por 10 días, posteriormente se transfirieron a un invernadero (22°C-27°C, con luz natural). Las plantas *pit1-D*, *35S::DKM* y *35S::GVG>>DKM* están en fondo Wassilewskija (Ws-3). La mutante *pit1-D* fue aislada de una población de activation tagging previamente reportada (Marsch-Martínez et al., 2002). Las líneas SALK (*dkm*, SALK_003886; *dkml*, SALK_018426) (Alonso et al., 2003), *35S::DKM:GFP*, *35S::DKM:SRDX*, *LAT52::GUS*, *STM::GUS* y *JAG::GUS* están en fondo Col-0.

6.2 RT-PCR semicuantitativo

Para los análisis de perfiles de expresión se colectaron inflorescencias de las que se removieron las flores abiertas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C; el RNA total se extrajo de acuerdo al protocolo descrito por Verwoerd (Verwoerd *et al.*, 1989). El RNA se trató con DNAsa 1 (Invitrogen) y se retro-transcribió usando la enzima M-MLV (Invitrogen, número de catálogo 28025013) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para el análisis del nivel de abundancia de los transcritos *DKM* (*AT2G21230*), *DKML* (*AT4G38900*), *SAUR12* (*AT2G21220*), *OFPI* (*AT5G01840*) y *JAG* (*AT1G68480*) se utilizaron los primers *DKM_sqRT-PCR*, *DKML_sqRT-PCR*, *SAUR12_sqRT-PCR*, *OFPI_sqRT-PCR*, y *JAG_sqRT-PCR* (Anexo 12.1).

6.3 Construcción de líneas sobreexpresantes

Las secuencias codificantes para los genes *DKM* y *SAUR12* se amplificaron mediante PCR a partir de cDNA que se sintetizó a partir de inflorescencias, usando los primers *DKM_cDNA* and *SAUR12_sqRT-PCR*, y se clonaron en el plásmido pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las secuencias clonadas se verificaron mediante secuenciación Sanger y los vectores fueron recombinados con el vector binario pB7WG2D (Karimi *et al.*, 2002), para generar las construcciones *35S::DKM* and *35S::SAUR12*. La secuencia codificante de *DKM* clonada en el plásmido pENTR/D-TOPO fue también recombinada con el vector binario pK7FWG2.0 (Karimi *et al.*, 2002), para generar la construcción *35S::DKM:GFP*. Las construcciones *35S::DKM* y *35S::SAUR12* se utilizaron para transformar genéticamente plantas de *Arabidopsis* ecotipo Ws-3 utilizando el método de “floral-dip” (Clough and Bent, 1998), y utilizando la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. La construcción *35S::DKM:GFP* se usó para transformar plantas Col-0. Para

la construcción inducible $35S::G\text{VG}\gg DKM$, se utilizó el vector de trans-activación CZN252 (ver Apéndice 9.5) (no publicado, Plant Research International, Wageningen, Países Bajos) el cual comprende el gen sintético GAL4-VP16-GR, que queda bajo el promotor de interés y el gen *EGFP*, que funciona como reportero/diana, controlados por una secuencia UAS en sentido opuesto (modificado de pGOF51 (Liang *et al.*, 2006). Todo esto clonado en el plásmido pGREEN 0029 (<http://www.pgreen.ac.uk>). La expresión del gen GAL4-VP16-GR está bajo el promotor 35S y se utiliza a DKM como gen diana. Se colectó tejido (inflorescencias a las que se les removieron las flores abiertas) 4, 8, 12 y 24 horas después de la inducción con dexametasona. La abundancia de transcrito de JAG y OFP1 se analizó mediante RT-PCR semicuantitativo usando los primers *OFP1_sqRT-PCR* y *JAG_sqRT-PCR* (Anexo 12.1).

La línea represora dominante de *DKM* se obtuvo gracias a la colaboración con el Laboratorio del Dr. Francisco Madueño en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas en la CSIC- de la Universidad Politécnica de Valencia. Para la generación de dicha línea se fusionó el dominio represor SRDX (Hiratsu *et al.*, 2003) al extremo C-terminal de la secuencia codificante de *DKM*, la secuencia resultante se clonó en el vector binario pMDC32 bajo el doble promotor 35S. Esta construcción se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 para obtener plantas $35S::DKM:SRDX$.

6.4 Selección de mutantes sencillas y dobles

Para los análisis de los fenotipos por pérdida de función de los genes *DKM* y *DKML*, se solicitaron líneas insercionales T-DNA SALK (Alonso *et al.*, 2003), la inserción del T-DNA se confirmó mediante PCR usando los primers *DKM_g* y *DKML_g* (Anexo 12.1) respectivamente. Posteriormente, de la progenie de las plantas que resultaron positivas para la inserción del T-DNA, se analizaron 5 y 4 plantas mediante RT-PCR semicuantitativo para confirmar la pérdida de función de *DKM* y *DKML* respectivamente. La doble mutante *dkm dkml* se obtuvo cruzando las mutantes sencillas *dkm* y *dkml*. Se identificaron dos plantas doble mutante *dkm dkml* mediante RT-PCR semicuantitativo utilizando los primers *DKM_cDNA* y *DKML_cDNA* (Anexo 12.1).

6.5 Mediciones y conteos

Las mediciones del área del meristemo de inflorescencia y del tamaño de las células en dicho tejido realizaron mediante micrografías electrónicas de inflorescencias de plantas de 4 semanas, con la ayuda del software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Para el conteo de botones florales en los diferentes fondos genéticos, se contaron los botones que estuvieran entre las etapas 7 y 12 en inflorescencias de plantas de 4 semanas de edad. El conteo de óvulos se realizó disectando gineceos en etapa 13 de plantas de 4 semanas de edad.

6.6 Microscopía

Las micrografías de fluorescencia confocal se tomaron en un microscopio invertido de escaneo confocal con láser LSM510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen Germany). La proteína verde fluorescente (GFP) fue excitada a 488 nm y el Ioduro de Propidio (IP) fue excitado a 514 nm utilizando el láser de Argón. La emisión de la GFP se filtró a 500-550 nm (bandpass) y la emisión del IP se filtró a 575 nm (longpass). Para el análisis por microscopía electrónica, el tejido se colectó e inmediatamente se observó en el microscopio electrónico de barrido EVO40 Zeiss (Carl Zeiss) utilizando un voltaje de 15 a 20 kV en condiciones de alto vacío y las señales fueron detectadas utilizando los detectores BSD y SE1. Las micrografías de campo claro, de contraste por interferencia diferencial y de fluorescencia se tomaron en el microscopio Leica CTR6000.

6.7 Histología

Los cortes histológicos de gineceos se hicieron utilizando el protocolo descrito por Zúñiga-Mayo y colaboradores (Zúñiga-Mayo *et al.*, 2012). El ensayo de tinción para la viabilidad del polen se realizó usando la solución de Alexander (Alexander, 1969) y el protocolo consistió en colectar anteras de flores en estadio 12 de acuerdo a la escala de desarrollo floral. Las anteras se incubaron en solución de Alexander por 12 horas a 37°C, pasado el tiempo de incubación se colocaron en un portaobjetos y se observaron en el estereomicroscopio. Para el clareo de óvulos se incubaron óvulos de flores en estadio 13 durante 1 hora en solución de Hoyer (Anderson, 1954), para posteriormente observar directamente en el microscopio de contraste por interferencia diferencial. Para el clareo de plántulas y de

raíces se siguió el mismo protocolo, solo el tiempo de incubación fue de 30 y 10 minutos respectivamente.

Para las tinciones *LAT52::GUS* y *STM::GUS*, gineceos estadio 13 y plántulas de 7 días de edad, respectivamente, se incubaron durante 12 horas (Overnight) a 37°C en solución 5-bromo-4-cloro-3-indol-acido b glucoronico (Gold Biotechnology; Jefferson *et al.*, 1987), posteriormente se incubaron durante una hora en 90% etanol, una hora en etanol 70%, finalmente 20 minutos en solución Hoyer y se observaron en el microscopio de contraste por interferencia diferencial.

Para las tinciones de raíces con DAPI, se utilizó una solución que contiene 1 µg/ml de DAPI en buffer 100mM de fosfato salino pH 7.0. Se montaron plántulas de 7 días de edad en un portaobjetos, se colocaron 200 µl de dicha solución y se observaron en el microscopio de contraste por interferencia diferencial.

6.8 Hibridación *IN SITU*

Para el ensayo de hibridación *in situ* se colectaron inflorescencias de plantas Ws-3 de 30 días de edad, se fijaron y se embebieron en parafina de acuerdo al protocolo descrito por Sotelo-Silveira y colaboradores (Sotelo-Silveira *et al.*, 2013). Se utilizó como sonda el fragmento que comprende del nucleótido 846 al 1097 en la secuencia codificante del gen *DKM*. Dicho fragmento se amplificó mediante PCR utilizando los primers *DKM_riboprobe* y se clonó en el plásmido pGEM-T easy (Promega). Las sondas sentido y antisentido se sintetizaron mediante una reacción de transcripción *in vitro* usando las enzimas polimerasas SP6 y T7 (Invitrogen) respectivamente. El marcaje con DIG de las sondas para la detección e hibridación de *DKM* se preparó como previamente se ha descrito por Ambrose y colaboradores (Ambrose *et al.*, 2000).

6.9 Análisis filogenético

El análisis filogenético que se elaboró para el grupo I de la familia de genes *bZIP* se llevó a cabo usando la secuencia proteínica como guía para el alineamiento de la secuencia de nucleótidos. El árbol filogenético utilizando máxima verosimilitud se obtuvo usando el programa Seaview1 (Galtier *et al.*, 1996), con el modelo GTR+ Γ +I. Seaview utiliza los programas MUSCLE2 y PhyML3.

6.10 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se hicieron usando el software STATGRAPHICS Centurion XVI, versión 16.1.11 y se realizaron análisis tipo ANOVA y t-Student dependiendo de las condiciones del experimento.

6.11 Análisis de microarreglos

Para analizar los genes que se encuentran diferencialmente expresados en el fondo 35S::*DKM*, se realizó un análisis de microarreglos utilizando inflorescencias (de las que se retiraron las flores abiertas) de 20 plantas de los dos fondos genéticos (*Ws-3* y 35S::*DKM*), crecidas en cámaras de crecimiento bajo condiciones de día largo (16 horas luz-22°C – 8 horas oscuridad-20°C). Una vez que se colectó el tejido se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El RNA total se extrajo usando el método de extracción con cloruro de litio (Verwoerd *et al.*, 1989). El cDNA se marcó con dos fluoróforos (Alexa555 y Alexa647 - ThermoFisher Scientific), mismo que se usó para la hibridación por duplicado al microarreglo (70-mer oligo Arabidopsis V.3.0.3) en la Unidad de Microarreglos de DNA del departamento de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (<http://microarrays ifc.unam.mx/>). El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software genArise, desarrollado en la unidad de cómputo del instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). genArise realiza una serie de transformaciones como correcciones de fondo, normalizaciones, análisis de la intensidad de las réplicas y selección de los genes diferencialmente expresados. El software identifica genes diferencialmente expresados calculando el valor de z-score de acuerdo a la intensidad, usando un algoritmo que calcula la media y la desviación estándar en una ventana alrededor de cada punto. Los genes con un z-score mayor a 2 SD, se consideraron genes expresados diferencialmente de manera significativa (Cheadle *et al.*, 2003). Con la finalidad de poder hacer una categorización de los genes expresados diferencialmente en plataformas como Bingo (Maere *et al.*, 2005) y Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) se utilizaron identificadores para los genes sobreexpresados (z-score ≥ 2) y reprimidos (z-score ≤ -2).

6.12 Análisis de dos híbridos en levadura (Y2H) y complementación bi-molecular de fluorescencia (BiFC)

El ensayo de dos híbridos en levadura se realizó usando el sistema GAL4 como se describe previamente (de Folter and Immink, 2011; Zúñiga-Mayo *et al.*, 2012) en el cual la secuencia completa de cDNA de *DKM* se recombinó con los plásmidos pDEST22 (GAL4-AD) y pDEST32 (GAL4-BD) (Invitrogen), posteriormente se utilizaron dichos plásmidos para transformar levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* cepas PJ69-4 tipo A y a (James *et al.*, 1996), respectivamente. Primero, se llevó a cabo un ensayo de autoactivación en las levaduras que tenían la construcción BD-*DKM* utilizando diferentes concentraciones (1, 5 y 10mM de 3-aminotriazol). Una vez que se comprobó la no autoactivación de *DKM* se procedió a hacer el ensayo Y2H con las proteínas WUS, HEC1, KNAT1/BP, KNAT2, JAIBA, NGA1 y BEL1. Las clonas AD se obtuvieron del proyecto EU-REGIA (Paz-Ares *et al.*, 2002) las cuales se recombinaron en el vector pDEST22 (Castrillo *et al.*, 2011). En el ensayo Y2H, la interacción de las proteínas se analizó monitoreando el crecimiento de levaduras en medio de cultivo deficiente en Leucina, Triptófano y Adenina en un lapso de 5 días en cámara de crecimiento a 25°C. Las interacciones positivas se confirmaron con un ensayo LacZ en el cual se monitorea el crecimiento de las levaduras en medio de cultivo con sustrato para la enzima B-glucoronidasa. Las interacciones positivas posteriormente se confirmaron *in planta* mediante un ensayo BiFC, para lo cual las secuencias completas de cDNA de los genes *DKM*, *HEC1*, *NGA1*, *KNAT1/BP*, *KNAT2*, *BEL1*, *WUS* y *JAB* se recombinaron en los vectores pYFPN43 y pYFPCP43 (<http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>) como describen Marsch-Martínez y colaboradores (Marsch-Martínez *et al.*, 2014).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de *bZIP30* (*DRINK ME-DKM*), patrón de expresión, localización celular de la proteína y fenotipo de sobreexpresión.

Nombramos al gen *bZIP30* “*DRINK ME (DKM)*” en alusión a la pócima “Drink me” del cuento de Alicia en el país de las maravillas, la cual tenía el poder de volver pequeñas a las

personas que la ingerían, porque cuando sobre-expresamos el gen *bZIP30* las plantas presentan enanismo. Con la finalidad de caracterizar el gen *DKM*, consultamos en las bases de datos públicas eFP-browser y GENEVESTIGATOR el patrón de expresión de *DKM* y encontramos que el gen tiene una baja y relativamente constante expresión en todos los estadios de desarrollo de *Arabidopsis* (**Figura 7**).

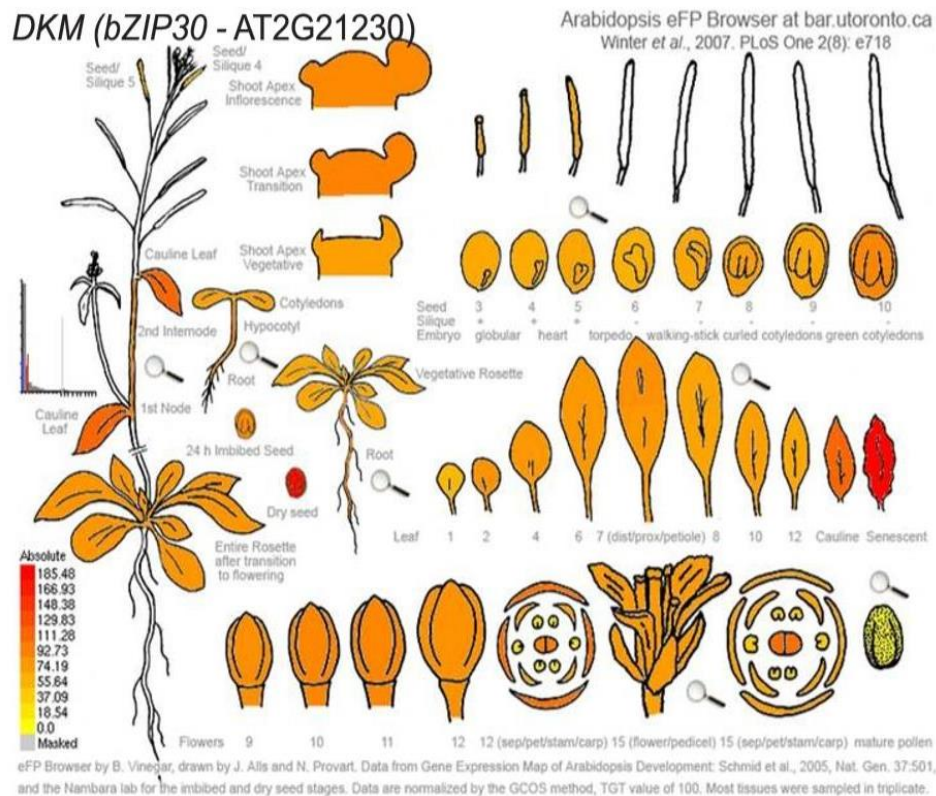


Figura 7. Expresión de *DKM* durante el ciclo de vida de *Arabidopsis*. Plataforma BAR eFP browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Posteriormente realizamos un experimento de hibridación *in situ* para analizar el patrón de expresión de *DKM* en tejidos específicos durante el desarrollo reproductivo como es el meristemo de inflorescencia y gineceo (**Figura 8**). Observamos que *DKM* se expresa tanto en el meristemo de inflorescencia como en los meristemas florales (**Figura 8A**). En el gineceo observamos su expresión en septum y en óvulos en gineceos estadio 12 (**Figura 8B-C**).

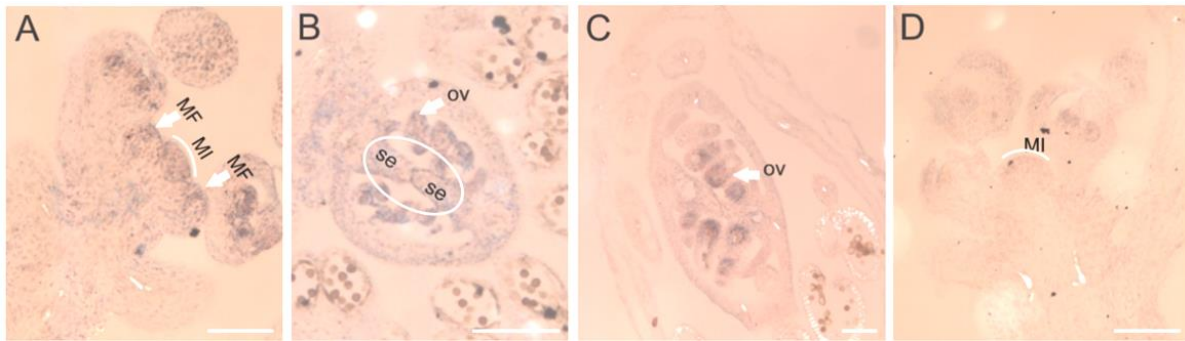


Figura 8. Análisis del perfil de expresión de *DKM* utilizando hibridación *in situ*. Panel A: Detección de transcrito *DKM* en el domo del meristemo de inflorescencia (IM) y en los meristemas florales (FM). Panel B: Detección de transcrito en un corte transversal de un gineceo en estadio 12, la señal se observa en el septum (se) y en los óvulos (ov). Panel C: Corte longitudinal de un gineceo en estadio 12. Panel D: Hibridación en corte longitudinal de un meristemo de inflorescencia utilizando la ribosonda sentido. Barras de escala: 25 μm .

Dado que el gen *DKM* codifica para un factor de transcripción, resultó de nuestro interés saber cuál es la localización celular del mismo, ya que en principio se espera que un factor de transcripción actúe en el núcleo regulando la transcripción de otros genes. Utilizando la fusión traduccional *35S::DKM:GFP*, se observó que *DKM* es una proteína de localización nuclear (**Figura 9**).

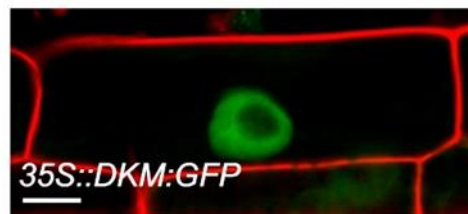


Figura 9. Detección de la localización celular de la proteína *DKM* en raíces de plántulas de *Arabidopsis*. Barra de escala: 10 μm .

La sobreexpresión de *DKM* causa una reducción en el tamaño general de la planta (**Figura 10A**). Observamos también una reducción en el tamaño del meristemo de inflorescencia (**Figura 10B-C**), fenotipo que analizamos en detalle midiendo el área del domo del meristemo de inflorescencia mediante microscopía electrónica (**Figura 10D-E**). El domo del meristemo de inflorescencia de plantas *Ws-3* miden $3723 \mu\text{m}^2$ ($n=3$), mientras que los meristemas de plantas *35S::DKM* miden $2297 \mu\text{m}^2$ ($n=3$) (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis estadístico de los fenotipos estudiados en plantas sobreexpresantes y con pérdida de función para el gen *DKM* y su ortólogo *DKML*.

Genotipo	Área de M.I (μm^2)			Longitud de células en el M.I (μm)			Número de botones florales			Longitud de frutos (cm)			Longitud de raíces (cm)		
	Media	E.S	n	Media	E.S	n	Media	E.S	n	Media	E.S	n	Media	E.S	n
Ws-3	3723	95	3	4.23	0.98	22	13	0.9	10	1.26	0.01	10	1.07	0.14	12
<i>35S::DKM</i>	2297	489	3	5.61	0.9	17	5.8	0.9	10	0.32	0.03	10	0.68	0.06	11
Col-0	3993	534	3	6.09	0.94	27	15.8	0.7	10	1.37	0.13	50	1.41	0.27	33
<i>dkm</i>	6899	321	4	5.87	1.34	28	19.3	1	10	1.46	0.07	50	1.52	0.21	30
<i>dkml</i>	4898	875	3	5.17	0.8	29	14.9	1	10	1.48	0.09	50	1.44	0.28	30
<i>dkm dkml</i>	5952	833	3	4.99	0.79	34	20.9	0.9	10	1.52	0.09	50	1.68	0.22	34

No obstante que el tamaño del domo del meristemo de inflorescencia es claramente inferior, las células en este tejido son más grandes en comparación con las células de meristemos de plantas silvestres. Haciendo un conteo de células en un área determinada del domo ($1,256 \mu\text{m}^2$) encontramos que hay aproximadamente 11 células en el caso del domo silvestre ($n=22$), contra 8.3 células en el domo de plantas *35S::DKM* ($n=17$) (Tabla 1), lo cual podría atribuirse a una menor tasa de división celular. La cantidad de botones florales que producen las plantas que sobreexpresan el gen *DKM* también es menor; por ejemplo, 13 en Ws-3 ($n=10$) y 5.8 en *35S::DKM* ($n=10$) (Tabla 1). Por otro lado, observamos que la fertilidad es claramente afectada en plantas *35S::DKM*, dado que éstas presentan una reducción importante en la fecundación de pistilos y prácticamente no producen semillas (Figura 10F).

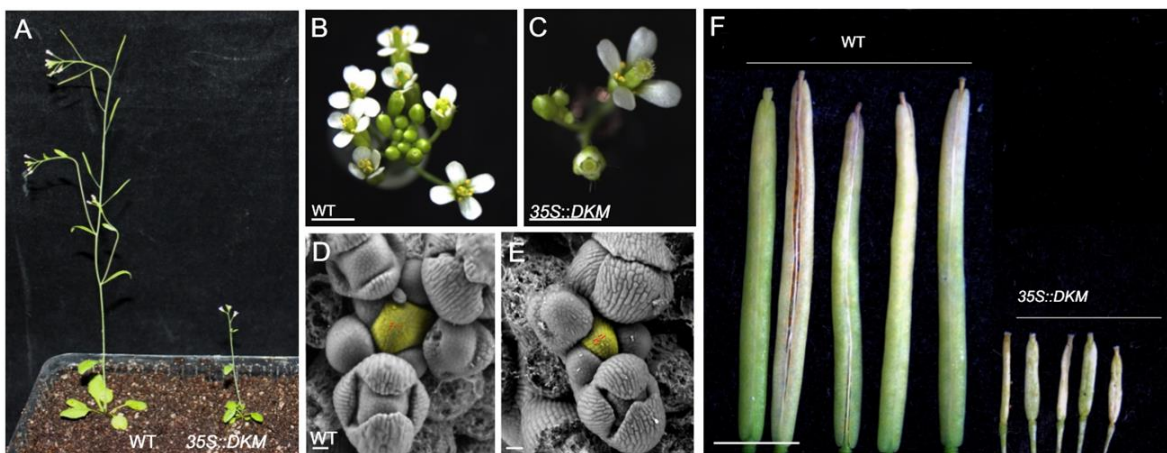


Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de *DKM*. Panel A: Plantas de 30 días de edad. **Panel B-C:** Inflorescencias de plantas de 30 días de edad. **Panel D-E:** Comparación del tamaño del domo del meristemo de inflorescencia (falsamente coloreado de amarillo) de plantas Ws-3 y *35S::DKM*. **Panel F:** Comparación

del tamaño de frutos *Ws-3* y *35S::DKM* en estadio 17. Barras de escala: 2 μm en (B-C); 25 μm en (D-E); 3 mm en (F).

Cuando analizamos a fondo las posibles causas de la poca fertilidad encontramos que hay varios factores que, sumados, pueden explicar dicho fenotipo. Se realizaron cortes transversales de gineceos en estadio 12 de la escala de desarrollo floral, los cuales posteriormente se tiñeron con azul de alcian y rojo neutro para la fácil identificación del tracto de transmisión (TT). El TT es un conducto que permite el paso de los tubos polínicos hacia el interior de la cámara ovárica para la fecundación de los óvulos. Se observó que los gineceos de las plantas sobreexpresantes *DKM* tienen una clara reducción del tamaño del tracto de transmisión, el cual en algunas ocasiones no se encuentra fusionado (**Figura 11A**). Por otro lado el número de óvulos por carpelo es reducido: 26 óvulos por gineceo en *35S::DKM* ($n = 44$ gineceos; ± 3.6) contra 45 óvulos por gineceo en *Ws-3* ($n = 41$ gineceos; ± 4.1) (**Figura 11B**). Posteriormente hicimos un conteo de la aborción de óvulos y encontramos que aproximadamente el 50% de los óvulos son abortados (**Figura 11C**). A continuación analizamos la composición de óvulos provenientes de pistilos en etapa 13 mediante clareos con solución de Hoyer. Observamos que en el caso de los óvulos de pistilos *35S::DKM* el saco embrionario está arrestado y se identifica solamente una célula diferenciada a comparación de las siete células que se distinguen en óvulos de pistilos silvestres (**Figura 11D**). Por otro lado, se realizaron polinizaciones utilizando polen de la línea marcadora *LAT52::GUS* sobre pistilos *Ws-3* y *35S::DKM* en etapa 12 con el fin de ver la tinción de tubos polínicos entrando en la cámara ovárica después de 24 horas de polinización. En este experimento observamos que en los pistilos silvestres, después de la polinización, la tinción GUS se observa en el interior y prácticamente en todo lo largo del pistilo (**Figura 11E**). En los pistilos *35S::DKM* observamos que los tubos polínicos difícilmente atraviesan el estilo para entrar en la cámara ovárica y llevar a cabo la fecundación de los óvulos, dado que la tinción se observa solamente en el estigma (**Figura 11E**). Sin embargo, aún queda por demostrar si esto ocurre porque los granos de polen no germinan adecuadamente ó por una barrera física que impida el paso de los tubos polínicos, ó por falta de señales químicas provenientes de los óvulos que atraigan a los tubos polínicos. Por otro lado analizamos anteras de plantas *Ws-3* y *35S::DKM* mediante el protocolo de tinción de polen utilizando solución de Alexander y encontramos que además

de que las anteras de plantas *35S::DKM* son más pequeñas, la cantidad de granos de polen es notoriamente inferior en comparación con anteras de plantas *Ws-3* (**Figura 11F**).

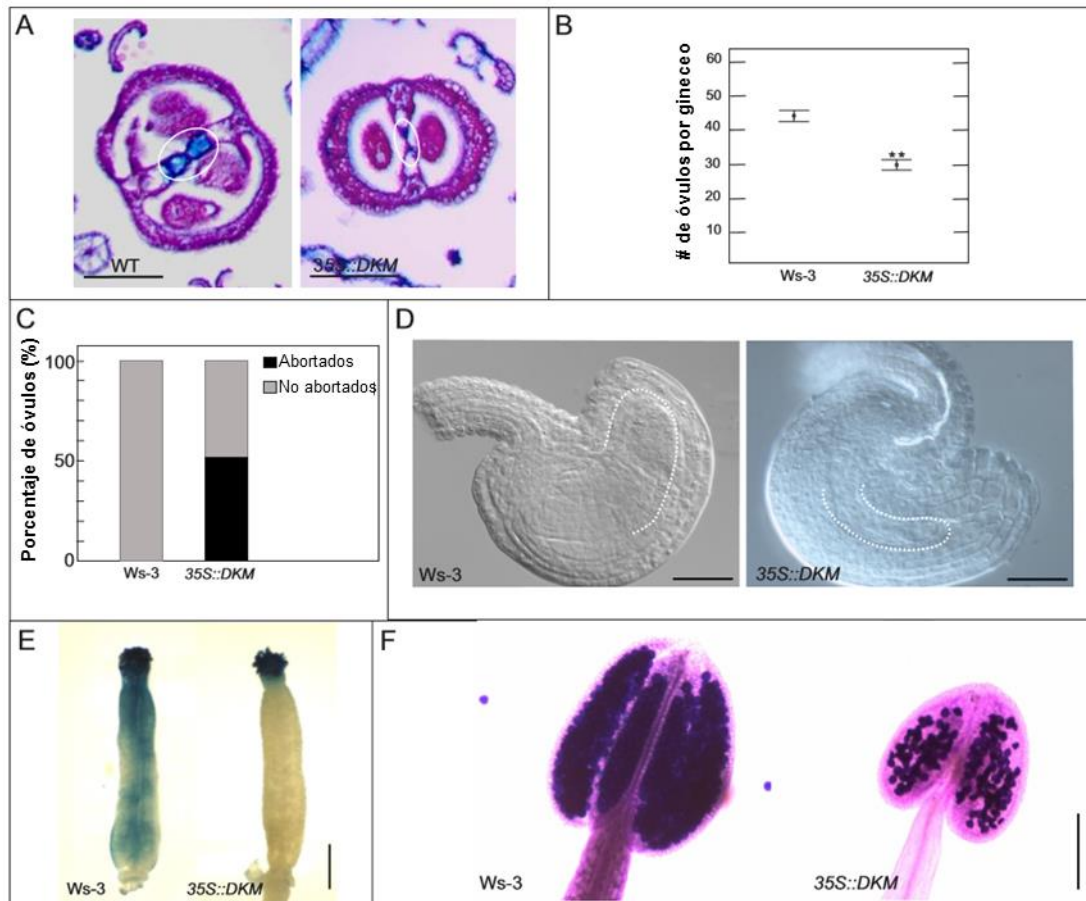


Figura 11. La sobreexpresión de *DKM* afecta la fertilidad. **Panel A:** Cortes transversales de gineceos *Ws-3* y *35S::DKM*, el óvalo blanco resalta el septum en color azul. **Panel B:** Análisis estadístico (t-Student) de la diferencia en el número de óvulos por gineceo en plantas *35S::DKM* en comparación con plantas *Ws-3*. ** P-value < 0.01, ***P-value < 0.0001. **Panel C:** Porcentaje de abortación de óvulos en plantas *35S::DKM*. **Panel D:** Comparación de la composición de óvulos silvestres *Ws-3* y *35S::DKM* provenientes de flores en estadio 13, en los óvulos *35S::DKM* solo se distingue una célula diferenciada. **Panel E:** Polinización de pistilos *Ws-3* y *35S::DKM* con polen de plantas marcadoras *LAT52*, en pistilos *Ws-3* la tinción se observa en el interior del pistilo lo cual indica que los granos de polen germinaron y entraron a la cámara ovárica, no así en pistilos *35S::DKM* donde la tinción se observa solo en el estigma. **Panel F:** Ensayo de tinción de anteras *Ws-3* y *35S::DKM* con solución de Alexander. Las anteras *35S::DKM* sufren una evidente reducción de tamaño, además de la reducción en la cantidad de granos de polen. Barras de escala: 25 μ m en (A); 10 μ m en (D); 1 mm en (E); 150 μ m en (F).

7.2 Caracterización de la pérdida de función del gen *DKM* y su parálogo *DRINK ME LIKE (DKML)*

Con la finalidad de poder concluir sobre la función del gen *DKM*, analizamos el fenotipo de plantas con pérdida de función. Se solicitó la línea insercional SALK_003886 (Alonso et al., 2003) la cual tiene la inserción de T-DNA a 410 pb del codón de inicio de la transcripción de la secuencia codificante para el gen *DKM* (**Figura 12**).



Figura 12. Esquema de la localización del T-DNA en la línea insercional para el gen *DKM*.

Debido a que la familia de factores de transcripción bZIP es una familia relativamente grande (75 miembros) y debido a que las plantas *dkm* presentaron un fenotipo muy sutil a simple vista, se hizo un análisis filogenético de la familia de factores de transcripción tipo bZIP. La hipótesis que se tenía era que el efecto de la pérdida de función del gen *DKM* estaba siendo enmascarado por la acción de un parálogo que suplía la función de *DKM* y que la falta de un fenotipo claro en las mutantes sencillas *dkm* fuera debido a redundancia genética. En el árbol filogenético, que se obtuvo mediante un análisis de máxima verosimilitud, se observó que el gen *bZIP29* (AT4G38900), el cual nosotros renombramos como *DRINK ME LIKE (DKML)* es el parálogo más cercano a *DKM* (**Figura 13**). Ambas proteínas comparten un 63.2% de identidad y un 73.7% de similitud.

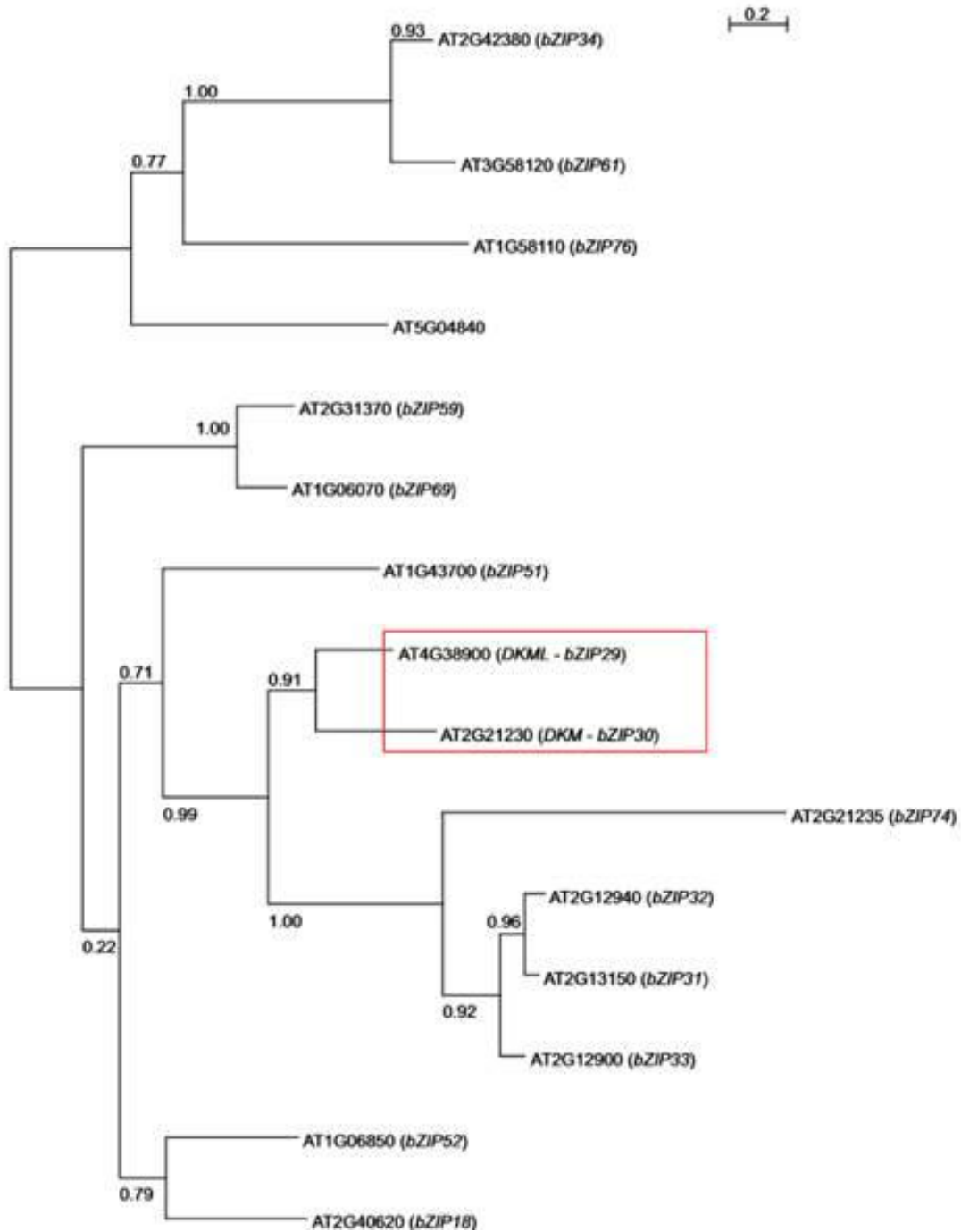


Figura 13. Árbol filogenético del grupo I de la familia de factores de transcripción tipo bZIP. El rectángulo en rojo señala la cercanía entre las proteínas DKM y DKML.

Se analizó el patrón de expresión de ambos genes en tejidos reproductivos de Arabidopsis, utilizando la plataforma GENEVESTIGATOR. Como se observa en la **Figura 14**, ambos genes tienen un patrón de expresión similar en tejidos reproductivos de Arabidopsis.

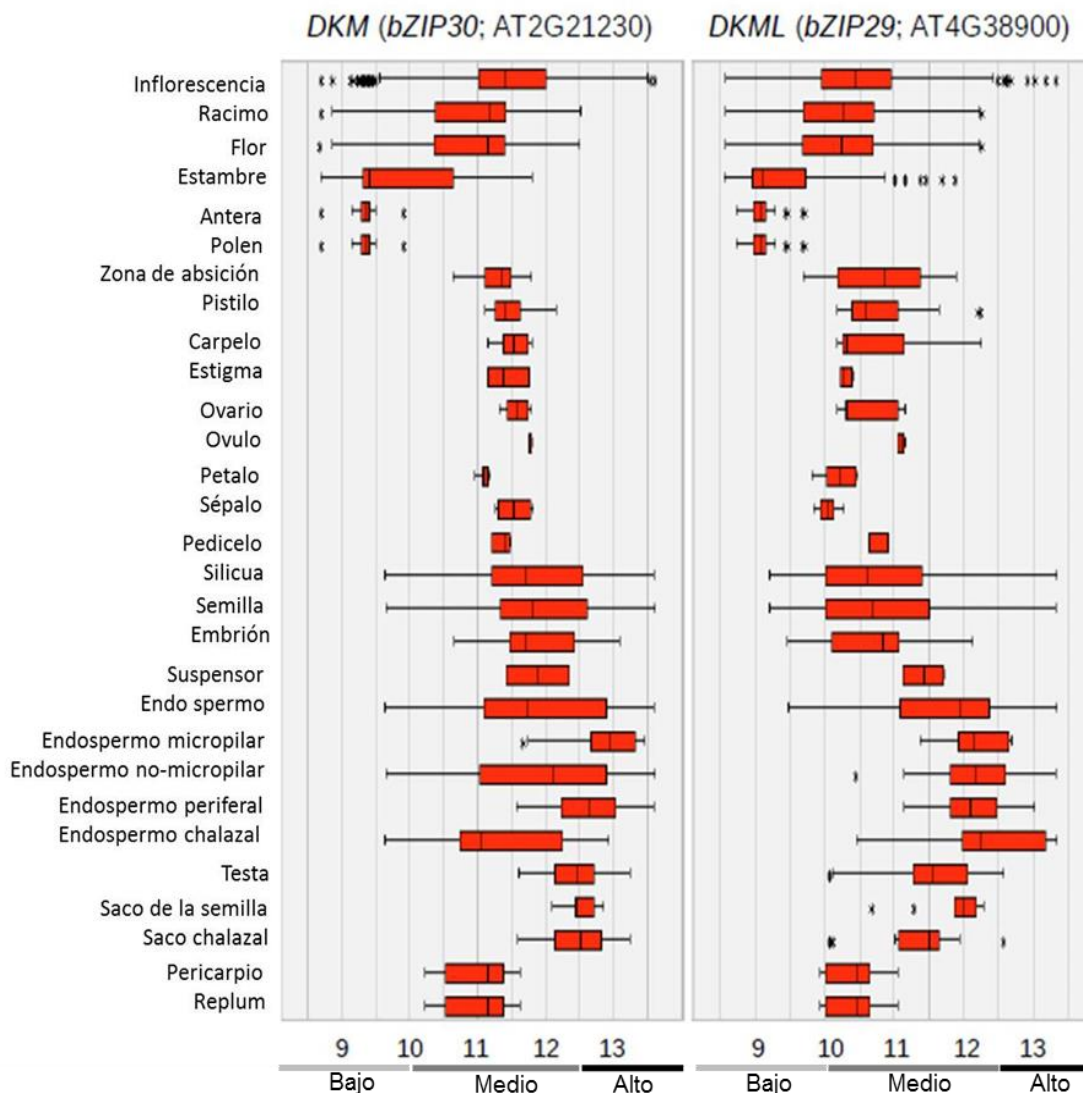


Figura 14. Perfil de expresión de los genes *DKM* y *DKML* en tejidos reproductivos. Se hizo una búsqueda del perfil de expresión de acuerdo a la información disponible en la base de datos GENEVESTIGATOR (escala log2) en tejidos reproductivos en Col-0.

Dado lo anterior, decidimos analizar el fenotipo de plantas *dkml* para lo cual se solicitó la línea insercional SALK_065254 la cual tiene la inserción de T-DNA a 530 pb del codón de inicio de la transcripción de la secuencia codificante para el gen *DKML* (**Figura 15**).



Figura 15. Esquema de la localización del T-DNA en la línea insercional para el gen *DKML*.

Además de analizar los fenotipos de las mutantes sencillas *dkm* y *dkml*, se generó y se analizó la doble mutante *dkm dkml*. El fenotipo de las plantas *dkm*, *dkml* y *dkm dkml* es opuesto al fenotipo de plantas *35S::DKM*. Desde estadios tempranos de desarrollo se observó una correlación entre los diferentes genotipos. En plántulas observamos un fenotipo en la elongación radicular entre plántulas sobreexpresantes *35S::DKM* y las plántulas con pérdida de función *dkm*, *dkml* y *dkm dkml* (**Figura 16A; Tabla 1**). En plántulas *35S::DKM* se observa una reducción estadísticamente significativa en la elongación de la raíz cuando se comparan con las plántulas silvestres. En las mutantes con pérdida de función hay un incremento en la elongación estadísticamente significativo solo en el caso de la doble pérdida de función *dkm dkml* comparado con las plántulas silvestres, no así cuando se comparan las mutantes sencillas con silvestres (**Figura 16B**).

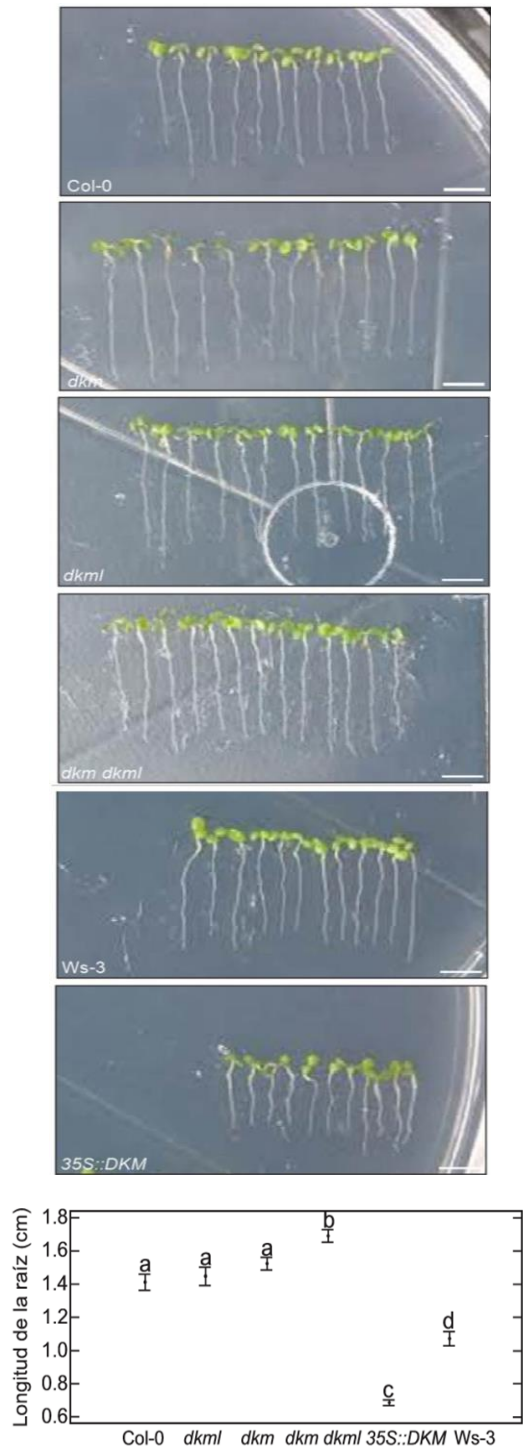


Figura 16. Efecto de la pérdida de función y sobreexpresión de *DKM* en elongación radicular. Panel A: plántulas Col-0, *dkm*, *dkml*, *dkm dkml*, *Ws-3* y *35S::DKM* de 7 días de edad. **Panel B:** Análisis estadístico ANOVA de las diferencias en la elongación radicular. Las letras indican grupos estadísticamente diferentes, n=34, 31, 31, 35, 12 y 11 para Col-0, *dkm*, *dkml*, *dkm dkml*, *Ws-3* y *35S::DKM* respectivamente p-value < 0.001. Barra de escala = 0.5 cm

Posteriormente en plantas de 19 días de edad crecidas en invernadero, el tamaño de la roseta de plantas *35S::DKM* es menor cuando se compara con plantas silvestres, mientras que se nota un aumento en el tamaño de la roseta de plantas *dkm*, *dkml* y *dkm dkml* comparado con rosetas de plantas silvestres (**Figura 17**).

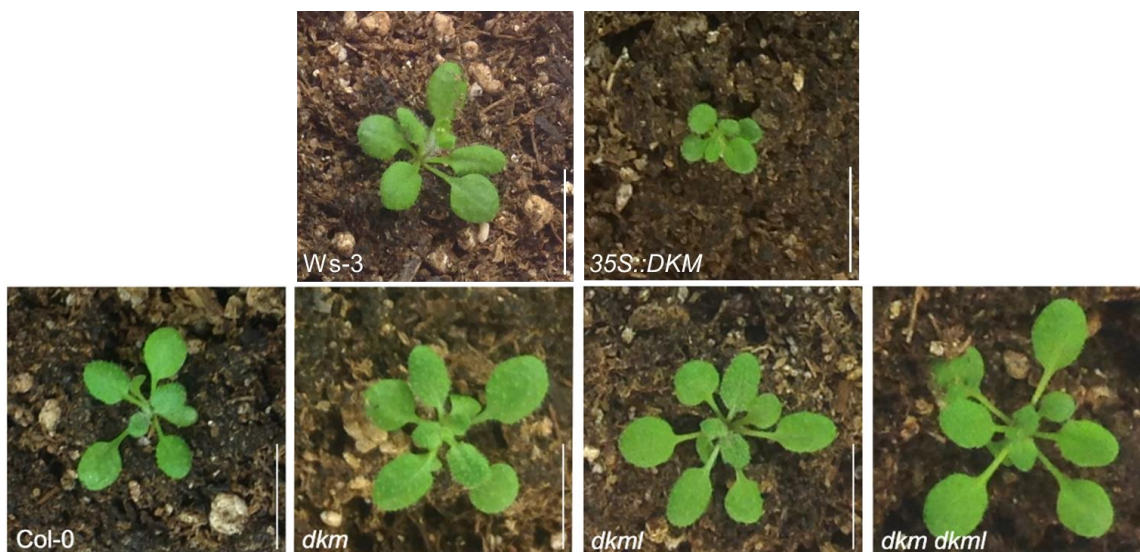


Figura 17. Fenotipo de plantas *35S::DKM*, *dkm*, *dkml* y plantas silvestres a los 19 días de edad. Barras de escala = 1 cm.

Durante el desarrollo reproductivo, cuando se compararon los fenotipos de los diferentes genotipos, utilizando microscopía electrónica de barrido, se observó un incremento en el área del domo de meristemos de inflorescencias en plantas *dkm*, donde el área es de $6899 \mu\text{m}^2$ ($n=4$), en comparación a los $3993 \mu\text{m}^2$ ($n=3$) en plantas silvestres (**Figura 18A; Tabla 1**). También se observó un incremento en el número de botones florales (19.3; $n=10$ en plantas *dkm* contra 15.8; $n=10$ en plantas Col-0) (**Figura 18B; Tabla 1**) y en la longitud de frutos en etapa 18 (1.46 cm; $n=50$ en frutos *dkm* contra 1.37; $n=50$ para frutos Col-0) (**Figura 18C**). En el caso de *dkml*, no se observó un incremento en el área del domo del meristemo de inflorescencia (**Figura 18A; Tabla 1**), sin embargo si hubo una diferencia significativa en el tamaño de las células de dicha región comparado con el tamaño de las células en el domo del meristemo de plantas silvestres (**Tabla 1**). De manera similar al caso de *dkm*, el número de botones florales se incrementó con respecto a las plantas silvestres (**Figura 18B; Tabla 1**), así como la longitud de los frutos en estadio 18 (**Figura 18C**;

Tabla 1). silvestres Col-0 sin embargo este incremento no fue mayor al que presentaron las plantas *dkm* (**Figura 18A; Tabla 1**).

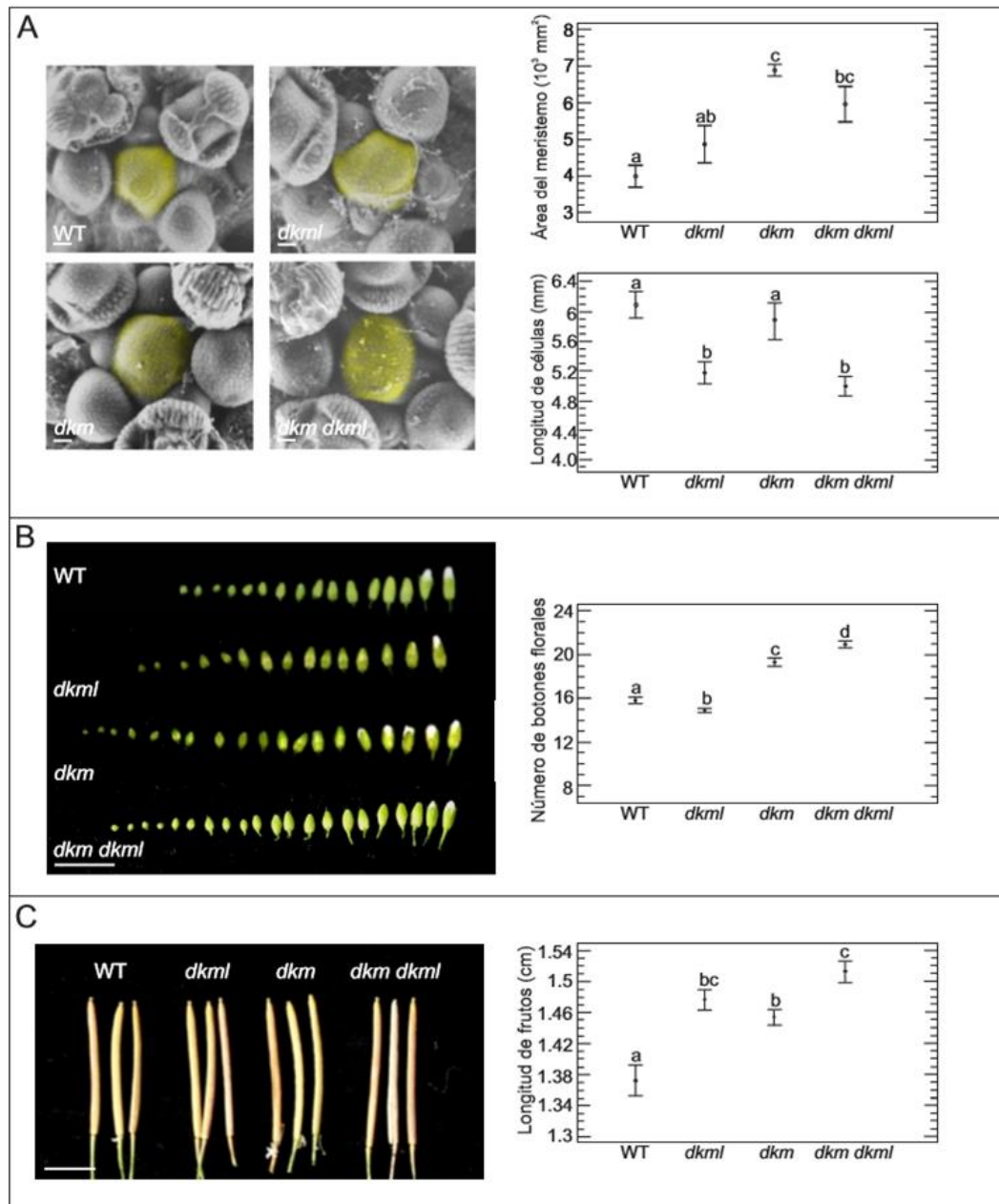


Figura 18. Fenotipos analizados en plantas silvestres y mutantes *dkm*, *dkml* y *dkm dkml*. Panel A: Micrografías electrónicas y análisis estadístico (ANOVA) para la comparación del tamaño del meristemo de inflorescencia entre las mutantes sencillas *dkm*, *dkml*, la doble mutante *dkm dkml* y plantas silvestres Col-0. Col-0 n=3; *dkm* n=4; *dkml* n=3; *dkm dkml* n=3. **Panel B:** Comparación, utilizando un análisis estadístico ANOVA, del número de botones florales en inflorescencias de plantas Col-0, *dkm*, *dkml* y *dkm dkml* de 30 días de edad. n=10 plantas. **Panel C:** Comparación de la longitud de frutos en estadio 18 provenientes de

plantas Col-0, *dkm*, *dkml* y *dkm dkml*. n=50 frutos. Cada punto en las gráficas representa el promedio \pm error standard. Las letras indican grupos estadísticamente diferentes. p-value < 0.0001. Barras de escala: 20 μm en (A); 0.5 cm en (B-C).

Utilizando microscopía electrónica de barrido, analizamos el área del domo del meristemo de inflorescencia y observamos que las plantas *dkm dkml* tienen un incremento en el área ($5952 \mu\text{m}^2$) con respecto a plantas silvestres ($3993 \mu\text{m}^2$). La longitud de las células en este tejido se redujo ($4.99\mu\text{m}$) en comparación a plantas silvestres ($6.09\mu\text{m}$), de manera similar a lo que se observó en plantas *dkml* (Tabla 1). Se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de botones florales (20.9 en *dkm dkml*; 15.8 en Col-0) y en la longitud de frutos en estadio 18 con respecto a las mutantes sencillas y a plantas silvestres (**Figura 18B-C; Tabla 1**).

7.3 Análisis de microarreglos en plantas 35S::DKM

Con el propósito de identificar genes diferencialmente expresados en plantas 35S::DKM, se realizó un análisis de microarreglos en plantas 35S::DKM y Ws-3. Los resultados arrojaron un data-set de 905 genes reprimidos contra 302 genes sobreexpresados, los cuales una vez procesados utilizando el programa Bingo (Maere *et al*, 2005) mostraron que la única categoría Gene-ontology que resultó enriquecida (corrected p-value < 0.05), corresponde a “cellular compartment y plastid-related”. Dentro de los 1207 genes diferencialmente expresados encontramos genes involucrados en la regulación de la transcripción, en el estrés biótico y abiótico, desarrollo embrionario, transducción de señales y a señalización y respuesta a hormonas. En la Tabla 2 se enlistan algunos de los genes ya reportados que mostraron un cambio en el patrón de expresión y que resultaron de nuestro interés, dado el fenotipo de las plantas 35S::DKM.

Tabla 2. Selección de genes expresados diferencialmente en plantas 35S::DKM.

Proceso celular	Regulación	Nombre del gen
Factor de transcripción	Sobreexpresados	<i>DKM, JAG, OFP1, OFP12, REM3, REM14, LBD29, HDG9, AT1G76580/SPL16, WR14</i>
	Reprimidos	<i>BEL1, HAN, LBD16, LBD20, LBD27, OFP11, AP2, TOE1, SMZ, CBF1, TCP3, TCP9, REM39, GNC, SIZ1, HB53, BRN1, WRKY51, WRKY54</i>
Ciclo celular	Sobreexpresados	<i>DPA, AT5G48630/CYCC1;2, SWEETIE, CSN5A, KIS, TTN1, QQT2, TUBG1, JAG</i>
	Reprimidos	<i>CYCA2;3, CYCA3;3, KRP6, CDKF;1, CLUB, ASF1A, BUB3.1, CUL4, SKP1, ORS1, LBD27, MAPKKK14, POL, ELP2, UBA2, TOR1/SPR2, HUB2, APC4, MEE34, SIZ1, MSH4, MLH1</i>
Pared celular	Sobreexpresados	<i>FLA12, IRX6/COBL4, COBL11, PGA3, PME44, ROPGEF4, CASP4</i>
	Reprimidos	<i>BRN1, PME5, PME41, VGDH1, PMEPCRD, ROPGEF8, POM1, CSLC4, AGC1.7, MRH1, RWA1, PER36, TBL7, TBL28, TBL33, TBL44, XTH3, XTH7, XTH22, UGD2, SPDS2</i>
Síntesis señalización y transporte de hormonas	Sobreexpresados	Aux: <i>PLDP2</i> ABA: <i>NCED3/STO1</i> GA: <i>SLY1</i> BR: <i>CDLI</i>
	Reprimidos	Aux: <i>LAX2, PIN7, SHY1/IAA6, ARF19, CNX7/SIR5</i> CK: <i>AHK3, CKX2</i> ABA: <i>PYR1, NCED2, NCED5, ASPG1, ABCG25, SAD2, RD26, PGGT-I, DOR, IMB1, SDIR1</i> GA: <i>GA2OX6, GA20OX5</i> BR: <i>BAS1, HERK1, EXO</i> JA: <i>JAZ10, DGL</i> Etileno: <i>EIN3, EDF3, RTE1</i>
Actividad meristemática y SAM	Reprimidos	<i>BEL1, POL, CRN, CLE19, PSD, HAN, AP2</i>

7.4 Inducción de la transcripción de los genes *JAG* y *OFPI*

Del grupo de genes con expresión diferencial en plantas *35S::DKM*, resultaron de interés los genes *JAG* y *OFPI* los cuales se encuentran sobreexpresados (z -score = 2.4 y z -score = 4.1), ya que se ha reportado su papel como reguladores negativos del desarrollo (Schiessl *et al.*, 2012; Schiessl *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Liu and Douglas, 2015). Con la finalidad de analizar si *DKM* podía inducir la expresión de *JAG* y *OFPI* a diferentes tiempos, se utilizó una línea inducible *35S::GALA-VP16-GR UAS::DKM* (*35S::GVG>>DKM*) para analizar mediante RT-PCR semi-cuantitativo el patrón de expresión de *JAG* y *OFPI* en inflorescencias. En dicho análisis se observó que *JAG* y *OFPI* son inducidos después de 4 y 8 horas de inducción con dexametasona respectivamente (**Figura 19**).

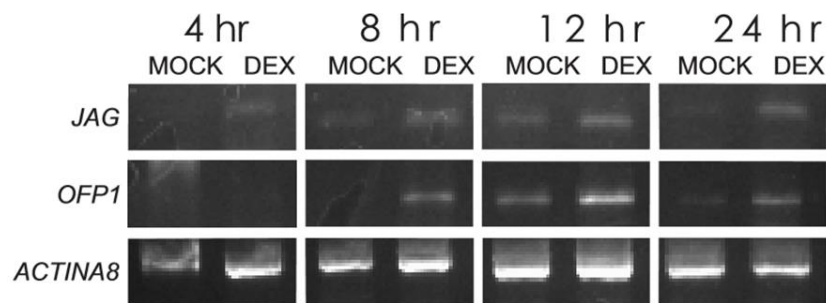


Figura 19. Ensayo de inducción de la sobreexpresión de *DKM*. Experimento de RT-PCR semi-cuantitativo en líneas inducibles (*35S::GVG>>DKM*), para el análisis de la abundancia de transcritos *JAG* y *OFPI* a 4, 8, 12 y 24 horas después la inducción con dexametasona de la sobreexpresión de *DKM*.

Una vez que se demostró la inducción de *JAG* por *DKM* analizamos el patrón de expresión de *JAG* en el fondo *35S::DKM*, en diferentes estadios de desarrollo del gineceo, para lo cual se realizaron cortes histológicos. Los resultados mostraron que en el fondo *35S::DKM*, *JAG* se expresa en estadios de desarrollo más tempranos y que además, dicha inducción no es ectópica, es decir, se conserva el patrón de expresión ya reportado para *JAG*, el cual se localiza solo en tejidos laterales, es decir, en las valvas (**Figura 20**).

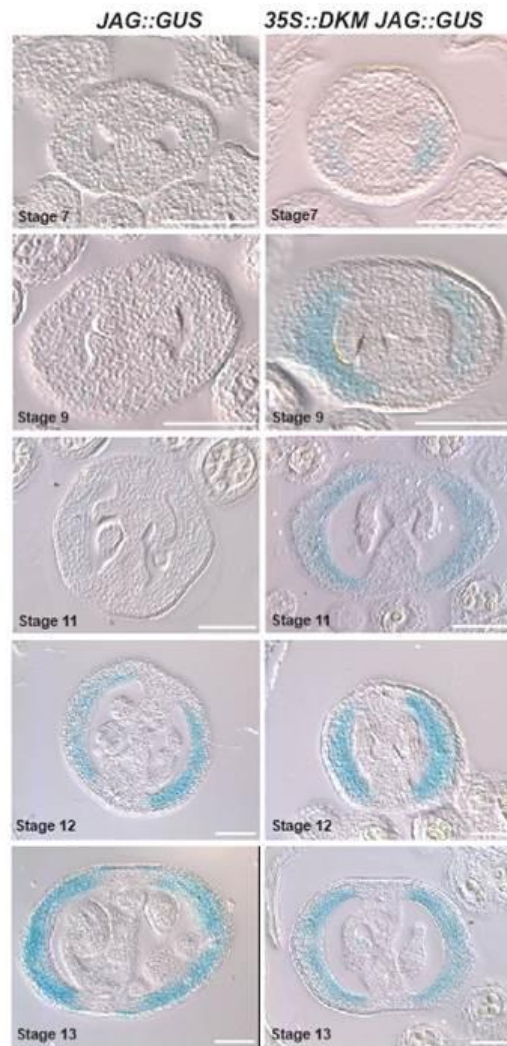


Figura 20. Análisis del patrón de expresión del promotor del gen *JAG* en el fondo *35S::DKM*, a diferentes estadios de desarrollo del gineceo. Cortes transversales de gineceos provenientes de la línea marcadora *JAG::GUS* (izquierda) y la cruz *35S::DKM JAG::GUS* (derecha) en estadios 7-13 de la escala de desarrollo floral. Barra de escala = 50 μ m.

7.5 Versión represora de *DKM*

La sobreexpresión de *DKM* causa una reducción en la altura de las plantas (**Figura 10A**, **Figura 16** y **Figura 17**), afecta el tamaño del meristemo de inflorescencia (**Figura 10D-E**), la generación de botones florales (**Figura 10B-C**) y diferentes aspectos del proceso de fecundación en plantas de *Arabidopsis* (**Figura 11**). Resultados de microarreglos muestran que tres cuartas partes de los genes con cambios en el patrón de expresión por la sobreexpresión de *DKM* son reprimidos, dichas evidencias proponen a *DKM* como un

represor o regulador negativo del desarrollo. Con el propósito de comprobar esta hipótesis, se generó la línea dominante-negativa *35S::DKM:SRDX* en el fondo Col-0. Una proporción de plantas *35S::DKM:SRDX* (el 14 % de una población de 90 plántulas) presentaron defectos en etapas tempranas del desarrollo, plántulas de 7 días de edad mostraron una reducción importante del SAM (Figura 21B) comparado con plántulas silvestres (Figura 21A). Posteriormente se encontraron diferentes fenotipos similares a los que se observan en plantas *35S::DKM* como: enanismo (Figura 21C-D), disminución en la formación de botones florales (Figura 21E-F) y poca fecundación de pistilos (Figura 21G).

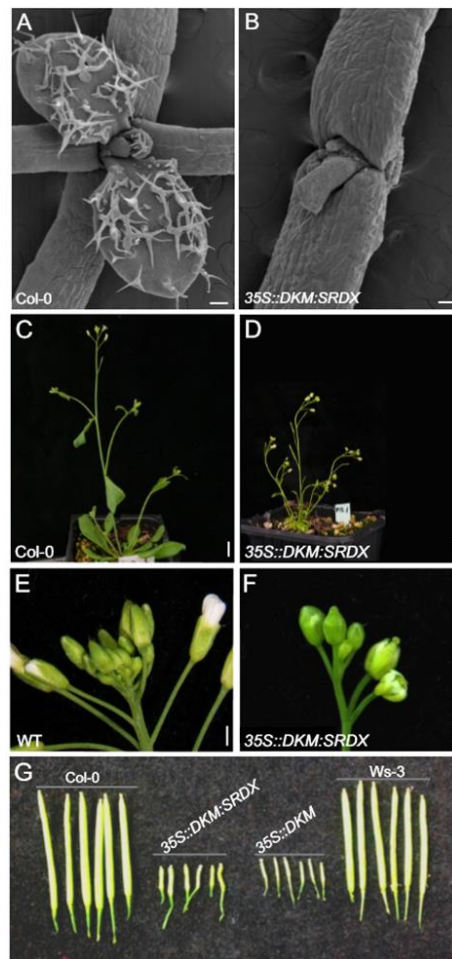


Figura 21. Fenotipos de plantas *35S::DKM:SRDX*. Panel A-B: Comparación del brote de las primeras hojas verdaderas en meristemo vegetativo de plantas Col-0 (Panel A) y *35S::DKM:SRDX* (Panel B). Panel C-D: Comparación de la talla en plantas adultas (37 días de edad) Col-0 y *35S::DKM:SRDX*. Panel E-F: Comparación de la formación de botones florales en inflorescencias Col-0 (Panel E) y *35S::DKM:SRDX* (Panel F). Panel G: Frutos provenientes de plantas Ws-3, *35S::DKM:SRDX*, *35S::DKM* y Ws-3 en estadio 17. Barras de escala: 100 μ m en (A-B); 3 mm en (C-D); 1mm en (E-F); 5 mm en (G).

7.6 Efecto de la alteración de la expresión de *DKM* en tejidos meristemáticos

Dado que observamos que la sobreexpresión y la pérdida de función del gen *DKM* afecta el tamaño del meristemo de inflorescencia, decidimos evaluar si la sobreexpresión de *DKM* causaba alguna alteración en el meristemo vegetativo.

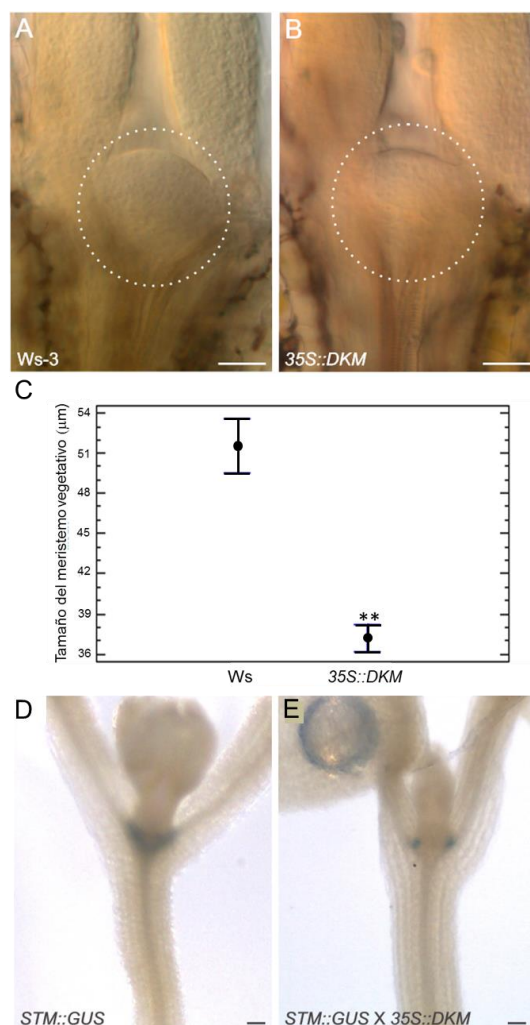


Figura 22. Alteraciones en el meristemo apical de plantas *35S::DKM*. Panel A-B: Plántulas de 5 días de edad clareadas utilizando solución Hoyer. La línea punteada blanca señala que el meristemo apical de plántulas *35S::DKM* (Panel B) es más pequeño que el meristemo apical de plántulas silvestres. Panel C: Mientras que el promedio de los meristemos vegetativos de plántulas silvestres miden 51.52 μm , (n=3, SE ± 3.46), los meristemos de plántulas *35S::DKM* miden 37.12 μm (n=3, SE ± 1.75), dicha diferencia es estadísticamente significativa (p-value<0.003). Panel D-E: Expresión del gen *STM* en plántulas de 7 días de edad de la línea marcadora *STM::GUS* (Panel C) y en el fondo *35S::DKM* (Panel D). Barras de escala: 20 μm en (A-B); 10 μm en (D-E).

Se clarearon plántulas *35S::DKM* de 5 días de edad y se observó una reducción estadísticamente significativa en el tamaño del meristemo vegetativo (SAM) de plántulas *35S::DKM* comparado con plántulas *Ws-3* (**Figura 22A-C**). Por otro lado se analizó el patrón de expresión del gen *STM* utilizando la línea marcadora *STM::GUS* en el fondo *35S::DKM*. En plántulas de 7 días de edad se observa una reducción del dominio de expresión de *STM*, dado que la señal GUS es visible solo en las células adyacentes al meristemo (**Figura 22D-E**).

El meristemo radicular también es afectado por la sobreexpresión y pérdida de función de *DKM*. Además de que las raíces de plántulas *35S::DKM* de 7 días de edad tienen una reducción en la elongación de la raíz comparado con plántulas silvestres (**Figura 16**).

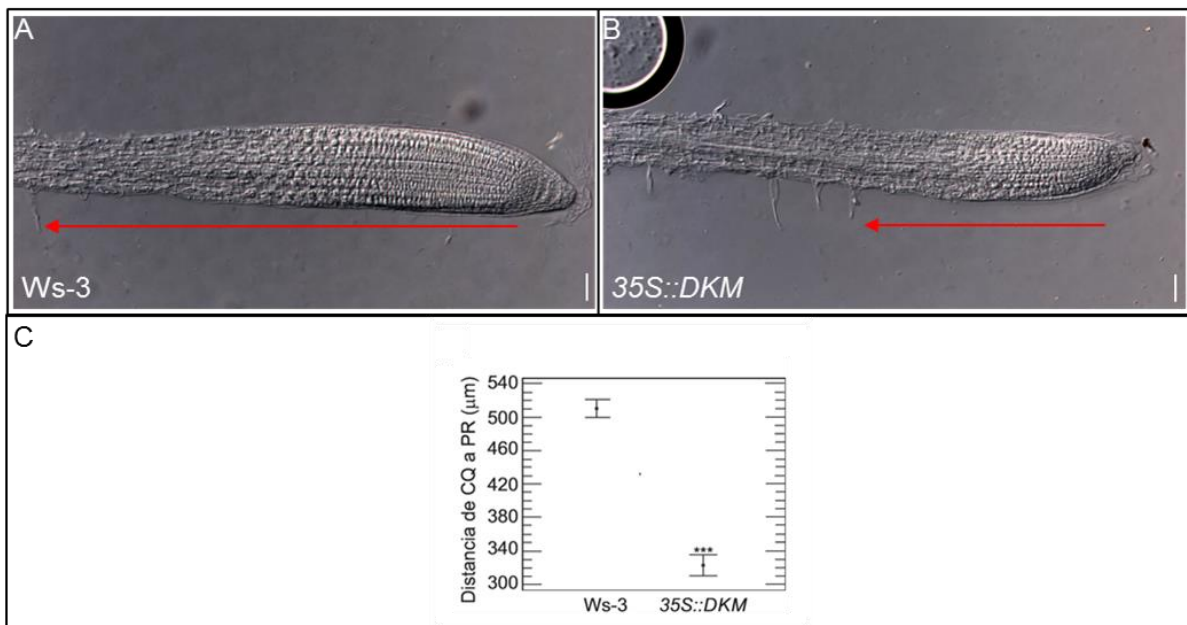


Figura 23. Comparación del meristemo radicular de plántulas *Ws-3* y *35S::DKM*. En el meristemo radicular de plántulas de 7 días de edad *35S::DKM* (Panel B) se observan pelos radiculares (PR) más cerca del centro quiescente que en plántulas *Ws-3* (Panel A), dicha diferencia se evaluó estadísticamente usando un análisis t-Student (Panel C). Los datos están representados con base en la media \pm SE; n=12 para plántulas silvestres y n=5 para *35S::DKM*; *** p-value < 0.0001. La barra de escala representa 20 μ m.

En el meristemo radicular de plántulas *35S::DKM* se observan pelos radiculares muy próximos al centro quiescente comparado con lo que se observa en plántulas silvestres (**Figura 23A-C**). Analizando en detalle, además de los pelos radiculares también se

observan células elongadas muy próximas al centro quiescente (**Figura 24C**), comparado al tamaño de las células que se observan en el caso de las raíces silvestres (**Figura 24A**) y el dominio de proliferación celular, que es fácilmente distinguible en el meristemo radicular de plántulas silvestres (**Figura 24B**), no es evidente en el meristemo radicular de plántulas *35S::DKM* (**Figura 24D**).

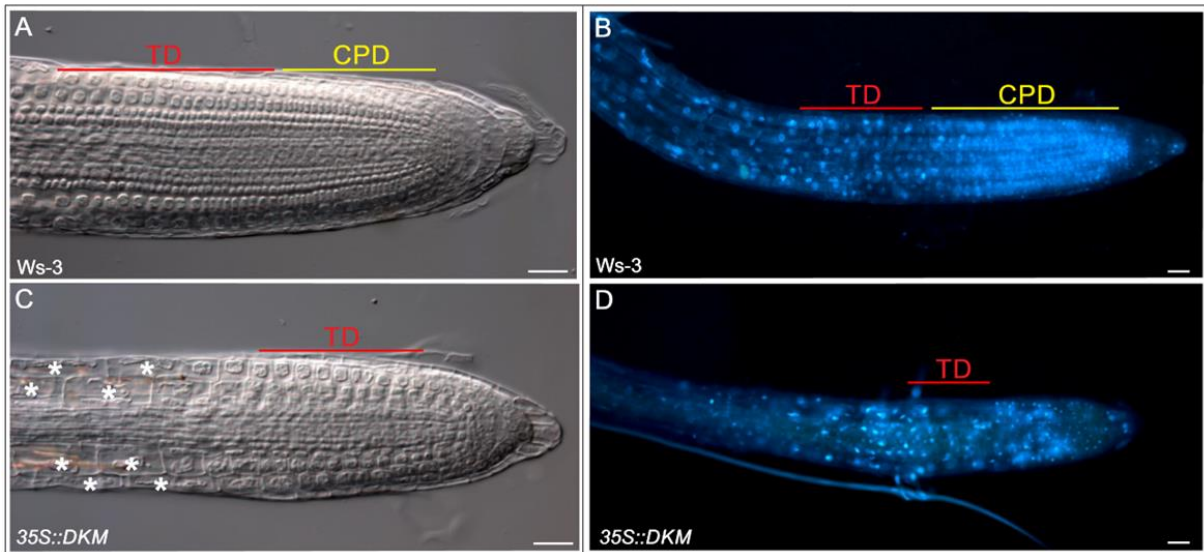


Figura 24. Análisis del dominio de proliferación celular y de transición en el meristemo radicular de plántulas *35S::DKM*. Micrografías de contraste de interferencia diferencial (**Panel A,C**) y de fluorescencia (**Panel B,D**) de plántulas *Ws-3* y *35S::DKM* de 7 días de edad. Las raíces en B y D se tiñeron con DAPI. La nomenclatura de los dominios: CPD=Dominio de Proliferación Celular y TD=Dominio de Transición, son de acuerdo a lo propuesto por Ivanov y Dubrovsky (Ivanov and Dubrovsky, 2013). Los asteriscos blancos en C señalan células elongadas muy próximas al centro quiescente que no se observan en el caso de las plántulas silvestres (A). Las barras de escala representan 20 μm .

Caso contrario, en plántulas *dkm*, *dkml* y *dkm dkml* de 7 días de edad se observa una expansión del dominio de proliferación celular (**Figura 25A**), dicha expansión es estadísticamente significativa (**Figura 25B**).

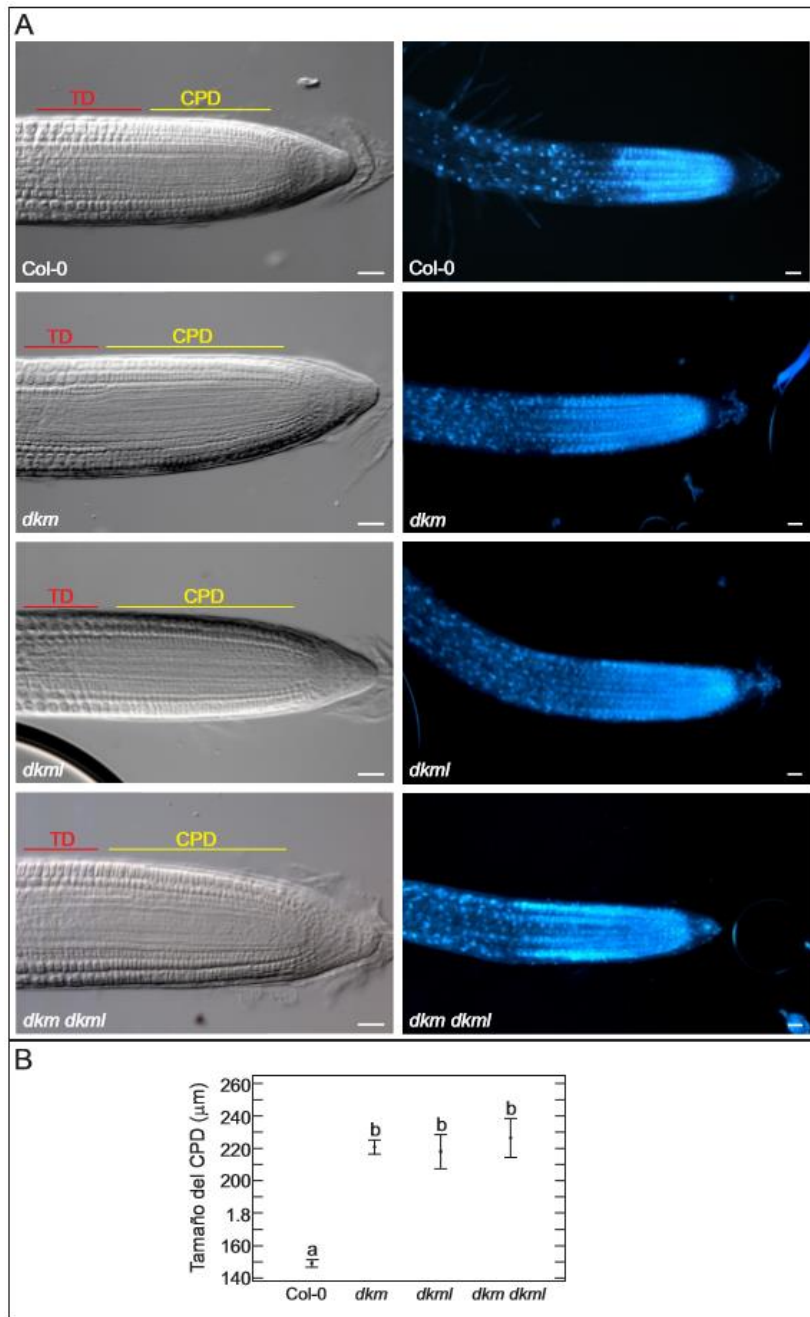


Figura 25. Comparación del meristemo radicular de plántulas Col-0, *dkm*, *dkml* y *dkm dkml*. Panel A: micrografías de contraste de interferencia diferencial (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de raíces de plántulas Col-0, *dkm*, *dkml* y *dkm dkml* de 7 días de edad. Las raíces de la columna derecha se tiñeron con DAPI. La nomenclatura de los dominios: CPD=Dominio de Proliferación Celular y TD=Dominio de Transición, es de acuerdo a lo propuesto por Ivanov y Dubrovsky (2013). **Panel B:** Análisis estadístico ANOVA de la diferencia en la extensión del dominio CPD entre los diferentes genotipos. Las letras representan grupos estadísticamente diferentes. En B n=7, 6, 6 y 4 para Col-0, *dkm*, *dkml* y *dkm dkml* respectivamente; p-value < 0.001. Las barras de escala representan 10 µm.

7.7 Interacciones proteína-proteína

Con la finalidad de conocer más sobre los mecanismos en los que participa DKM se llevó a cabo una búsqueda de proteínas interactoras mediante ensayos de dos híbridos (Y2H) en levadura y en plantas de tabaco. Primero se realizó un ensayo de autoactivación de la proteína DKM utilizando medios de cultivo carentes en leucina e histidina (-LH) (**Figura 26A**). Posteriormente se probaron las siguientes interacciones DKM con las proteínas WUS, HEC1, KNAT1/BP, KNAT2, JAB, BEL1, PAN, HEC3 and NGA1, de las cuales las interacciones positivas en levadura fueron WUS, HEC1, KNAT1/BP, KNAT2, JAB, BEL1 y NGA1 (**Figura 26B**). Finalmente las interacciones positivas fueron probadas en tabaco mediante un ensayo BiFC (bimolecular fluorescence complementation). En dicho ensayo se observó señal de la proteína amarillo fluorescente YFP en el núcleo y citoplasma para las interacciones DKM-HEC1, DKM-KNAT1, DKM-JAB y DKM-BEL1 (**Figura 26C**). La interacción DKM-NGA1 y DKM-KNAT2 solo se observó en el núcleo (**Figura 26C**) y la interacción DKM-WUS se observó en el citoplasma (**Figura 26C**).

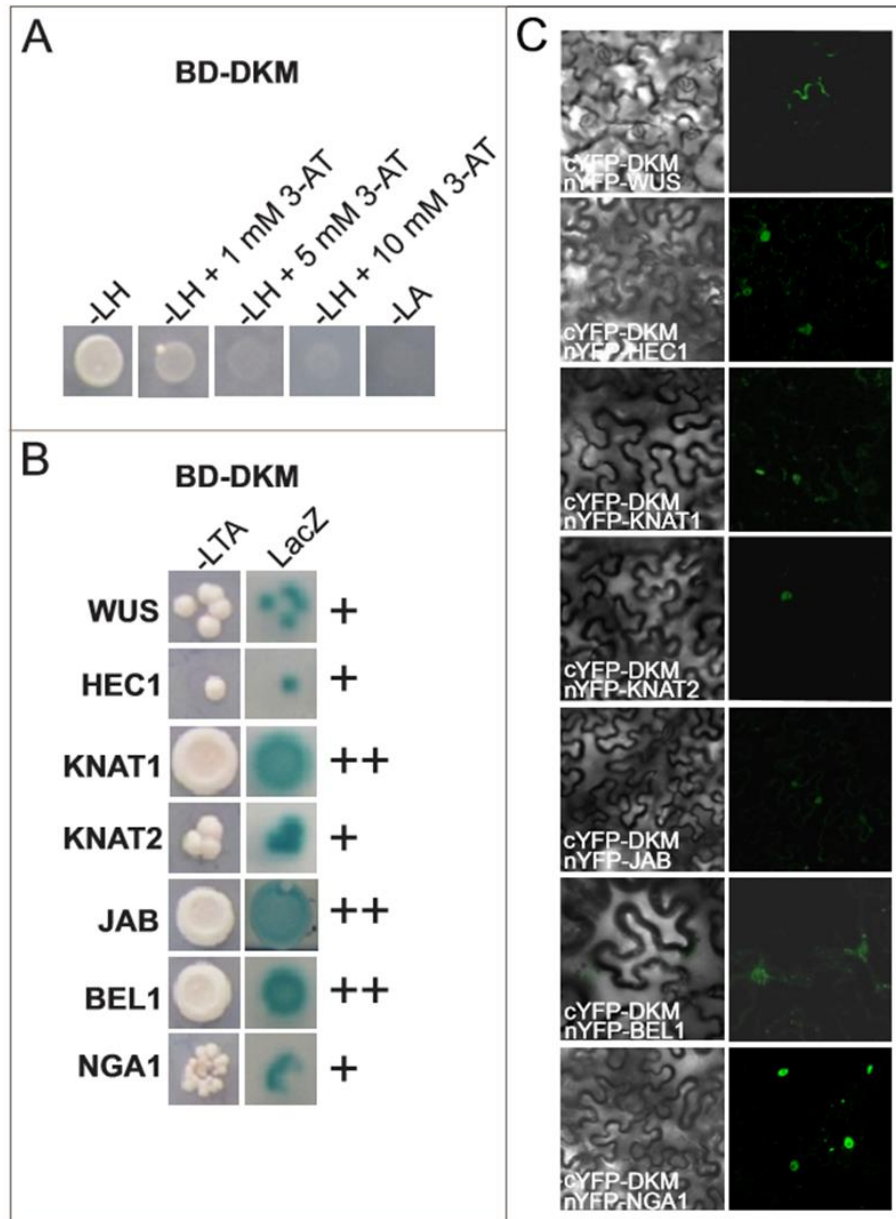


Figura 26. Interacciones proteína-proteína. Panel A: Ensayo de autoactivación de la proteína DKM clonada en el plásmido que contiene el dominio de unión a DNA (BD=Binding Domain). Para este ensayo las levaduras se crecieron en medio de cultivo que carece de leucina e histidina (-LH) y concentraciones crecientes de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT). Además, se comprobó la activación del marcador LacZ. **Panel B:** Experimento de dos híbridos en levadura (Y2H), donde la proteína DKM está clonada en el plásmido que contiene el dominio de unión a DNA y las proteínas WUS, HEC1, KNAT1, JAB, BEL1 y NGA1 están clonadas en el plásmido que contiene el dominio de Activación de la transcripción (AD). **Panel C:** Experimento de complementación bimolecular de la proteína amarillo fluorescente (BiFC) entre la proteína DKM y WUS, HEC1, KNAT1, KNAT2, BEL1 y NGA1.

8. DISCUSIÓN

8.1 El gen *DKM* regula negativamente el crecimiento y desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*

El gen *DKM* (*bZIP30*) que pertenece al subgrupo I de la familia de factores de transcripción tipo bZIP, se encuentra aproximadamente a 700 pb de donde está localizado el elemento activador (AIE) en la mutante por ganancia de función *pit1-D* y tiene un aumento en la abundancia del transcrito. Durante los ensayos de recapitulación, plantas *35S::DKM* mostraron características muy cercanas al fenotipo de *pit1-D*, como una reducción general en el tamaño de la planta, reducción en el tamaño del meristemo apical, en el número de botones florales y semi-esterilidad. Por esta razón decidimos enfocar el objetivo del presente trabajo en caracterizar la función del gen *DKM* en el desarrollo de *Arabidopsis*. Un primer paso fue analizar los fenotipos que presentaban plantas con sobreexpresión y pérdida de función para el gen, dichos fenotipos son contrastantes y encontramos congruencia en los mismos. En el caso del análisis de los fenotipos de plantas con pérdida de función, se analizó el fenotipo de la mutante sencilla *dkm*, el fenotipo de la mutante del parálogo *DKML* (*bZIP29-AT4G38900*) y la mutante doble *dkm dkml*.

Por un lado, el SAM de inflorescencias de plantas *35S::DKM* presenta una reducción del tamaño del domo, pero el tamaño de las células en ese tejido es mayor (Tabla 1). En contraste, en las mutantes sencillas *dkm*, *dkml* y la doble mutante *dkm dkml*, se observó lo opuesto, es decir, un aumento en el tamaño del SAM. En el domo del meristemo de inflorescencia de las plantas con pérdida de función, se observó una reducción estadísticamente significativa en el tamaño de las células solo para la mutante *dkml*. La diferencia en el tamaño de las células en dicho tejido en las mutantes *dkm* y *dkm dkml* no es estadísticamente significativa. Este resultado permitía suponer que *DKM* tiene influencia en la actividad de SAM afectando negativamente la división celular. La reducción en el número de células en el SAM puede resultar en una reducción en el número de botones florales y vice versa (Tabla 1), fenotipos que han sido previamente relacionados a alteraciones en la actividad meristemática como lo ha reportado Bartrina y colaboradores (Bartrina *et al.*, 2011). La reducción del dominio del CMM puede explicar las alteraciones que se observan en el desarrollo del septum y la formación de menos óvulos por gineceo

(Figura 11A-B) como ha sido reportado para el caso de la doble mutante *seu ant* (Azhakanandam *et al.*, 2008). Azhakanandam y colaboradores mostraron que la reducción en la proliferación celular o en el crecimiento del dominio medio del gineceo resulta en la pérdida de formación de óvulos. Así, se generó la versión represora dominante de *DKM* y, como se esperaba, las plantas *35S::DKM:SRDX* comparten fenotipos de las plantas *35S::DKM* como el enanismo, la afectación en el número de botones florales y la esterilidad. Algunas líneas con la construcción *35S::DKM:SRDX* tuvieron un fenotipo aún más severo en el que el meristemo apical se arresta en plántulas (Figura 21B). Queda como parte de las perspectivas analizar cuál es la afectación en el desarrollo embrionario y en la formación de polen viable.

Los resultados que se obtuvieron en las mediciones de la elongación radicular y en el desarrollo del meristemo radicular permiten proponer que *DKM* regula el correcto desarrollo de este tejido ya que de nuevo, los fenotipos de sobreexpresión y de pérdida de función vuelven a ser consistentes en que *DKM* es un regulador negativo. Dado que en el presente trabajo no se abordó a profundidad este aspecto, resulta interesante hacer cruza con líneas marcadoras del centro quiescente y transportadores de auxinas para determinar cuál es la ruta en la que *DKM* puede estar participando.

8.2 *DKM* afecta división y elongación celular

En plantas el crecimiento de órganos está determinado por un conjunto de procesos: síntesis macromolecular (crecimiento citoplásmica, extensión de la pared celular, ciclo mitótico y endociclo (Sablowski and Carnier Dornelas, 2014). La coordinación entre dichos procesos aún no está completamente descrita. *JAG* juega un papel importante en el proceso del crecimiento de órganos. *JAG* se expresa en primordios de órganos y regula la coordinación de la división y expansión celular durante la morfogénesis. Con base en el resultado de microarreglos que se hizo utilizando plantas *35S::DKM* encontramos que *JAG* está sobreexpresado (z-score = 2.4), posteriormente utilizando la línea inducible (*35S::GVG>>DKM*) confirmamos la sobreexpresión 4 horas después de la inducción de *DKM*, dicha sobreexpresión es tejido-específica, como se demostró con los cortes histológicos en gineceos de plantas *35S::DKM X JAG::GUS*. Se ha reportado recientemente que *JAG* reprime directamente genes involucrados en el desarrollo del

meristemo como *CLAVATA1*, *BP* y *BEL1*, además de que regula genes involucrados en la polaridad de tejidos, modificaciones de pared celular y ciclo celular. *JAG* reprime directamente el gen *KRP2* y *KRP4* quienes a su vez reprimen la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Schiessl *et al.*, 2014). La represión de *JAG* sobre genes *KRP* es consistente con el rol de *JAG* en promover la proliferación celular (Schiessl *et al.*, 2012). Es importante destacar que no todos los genes *KRP* regulan el ciclo celular de la misma manera, mientras que *KRP1* y *KRP2* están asociados con inhibición de la mitosis y por consecuencia con la inhibición de la división celular, ha sido reportado recientemente que cuando se sobreexpresa *KRP6* (que resultó reprimido en el microarreglo de *35S::DKM*, z-score = -2.59), puede acelerar la entrada al ciclo mitótico, retrasar la progresión y la salida del mismo (Vieira *et al.*, 2014). Por otro lado, dos ciclinas resultaron reprimidas *CYCA2;3* y *CYCA3;3*, ambas son necesarias para la transición de la fase S a la fase M. *CKDF* quien codifica para una cinasa específica de plantas y que desencadena una cadena de fosforilaciones que terminan en la activación de la RNA polimerasa II para la transcripción basal, esta reprimida en plantas *35S::DKM* (z-score = -2.34) (Hajheidari *et al.*, 2012). Otro componente regulador clave del ciclo celular con cambio en el patrón de expresión es *DPa* quien está sobreexpresado (z-score = 2.27). *DPa* interactúa con la proteína E2F y cuando se sobreexpresan juntas causan proliferación celular descontrolada y un retraso en la diferenciación lo que ocasiona un prematuro arresto del crecimiento de la planta (De Veylder *et al.*, 2002) con regiones en las que se observan muchas más células con acentuada endoreduplicación (De Veylder *et al.*, 2002). De acuerdo a los resultados de microarreglos, *E2Fa* no parece tener un cambio en el patrón de expresión en las plantas *35S::DKM*, lo cual podría explicar porque no observamos más células en el SAM de inflorescencias (Tabla 1). Por otro lado, el aumento en el tamaño de las células podría ser causado por un incremento en el ciclo de endoreduplicación (Czesnick and Lenhard *et al.*, 2015). El complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C), formado por ubiquitin ligasas E3, regula la progresión del ciclo celular durante mitosis y meiosis. APC/C tiene como blancos proteínas reguladoras del ciclo mitótico como ciclinas (Pesin and Orr-Weaver, 2008; McLean *et al.*, 2011). *APC4* codifica para una subunidad del complejo APC/C y se ha propuesto que forma parte del conector que une los diferentes módulos del complejo (van Leuken *et al.*, 2008). Se ha reportado que la mutante *apc4* presenta defectos en el gametofito femenino y

alteraciones durante la embriogénesis lo que resulta en una reducción de la fertilidad (Wang *et al.*, 2012). *APC4* está reprimido en plantas sobreexpresantes *DKM* (z-score = -2.06). Otra ubiquitin ligase E3 es el complejo SCF, que es otro regulador importante del ciclo celular, específicamente, durante la transición G1 – S (Gray *et al.*, 1999; Roodbarkelari *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2004). Varios miembros del complejo SCF aparecen reprimidos en nuestro microarreglo: *SKP1*: z-score = -2.37, *CULA*: z-score = -3.03, y la proteína F-box *ASK1*: z-score = -2.37. En resumen muchos componentes de la red que controla el ciclo celular están alterados, lo cual puede tener un efecto negativo en la progresión del mismo. Lo anterior puede explicar la reducción del número de células en el SAM, la reducción de la formación de botones florales y la reducción de la zona de división celular en el meristemo radicular en plantas *35S::DKM*.

Otro gen que tiene un patrón de expresión diferencial en plantas sobreexpresantes *DKM* es *OFPI* el cual ha sido reportado como un represor de la elongación celular. *OFPI* y *DKM* pueden interactuar físicamente con *KNAT1/BP* y *BEL1* (**Figura 6**; Hackbusch *et al.*, 2005) y la sobreexpresión de *OFPI* causa una reducción en la longitud de los órganos aéreos incluyendo cotiledones, hojas y órganos florales (Wang *et al.*, 2007). En el microarreglo *OFPI* está sobreexpresado (z-score = 4.1), y en el ensayo de inducción *OFPI* responde a las 8 horas de inducido *DKM* (**Figura 19**). Resulta interesante que *OFPI* es un blanco directo de *JAG* y de manera general muchos genes blanco de *JAG* (Schiessl *et al.*, 2014) pertenecen a familias de genes o regulan procesos que también resultaron afectados por *DKM* (el presente trabajo). Dicha coincidencia refleja que puede existir una conexión entre los dos genes, partiendo del hecho de que hemos comprobado mediante diferentes estrategias experimentales que *DKM* puede activar la expresión de *JAG*. *JAG* se expresa en primordios de órganos (Dinneny *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2004) mientras que *DKM* en meristemas y en primordios de botones florales (**Figura 8A**). Con la evidencia acumulada podemos proponer que ambos genes participan en la comunicación entre el meristemo y los primordios de órganos.

Por otro lado, 17 genes que codifican para proteínas de la familia citocromo P450, las cuales catalizan una amplia variedad de reacciones de monoixigenación/hidroxilación en metabolismo primario y secundario (Mizutani and Ohta, 2010) tuvieron cambio en el

patrón de expresión en el microarreglo (Anexo 12.5). Un ejemplo es *CYP78A7* que es redundante al gen ya caracterizado *CYP78A5/KLUH (KLU)*, y aparece como sobreexpresado (Wang *et al.*, 2008), (z-score = 2.7). Se ha propuesto que la familia de proteínas CYP78A controla el tamaño y forma de órganos así como la arquitectura produciendo una señal móvil que estimula la proliferación celular (Zondlo and Irish, 1999; Wang *et al.*, 2008; Anastasiou *et al.*, 2007; Adamski *et al.*, 2009; Sotelo-Silveira *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2012). Otro miembro de la familia P450 que tiene patrón diferencial es *BASI/CYP72B1*, que aparece reprimido (z-score = -4.32) en el microarreglo. *BASI* codifica para una enzima que inactiva la forma activa de brasinoesteroides. Los brasinoesteroides son hormonas esteroidales de plantas y es bien sabido que tienen funciones importantes en el crecimiento de plantas, principalmente promoviendo la expansión celular, recientemente se ha reportado que están implicados también en la regulación del ciclo celular (Clouse, 2011; Cheon *et al.*, 2010; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2011; Hacham *et al.*, 2011). En raíces, los brasinoesteroides promueven el ciclo mitótico y la expansión celular, lo que asegura la progresión normal del ciclo celular a lo largo de las zonas meristemáticas de la raíz (Hacham *et al.*, 2011). En el SAM, se ha reportado recientemente que se requiere una reducción en el nivel o en la sensibilidad de brasinoesteroides con el fin de permitir la expresión de genes denominados “boundary identity” (Gendrán *et al.*, 2012). En resumen, *DKM* afecta la expresión, directa o indirectamente, de varios genes que han sido reportados que modulan crecimiento celular y/o ciclo celular, esto nos permite proponer que *DKM* actúa a través de estos procesos para regular negativamente el crecimiento de *Arabidopsis*.

8.3 *DKM* como un regulador del desarrollo del meristemo

Los datos presentados en este trabajo sugieren que *DKM* es un regulador del desarrollo del meristemo, esto hace sentido cuando se observa su patrón de expresión, el cual se localiza en el SAM a lo largo de la zona central y la zona periférica, también en el meristemo floral y en los primordios de los órganos florales (**Figura 8A**). La sobreexpresión de *DKM* causa un fenotipo claro de reducción en el tamaño (SAM) y en el número (primordios florales) (**Figura 10; Tabla 1**). De acuerdo a datos de GENEVESTIGATOR, *DKM* también se expresa en raíces (**Anexo 12.2**). El meristemo radicular es afectado por la sobreexpresión y pérdida de función de *DKM*, el dominio de proliferación celular es más grande en plántulas

dkm, *dkml* y *dkm dkml* (**Figura 25A-B**). Contrariamente dicho dominio es difícil de distinguir en plántulas *35S::DKM* (**Figura 24C-D**), lo cual parece ser la causa de la presencia de células muy elongadas y pelos radiculares mucho más cerca del centro quiescente comparado con lo que se observa en plántulas silvestres (**Figura 24C; Figura 23A-C**). La ausencia del dominio de proliferación correlaciona con una reducción en la elongación de la raíz en plántulas *35S::DKM* (**Figura 16A-B**). Estos datos junto a la reducción del tamaño del meristemo vegetativo (**Figura 22A-B**) y la expresión alterada de *STM::GUS* en plántulas *35S::DKM* (**Figura 22C-D**) y el agotamiento del meristemo vegetativo en plántulas *35S::DKM:SRDX* (**Figura 21A-B**) soportan la teoría de que *DKM* juega un papel en la modulación de la actividad meristemática en meristemas indeterminados. Otro resultado que soporta esta teoría es el resultado del análisis de microarreglos, donde se detectaron varios genes expresados diferencialmente que han sido reportados que afectan el desarrollo del meristemo. Por citar algunos ejemplos podemos hablar de *BEL1*, *PAUSED (PSD)*, *POLTERGEIST (POL)*, *CORYNE (CRN)*, *CLAVATA-LIKE (CLE19)*, *APETALA2 (AP2)* y *HANABA TARANU (HAN)*. Resultó interesante que dichos genes aparecen como reprimidos en plantas *35S::DKM*, las cuales tienen una reducción importante en el tamaño del meristemo. Plantas con pérdida de función del gen *BEL1* resultan en terminación del meristemo de inflorescencia y con alteraciones en el desarrollo de óvulos; *BEL1* afecta la señalización de auxinas y citocininas y reprime a *WUS* (Modrusan *et al.*, 1994; Reiser *et al.*, 1995; Brambilla *et al.*, 2007; Bencivenga *et al.*, 2012). Por otro lado, existen cuatro genes involucrados en la ruta de señalización de *CLAVATA (CLV)*, la cual controla negativamente la expresión de *WUS*. *CLE19* es un gen *CLV3-like* y su expresión constitutiva causa el agotamiento del meristemo radicular y la formación de flores con una estructura pistiloide tipo pin, la cual carece de un ovario (Fiers *et al.*, 2004; Fiers *et al.*, 2005). La señal de células madre *CLV3* es recibida por el complejo receptor *CLV2-CORYNE (CRN)*, mutantes *crn* tienen alteraciones en el tamaño del SAM debido a defectos en la proliferación celular (Muller *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010; Bleckmann *et al.*, 2010). La señalización a través de *CLV3* también afecta la proliferación celular en el CMM del gineceo (Durbak and Tax, 2011). Otro gen que resulto reprimido es *APETALA2 (AP2)*, el cual es conocido por su rol en el desarrollo floral pero que también afecta el tamaño del meristemo, mutantes *ap2* tienen una reducción en el tamaño del SAM

debido a que la ruta de señalización por *CLAVATA* es afectada (Würschum *et al.*, 2006; Prunet *et al.*, 2015). Un gen que resultó de interés fue *HANABA TARANU (HAN)*, que es considerado un “boundary-gene” o gen de frontera y que se ha propuesto que participa en la comunicación entre el SAM y el primordio de órganos (Zhao *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2015). Plantas mutantes *han* muestran también reducción en el SAM y dicha mutación potencia el fenotipo de mutantes *clv*. Es interesante que HAN interactúa físicamente con JAG y también es capaz de inducirlo mediante la unión directa a su promotor (Ding *et al.*, 2015). JAG también se une al promotor de HAN (Schiessl *et al.*, 2014). Es conveniente resaltar que tres “boundary-genes” que codifican para proteínas de la familia LATERAL ORGAN BOUNDARY DOMAIN (LOB), están reprimidos en plantas *35S::DKM*. Se ha reportado que los genes *LBD* tienen una función en el crecimiento de plantas mediante la acumulación de brasinoesteroides, afectando el tamaño del SAM y la progresión del ciclo celular (Feng *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013).

Proponemos que *DKM* regule directamente al menos algunos de los genes que aquí se han resaltado o, que se detectan bajos niveles de expresión de los mismos como consecuencia del fenotipo de reducción del SAM en las plantas *35S::DKM*. Por otro lado, encontramos que *DKM* es capaz de interactuar físicamente en levadura e in planta con varios reguladores del desarrollo del meristemo, que bien podría ser otro mecanismo por el cual *DKM* afecta dicho proceso.

La mayoría de las interacciones proteína-proteína se encontraron en el núcleo, excepto una, la interacción de *DKM* con *WUS*, la cual se localizó solo en el citoplasma. Respecto a esto, podemos sugerir que otra forma en la cual *DKM* afecta negativamente el crecimiento de *Arabidopsis* es mediante el secuestro de *WUS* fuera del núcleo, para así, bloquear su actividad en el meristemo.

En resumen los resultados soportan la función de *DKM* como un nuevo regulador del desarrollo del meristemo, que por cierto, no se restringe a meristemas reproductivos, también afecta el meristemo vegetativo (**Figura 22A-B**) y el meristemo radicular (**Figura 23, Figura 24 y Figura 25**). Es posible proponer que *DKM* está involucrado en complejas redes regulatorias que tienen un efecto en la regulación transcripcional, la progresión del ciclo celular y la señalización de brasinoesteroides, sin embargo, se requiere hacer estudios

detallados para entender en detalle la función molecular que tiene *DKM* en el desarrollo de *Arabidopsis*.

9. CONCLUSIONES

- 9.1** A pesar de que *DKM* contribuye al fenotipo de la mutante *pit1-D*, no es suficiente para recapitular completamente el fenotipo.

- 9.2** Se comprobó la expresión del gen *DKM* en tejidos meristemáticos (meristemo inflorescencia, meristemos florales y CMM del carpelo) así como el efecto negativo que tiene en el desarrollo de *Arabidopsis* el aumento del nivel del transcrito.

- 9.3** La sobreexpresión de *DKM* impacta diferentes pasos en el proceso de fecundación como son la producción de polen en las anteras, la germinación de los granos de polen en el tejido estigmático, el paso de los tubos polínicos a través del tracto de transmisión y la composición de los óvulos.

- 9.4** Resultados de microarreglos y los ensayos de tinción con DAPI, soportan la hipótesis de que *DKM* puede tener una función en el control de las transiciones de las etapas del ciclo celular.

- 9.5** Ensayo de inducción de la sobreexpresión de *DKM* mostraron que la expresión de *JAG* y *OFPI* se induce después de 4 y 8 horas de la misma, lo cual podría sugerir a ambos genes como blancos ya sea directos o indirectos de *DKM*.

9.6 Ensayos de interacciones proteína-proteína muestran que *DKM* podría estar formando heterodímeros con proteínas que se han reportado que regulan el mantenimiento del meristemo y la correcta formación del gineceo.

10. PERSPECTIVAS

10.1 Realizar un ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) para la búsqueda de blancos directos de *DKM* utilizando como candidatos, genes previamente seleccionados con base en los resultados del experimento de microarreglos (*JAG*, *OFPI*, *CLE19*, *HAN*, *AP2*, *BAS1*, *DPA*, *CUL4*, *APC4*, *TOR1*, *BAS1*), lo cual ayudaría a trazar una línea directa al mecanismo de acción de *DKM*.

10.2 Realizar un ensayo de un híbrido en levadura (Y1H) para la búsqueda de reguladores directos de *DKM*.

10.3 Hacer cruza con líneas marcadoras de identidad celular en el óvulo, con la finalidad de explicar cuáles son las células que degeneran en óvulos *35S::DKM*.

10.4 Analizar el patrón de expresión del gen *WUSCHEL* en el fondo *35S::DKM* para describir a que nivel es al que *DKM* afecta la regulación de la actividad meristemática.

10.5 Hacer un análisis detallado del efecto que tiene la sobreexpresión de *DKM* en el desarrollo embrionario y en gametofito masculino.

11. BIBLIOGRAFIA

- Adamski, N.M., Anastasiou, E., Eriksson, S., O'Neill, C.M. and Lenhard, M.** (2009) Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20115-20120.
- Aida, M. and Tasaka, M.** (2006) Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex. *Plant Mol Biol*, **60**, 915-928.
- Alexander, M.P.** (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain technology*, **44**, 117-122.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J.J., Ochando, I., Vera, A., Ferrandiz, C. and Martinez-Laborda, A.** (2007) Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the *Arabidopsis* ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Development*, **134**, 2663-2671.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benitez, M., Corvera-Poire, A., Chaos Cador, A., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., Garcia-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Perez-Ruiz, R.V., Pineyro-Nelson, A. and Sanchez-Corrales, Y.E.** (2010) Flower development. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, **8**, e0127.
- Alvarez, J.P., Goldshmidt, A., Efroni, I., Bowman, J.L. and Eshed, Y.** (2009) The NGATHA distal organ development genes are essential for style specification in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, **21**, 1373-1393.
- Ambrose, B.A., Lerner, D.R., Ciceri, P., Padilla, C.M., Yanofsky, M.F. and Schmidt, R.J.** (2000) Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Molecular cell*, **5**, 569-579.
- Anastasiou, E., Kenz, S., Gerstung, M., MacLean, D., Timmer, J., Fleck, C. and Lenhard, M.** (2007) Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Developmental cell*, **13**, 843-856.
- Anastasiou, E. and Lenhard, M.** (2007) Growing up to one's standard. *Current opinion in plant biology*, **10**, 63-69.
- Anderson, L.E.** (1954) Hoyer's Solution as a Rapid Permanent Mounting Medium for Bryophytes. *The Bryologist*, **57**, 242-244.
- Azhakanandam, S., Nole-Wilson, S., Bao, F. and Franks, R.G.** (2008) SEUSS and AINTEGUMENTA mediate patterning and ovule initiation during gynoecium medial domain development. *Plant physiology*, **146**, 1165-1181.

- Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M. and Ferrandiz, C.** (2006) Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *Journal of experimental botany*, **57**, 3457-3469.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T. and Schmulling, T.** (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*, **23**, 69-80.
- Bell, E.M., Lin, W.C., Husbands, A.Y., Yu, L., Jaganatha, V., Jablonska, B., Mangeon, A., Neff, M.M., Girke, T. and Springer, P.S.** (2012) Arabidopsis lateral organ boundaries negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 21146-21151.
- Bencivenga, S., Simonini, S., Benkova, E. and Colombo, L.** (2012) The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in Arabidopsis. *The Plant cell*, **24**, 2886-2897.
- Bhatt, A.M., EtcHELLS, J.P., Canales, C., Lagodienko, A. and Dickinson, H.** (2004) VAAMANA--a BEL1-like homeodomain protein, interacts with KNOX proteins BP and STM and regulates inflorescence stem growth in Arabidopsis. *Gene*, **328**, 103-111.
- Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A. and Simon, R.** (2010) Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant physiology*, **152**, 166-176.
- Blilou, I., Frugier, F., Folmer, S., Serralbo, O., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., Eloy, N.B., Ferreira, P.C.G., Weisbeek, P., and Scheres, B.** (2002) The Arabidopsis HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes and Dev.* **16**, 2566-2575.
- Boniotti, M.B. and Gutierrez, C.** (2001) A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **28**, 341-350.
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G.T., Magyar, Z., Torres Acosta, J.A., Maes, S., Van Der Schueren, E., Inze, D. and De Veylder, L.** (2004) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *The Plant cell*, **16**, 2683-2692.
- Bowman, J.L., Baum, S.F., Eshed, Y., Putterill, J. and Alvarez, J.** (1999) Molecular genetics of gynoecium development in Arabidopsis. *Current topics in developmental biology*, **45**, 155-205.
- Bowman, J.L. and Smyth, D.R.** (1999) CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development*, **126**, 2387-2396.
- Brambilla, V., Battaglia, R., Colombo, M., Masiero, S., Bencivenga, S., Kater, M.M. and Colombo, L.** (2007) Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in Arabidopsis. *The Plant cell*, **19**, 2544-2556.
- Breuil-Broyer, S., Morel, P., de Almeida-Engler, J., Coustham, V., Negrutiu, I. and Trehin, C.** (2004) High-resolution boundary analysis during Arabidopsis thaliana flower development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **38**, 182-192.

- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R.A.** (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature*, **408**, 967-971.
- Carles, C.C. and Fletcher, J.C.** (2003) Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci*, **8**, 394-401.
- Carroll, L.** (1865) Alice's Adventures in Wonderland. MacMillan Publishers.
- Castellano, M.M., del Pozo, J.C., Ramirez-Parra, E., Brown, S. and Gutierrez, C.** (2001) Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreplication. *The Plant cell*, **13**, 2671-2686.
- Castellano Mdel, M., Boniotti, M.B., Caro, E., Schnittger, A. and Gutierrez, C.** (2004) DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *The Plant cell*, **16**, 2380-2393.
- Castrillo, G., Turck, F., Leveugle, M., Lecharny, A., Carbonero, P., Coupland, G., Paz-Ares, J. and Onate-Sanchez, L.** (2011) Speeding cis-trans regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of Arabidopsis transcription factors. *PLoS one*, **6**, e21524.
- Cheadle, C., Vawter, M.P., Freed, W.J. and Becker, K.G.** (2003) Analysis of microarray data using Z score transformation. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, **5**, 73-81.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangel, J.L., Wang, X. and Zhu, T.** (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant cell*, **14**, 559-574.
- Cheon, J., Park, S.Y., Schulz, B. and Choe, S.** (2010) Arabidopsis brassinosteroid biosynthetic mutant dwarf7-1 exhibits slower rates of cell division and shoot induction. *BMC plant biology*, **10**, 270.
- Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z. and Meyerowitz, E.M.** (1996) The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development*, **122**, 1567-1575.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **16**, 735-743.
- Clouse, S.D.** (2011) Brassinosteroids. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, **9**, e0151.
- Cluis, C.P., Mouchel, C.F. and Hardtke, C.S.** (2004) The Arabidopsis transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **38**, 332-347.
- Correa, L.G., Riano-Pachon, D.M., Schrago, C.G., dos Santos, R.V., Mueller-Roeber, B. and Vincentz, M.** (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS one*, **3**, e2944.

- Cruz-Ramirez, A., Diaz-Trivino, S., Wachsman, G., Du, Y., Arteaga-Vazquez, M., Zhang, H., Benjamins, R., Blilou, I., Neef, A.B., Chandler, V. and Scheres, B.** (2013) A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the Arabidopsis root stem cell organizer. *PLoS biology*, **11**, e1001724.
- Czesnick, H. and Lenhard, M.** (2015) Size control in plants--lessons from leaves and flowers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **7**, a019190.
- Das, P., Ito, T., Wellmer, F., Vernoux, T., Dedieu, A., Traas, J. and Meyerowitz, E.M.** (2009) Floral stem cell termination involves the direct regulation of AGAMOUS by PERIANTHIA. *Development*, **136**, 1605-1611.
- de Jager, S.M., Menges, M., Bauer, U.M. and Murra, J.A.** (2001) Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol Biol*, **47**, 555-568.
- de Folter, S. and Immink, R.G.H.** (2011) Yeast Protein-Protein Interaction Assays and Screens. *Plant Transcription Factors: Methods and Protocols*, **754**, 145-165.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beeemster, G.T., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacquard, A., Engler, G. and Inze, D.** (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *The EMBO journal*, **21**, 1360-1368.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beeemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. and Inze, D.** (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *The Plant cell*, **13**, 1653-1668.
- De Veylder, L., Beeckman, T. and Inze, D.** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 655-665.
- del Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E. and Gutierrez, C.** (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia plantarum*, **123**, 173-183.
- del Pozo, J.C. and Estelle, M.** (1999) The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 15342-15347.
- Diaz-Trivino, S., del Mar Castellano, M., de la Paz Sanchez, M., Ramirez-Parra, E., Desvoves, B. and Gutierrez, C.** (2005) The genes encoding Arabidopsis ORC subunits are E2F targets and the two ORC1 genes are differently expressed in proliferating and endoreplicating cells. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5404-5414.
- Ding, L., Yan, S.S., Jiang, L., Zhao, W.S., Ning, K., Zhao, J.Y., Liu, X.F., Zhang, J., Wang, Q. and Zhang, X.L.** (2015) HANABA TARANU (HAN) Bridges Meristem and Organ Primordia Boundaries through PINHEAD, JAGGED, BLADE-ON-PETIOLE2 and CYTOKININ OXIDASE 3 during Flower Development in Arabidopsis. *PLoS genetics*, **11**.
- Dinneny, J.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Yanofsky, M.F. and Weigel, D.** (2004) The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development*, **131**, 1101-1110.
- Durbak, A.R. and Tax, F.E.** (2011) CLAVATA signaling pathway receptors of Arabidopsis regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems. *Genetics*, **189**, 177-194.

- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z. and Laux, T.** (1996) The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **10**, 967-979.
- Egelkrou, E.M., Mariconti, L., Settlage, S.B., Cella, R., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L.** (2002) Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *The Plant cell*, **14**, 3225-3236.
- Feng, Z., Zhu, J., Du, X. and Cui, X.** (2012) Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in Arabidopsis thaliana. *Planta*, **236**, 1227-1237.
- Fiers, M., Golemic, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W. and Liu, C.M.** (2005) The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in Arabidopsis through a CLAVATA2-dependent pathway. *The Plant cell*, **17**, 2542-2553.
- Fiers, M., Hause, G., Boutilier, K., Casamitjana-Martinez, E., Weijers, D., Offringa, R., van der Geest, L., van Lookeren Campagne, M. and Liu, C.M.** (2004) Mis-expression of the CLV3/ESR-like gene CLE19 in Arabidopsis leads to a consumption of root meristem. *Gene*, **327**, 37-49.
- Freeling, M. and Hake, S.** (1985) Developmental genetics of mutants that specify knotted leaves in maize. *Genetics*, **111**, 617-634.
- Gaillochet, C., Daum, G. and Lohmann, J.U.** (2015) O Cell, Where Art Thou? The mechanisms of shoot meristem patterning. *Current opinion in plant Biology*, **23**, 91-97.
- Gaillochet, C. and Lohmann, J.U.** (2015) The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development*, **142**, 2237-2249.
- Gallois, J.L., Woodward, C., Reddy, G.V. and Sablowski, R.** (2002) Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. *Development*, **129**, 3207-3217.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C.** (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*, **12**, 543-548.
- Gendron, J.M., Liu, J.S., Fan, M., Bai, M.Y., Wenkel, S., Springer, P.S., Barton, M.K. and Wang, Z.Y.** (2012) Brassinosteroids regulate organ boundary formation in the shoot apical meristem of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 21152-21157.
- Gonzalez-Garcia, M.P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-Garcia, S., Russinova, E. and Cano-Delgado, A.I.** (2011) Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development*, **138**, 849-859.
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H. and Estelle, M.** (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. *Genes & development*, **13**, 1678-1691.
- Gremski, K., Ditta, G. and Yanofsky, M.F.** (2007) The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. *Development*, **134**, 3593-3601.

- Gutierrez, C.** (2009) The Arabidopsis cell division cycle. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, **7**, e0120.
- Gutierrez, C.,** (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. *Nature cell Biol.*, **7**, 535-541.
- Hacham, Y., Holland, N., Butterfield, C., Ubeda-Tomas, S., Bennett, M.J., Chory, J. and Savaldi-Goldstein, S.** (2011) Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development*, **138**, 839-848.
- Hackbusch, J., Richter, K., Muller, J., Salamini, F. and Uhrig, J.F.** (2005) A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 4908-4912.
- Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z. and Koncz, C.** (2012) CDKF;1 and CDKD protein kinases regulate phosphorylation of serine residues in the C-terminal domain of Arabidopsis RNA polymerase II. *The Plant cell*, **24**, 1626-1642.
- Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T. and Ohme-Takagi, M.** (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **34**, 733-739.
- Huntley, R.P. and Murray, J.A.** (1999) The plant cell cycle. *Current opinion in plant biology*, **2**, 440-446.
- Imai, K.K., Ohashi, Y., Tsuge, T., Yoshizumi, T., Matsui, M., Oka, A. and Aoyama, T.** (2006) The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in Arabidopsis endoreduplication. *The Plant cell*, **18**, 382-396.
- Inze, D. and De Veylder, L.** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annual review of genetics*, **40**, 77-105.
- Irish, V.F.** (2010) The flowering of Arabidopsis flower development. *Plant J*, **61**, 1014-1028.
- Ivanov, V.B. and Dubrovsky, J.G.** (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.*, **18**, 1360-1385.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F.** (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.*, **7**, 106-111.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, **6**, 3901-3907.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193-195.
- Lee, Y.R., Li, Y. and Liu, B.** (2007) Two Arabidopsis phragmoplast-associated kinesins play a critical role in cytokinesis during male gametogenesis. *The Plant cell*, **19**, 2595-2605.
- Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T.** (2002) The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development*, **129**, 3195-3206.

- Li, N., Yuan, L., Liu, N., Shi, D., Li, X., Tang, Z., Liu, J., Sundaresan, V. and Yang, W.C.** (2009) SLOW WALKER2, a NOC1/MAK21 homologue, is essential for coordinated cell cycle progression during female gametophyte development in Arabidopsis. *Plant physiology*, **151**, 1486-1497.
- Liang, D., Wu, C., Li, C., Xu, C., Zhang, J., Kilian, A., Li, X., Zhang, Q. and Xiong, L.** (2006) Establishment of a patterned GAL4-VP16 transactivation system for discovering gene function in rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **46**, 1059-1072.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. and Hake, S.** (1994) A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *The Plant cell*, **6**, 1859-1876.
- Liu, Y. and Douglas, C.J.** (2015) A role for OVATE FAMILY PROTEIN1 (OFF1) and OFF4 in a BLH6-KNAT7 multi-protein complex regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis thaliana. *Plant signaling & behavior*, **10**, e1033126.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. and Barton, M.K.** (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature*, **379**, 66-69.
- Lozano-Sotomayor, P.** (2010) Caracterización fenotípica de *pistilito* (*pit1-D*): mutante afectada en desarrollo. Master thesis. LANGEBIO-CINVESTAV-IPN Irapuato, Guanajuato.
- Maere, S., Heymans, K. and Kuiper, M.** (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, **21**, 3448-3449.
- Maier, A.T., Stehling-Sun, S., Wollmann, H., Demar, M., Hong, R.L., Haubeiss, S., Weigel, D. and Lohmann, J.U.** (2009) Dual roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression. *Development*, **136**, 1613-1620.
- Marsch-Martinez, N., Greco, R., Van Arkel, G., Herrera-Estrella, L. and Pereira, A.** (2002) Activation tagging using the En-I maize transposon system in Arabidopsis. *Plant physiology*, **129**, 1544-1556.
- Marsch-Martinez, N., Zuniga-Mayo, V.M., Herrera-Ubaldo, H., Ouwerkerk, P.B., Pablo-Villa, J., Lozano-Sotomayor, P., Greco, R., Ballester, P., Balanza, V., Kuijt, S.J., Meijer, A.H., Pereira, A., Ferrandiz, C. and de Folter, S.** (2014) The NTT transcription factor promotes replum development in Arabidopsis fruits. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **80**, 69-81.
- McLean, J.R., Chaix, D., Ohi, M.D. and Gould, K.L.** (2011) State of the APC/C: organization, function, and structure. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **46**, 118-136.
- Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W. and Murray, J.A.** (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **41**, 546-566.
- Mizutani, M. and Ohta, D.** (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual review of plant biology*, **61**, 291-315.
- Modrusan, Z., Reiser, L., Feldmann, K.A., Fischer, R.L. and Haughn, G.W.** (1994) Homeotic Transformation of Ovules into Carpel-like Structures in Arabidopsis. *The Plant cell*, **6**, 333-349.

- Muller, R., Bleckmann, A. and Simon, R.** (2008) The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *The Plant cell*, **20**, 934-946.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A. and Sekine, M.** (2006) Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS letters*, **580**, 336-340.
- Neff, M.M., Nguyen, S.M., Malancharuvil, E.J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. and Chory, J.** (1999) BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 15316-15323.
- Ni, W., Xie, D., Hobbie, L., Feng, B., Zhao, D., Akkara, J. and Ma, H.** (2004) Regulation of flower development in Arabidopsis by SCF complexes. *Plant physiology*, **134**, 1574-1585.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C. and Murray, J.A.** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **357**, 749-760.
- Ohno, C.K., Reddy, G.V., Heisler, M.G. and Meyerowitz, E.M.** (2004) The Arabidopsis JAGGED gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development*, **131**, 1111-1122.
- Otegui, M. and Staehelin, L.A.** (2000) Cytokinesis in flowering plants: more than one way to divide a cell. *Current opinion in plant biology*, **3**, 493-502.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.F., Ye, D. and Sundaresan, V.** (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. *Development*, **132**, 603-614.
- Paz-Ares, J.** (2002) REGIA, an EU project on functional genomics of transcription factors from Arabidopsis Thaliana. *Comparative and functional genomics*, **3**, 102-108.
- Perales, M. and Reddy, G.V.** (2012) Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Current opinion in plant biology*, **15**, 10-16.
- Pesin, J.A. and Orr-Weaver, T.L.** (2008) Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annual review of cell and developmental biology*, **24**, 475-499.
- Pettko-Szandtner, A., Meszaros, T., Horvath, G.V., Bako, L., Csordas-Toth, E., Blastyak, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P. and Dudits, D.** (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **46**, 111-123.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R.P., Casteels, P., Van Montagu, M., Inze, D. and Mironov, V.** (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 36354-36360.
- Prunet, N., Morel, P., Champelovier, P., Thierry, A.M., Negrutiu, I., Jack, T. and Trehin, C.** (2015) SQUINT promotes stem cell homeostasis and floral meristem termination in Arabidopsis through APETALA2 and CLAVATA signalling. *Journal of experimental botany*.

- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., Savouré, A., Sorrel, D.A., Sundaresan, V. and Murray, J.A.** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1003-1018.
- Reddy, G.V., Heisler, M.G., Ehrhardt, D.W. and Meyerowitz, E.M.** (2004) Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **131**, 4225-4237.
- Reiser, L., Modrusan, Z., Margossian, L., Samach, A., Ohad, N., Haughn, G.W. and Fischer, R.L.** (1995) The BELL1 gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium. *Cell*, **83**, 735-742.
- Reyes-Olalde, J.I., Zuniga-Mayo, V.M., Chavez Montes, R.A., Marsch-Martinez, N. and de Folter, S.** (2013) Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends Plant Sci*, **18**, 644-655.
- Roeder, A.H., Ferrandiz, C. and Yanofsky, M.F.** (2003) The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. *Current biology : CB*, **13**, 1630-1635.
- Roeder, A.H. and Yanofsky, M.F.** (2006) Fruit development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, **4**, e0075.
- Roodbarkelari, F., Bramsiepe, J., Weinl, C., Marquardt, S., Novak, B., Jakoby, M.J., Lechner, E., Genschik, P. and Schnittger, A.** (2010) Cullin 4-ring finger-ligase plays a key role in the control of endoreplication cycles in *Arabidopsis* trichomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 15275-15280.
- Running, M.P. and Meyerowitz, E.M.** (1996) Mutations in the PERIANTHIA gene of *Arabidopsis* specifically alter floral organ number and initiation pattern. *Development*, **122**, 1261-1269.
- Sablowski, R. and Carnier Dornelas, M.** (2014) Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of experimental botany*, **65**, 2703-2714.
- Schiessl, K., Kausika, S., Southam, P., Bush, M. and Sablowski, R.** (2012) JAGGED controls growth anisotropy and coordination between cell size and cell cycle during plant organogenesis. *Current biology : CB*, **22**, 1739-1746.
- Schiessl, K., Muino, J.M. and Sablowski, R.** (2014) *Arabidopsis* JAGGED links floral organ patterning to tissue growth by repressing Kip-related cell cycle inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 2830-2835.
- Schuster, C., Gailloch, C., Medzihradszky, A., Busch, W., Daum, G., Krebs, M., Kehle, A. and Lohmann, J.U.** (2014) A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Developmental cell*, **28**, 438-449.
- Scofield, S., Dewitte, W. and Murray, J.A.** (2007) The KNOX gene SHOOT MERISTEMLESS is required for the development of reproductive meristematic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **50**, 767-781.

- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. and Ideker, T.** (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, **13**, 2498-2504.
- Sieberer, T., Hauser, M.T., Seifert, G.J. and Luschnig, C.** (2003) PROPORZ1, a putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Current biology : CB*, **13**, 837-842.
- Smith, H.M. and Hake, S.** (2003) The interaction of two homeobox genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, regulates internode patterning in the Arabidopsis inflorescence. *The Plant cell*, **15**, 1717-1727.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M.** (1990) Early flower development in Arabidopsis. *The Plant cell*, **2**, 755-767.
- Sotelo-Silveira, M., Cucinotta, M., Chauvin, A.L., Chavez Montes, R.A., Colombo, L., Marsch-Martinez, N. and de Folter, S.** (2013) Cytochrome P450 CYP78A9 is involved in Arabidopsis reproductive development. *Plant physiology*, **162**, 779-799.
- Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R. and Bergounioux, C.** (2002) Two E2F sites in the Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 32978-32
- Sun, X., Feng, Z., Meng, L., Zhu, J. and Geitmann, A.** (2013) Arabidopsis ASL11/LBD15 is involved in shoot apical meristem development and regulates WUS expression. *Planta*, **237**, 1367-1378.
- Trigueros, M., Navarrete-Gomez, M., Sato, S., Christensen, S.K., Pelaz, S., Weigel, D., Yanofsky, M.F. and Ferrandiz, C.** (2009) The NGATHA genes direct style development in the Arabidopsis gynoecium. *The Plant cell*, **21**, 1394-1409.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. and Scheres, B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, **390**, 287-289.
- van der Graaff, E., Dulk-Ras, A.D., Hooykaas, P.J. and Keller, B.** (2000) Activation tagging of the LEAFY PETIOLE gene affects leaf petiole development in Arabidopsis thaliana. *Development*, **127**, 4971-4980.
- van Leuken, R., Clijsters, L. and Wolthuis, R.** (2008) To cell cycle, swing the APC/C. *Biochimica et biophysica acta*, **1786**, 49-59.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S. and Inze, D.** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *The Plant cell*, **14**, 903-916.
- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M. and Hoekema, A.** (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2362.
- Vieira, P., De Clercq, A., Stals, H., Van Leene, J., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., Eeckhout, D., Persiau, G., Van Damme, D., Verkest, A., Antonino de Souza, J.D., Junior, Glab, N., Abad, P., Engler, G., Inze, D., De Veylder, L., De Jaeger, G. and Engler, J.D.** (2014) The Cyclin-

Dependent Kinase Inhibitor KRP6 Induces Mitosis and Impairs Cytokinesis in Giant Cells Induced by Plant-Parasitic Nematodes in Arabidopsis. *The Plant cell*, **26**, 2633-2647.

- Vlieghe, K., Vuylsteke, M., Florquin, K., Rombauts, S., Maes, S., Ormenese, S., Van Hummelen, P., Van de Peer, Y., Inze, D. and De Veylder, L. (2003) Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. *Journal of cell science*, **116**, 4249-4259.
- Walden, R., Fritze, K., Hayashi, H., Miklashevichs, E., Harling, H. and Schell, J. (1994) Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant Mol Biol*, **26**, 1521-1528.
- Wang, C. and Liu, Z. (2006) Arabidopsis ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *The Plant cell*, **18**, 350-365.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., DePamphilis, C.W. and Ma, H. (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant physiology*, **135**, 1084-1099.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L. and Fowke, L.C. (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **15**, 501-510.
- Wang, J.W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E. and Weigel, D. (2008) Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*, **20**, 1231-1243.
- Wang, S., Chang, Y., Guo, J. and Chen, J.G. (2007) Arabidopsis Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **50**, 858-872.
- Wang, S., Chang, Y., Guo, J., Zeng, Q., Ellis, B.E. and Chen, J.G. (2011) Arabidopsis ovate family proteins, a novel transcriptional repressor family, control multiple aspects of plant growth and development. *PLoS one*, **6**, e23896.
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z., Liu, J. and Qu, L.J. (2012) The Arabidopsis APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for both female gametogenesis and embryogenesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **69**, 227-240.
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blazquez, M.A., Borevitz, J.O., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E.J., Neff, M.M., Nguyen, J.T., Sato, S., Wang, Z.Y., Xia, Y., Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Yanofsky, M.F. and Chory, J. (2000) Activation tagging in Arabidopsis. *Plant physiology*, **122**, 1003-1013.
- Weltmeier, F., Rahmani, F., Ehlert, A., Dietrich, K., Schutze, K., Wang, X., Chaban, C., Hanson, J., Teige, M., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., Smeekens, S. and Droge-Laser, W. (2009) Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol*, **69**, 107-119.

- Wurschum, T., Gross-Hardt, R. and Laux, T.** (2006) APETALA2 regulates the stem cell niche in the Arabidopsis shoot meristem. *The Plant cell*, **18**, 295-307.
- Wynn, A.N., Rueschhoff, E.E. and Franks, R.G.** (2011) Transcriptomic characterization of a synergistic genetic interaction during carpel margin meristem development in Arabidopsis thaliana. *PloS one*, **6**, e26231.
- Wynn, A.N., Seaman, A.A., Jones, A.L. and Franks, R.G.** (2014) Novel functional roles for PERIANTHIA and SEUSS during floral organ identity specification, floral meristem termination, and gynoecial development. *Front Plant Sci*, **5**, 130.
- Xu, J., Hofhuis, H., Heidstra, R., Sauer, M., Friml, J. and Scheres, B.** (2006) A molecular framework for plant regeneration. *Science*, **311**, 385-388.
- Zhang, X., Zhou, Y., Ding, L., Wu, Z., Liu, R. and Meyerowitz, E.M.** (2013) Transcription repressor HANABA TARANU controls flower development by integrating the actions of multiple hormones, floral organ specification genes, and GATA3 family genes in Arabidopsis. *The Plant cell*, **25**, 83-101.
- Zhao, Y., Medrano, L., Ohashi, K., Fletcher, J.C., Yu, H., Sakai, H. and Meyerowitz, E.M.** (2004) HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis. *The Plant cell*, **16**, 2586-2600.
- Zhu, Y., Wang, Y., Li, R., Song, X., Wang, Q., Huang, S., Jin, J.B., Liu, C.M. and Lin, J.** (2010) Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **61**, 223-233.
- Zondlo, S.C. and Irish, V.F.** (1999) CYP78A5 encodes a cytochrome P450 that marks the shoot apical meristem boundary in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **19**, 259-268.
- Zuniga Mayo, V.M., Marsch Martinez, N. and de Folter, S.** (2012) JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in Arabidopsis. *Plant J.* **71**, 314–326.

12. ANEXOS

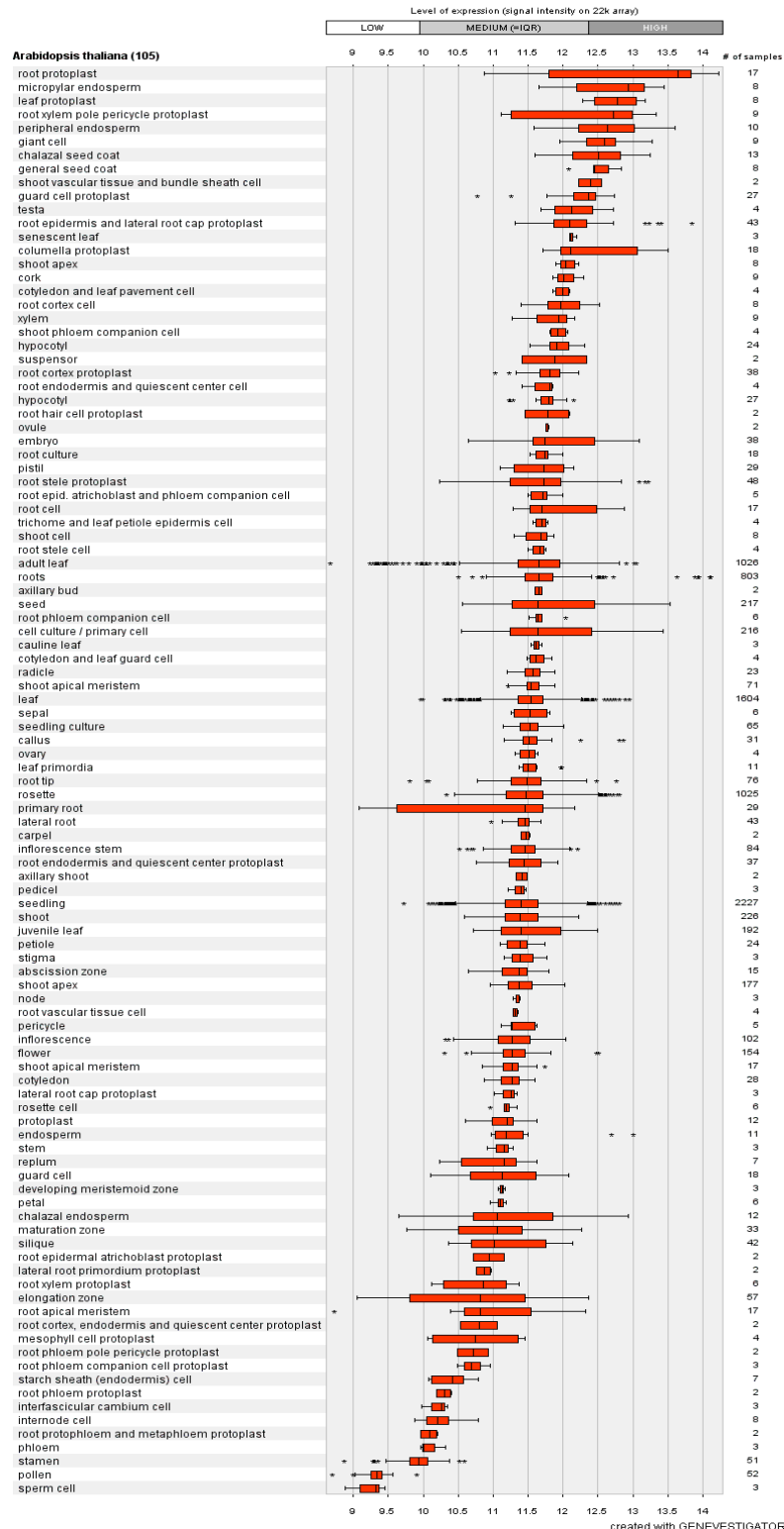
12.1 Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo

Nombre	Secuencia (5' to 3')	Propósito
<i>DKM_cDNA</i>	F - CACC ATG GGT GGT GGT GGT GAT AC R - CTA GTC GTT TGA AGT GTG CTT TG	Clonar la secuencia codificante de <i>DKM</i> en el plásmido pENTR-D para generar la construcción 35S:: <i>DKM</i>
<i>DKM_sqRT-PCR</i>	F - GAGTTCTTTGGAGAGATCGATC R - CAATCCTAAAGCGACTCAGC	RT-PCR semicuantitativo
<i>SAUR12_sqRT-PCR</i>	F - CACCATG GCG GTT AAG AGA TCT TC R - CCT CAT CCG ATC ATG GAT G	RT-PCR semicuantitativo y clonar la secuencia codificante del gen <i>SAUR12</i> en el plásmido pENTR-D para generar la construcción 35S:: <i>SAUR12</i> .
<i>OFP_sqRT-PCR</i>	F - GCTATCGGAGTTAATCCCT R - CGT GGA AGA CTT AGA GTC GAC	RT-PCR semicuantitativo
<i>JAG_sqRT-PCR</i>	F - CACC ATG AGG CAT GAG GAG AAT TAC TTA G R - TCA GAG CGA GTG ATG ATC TTG	RT-PCR semicuantitativo
<i>DKML_sqRT-PCR</i>	F - GGGGTTGACAAATCAGAACAATG R - GTT GCC ATG GTT CCA TTC TGG	Analizar nivel de transcrito <i>DKML</i> en la mutante <i>dkml</i>
<i>DKM_g</i>	F - ATTTTGCCGATTTTCGGAAC R - CTA GTC GTT TGA AGT GTG CTT TG	Genotipificar el alelo <i>DKM</i>
<i>DKML_g</i>	F - ATTTTGCCGATTTTCGGAAC R - GTT GCC ATG GTT CCA TTC TGG	Genotipificar el alelo <i>DKML</i>
<i>DKM_riboprobe</i>	F -GAGAAGAGCAGGTGGAGATATTG R - CCA TTA CAA TCT CAG CGA GTT TC	Sonda <i>DKM</i> para <i>in-situ</i>

12.2 Datos de expresión del gen *DKM* en la plataforma GENEVESTIGATOR

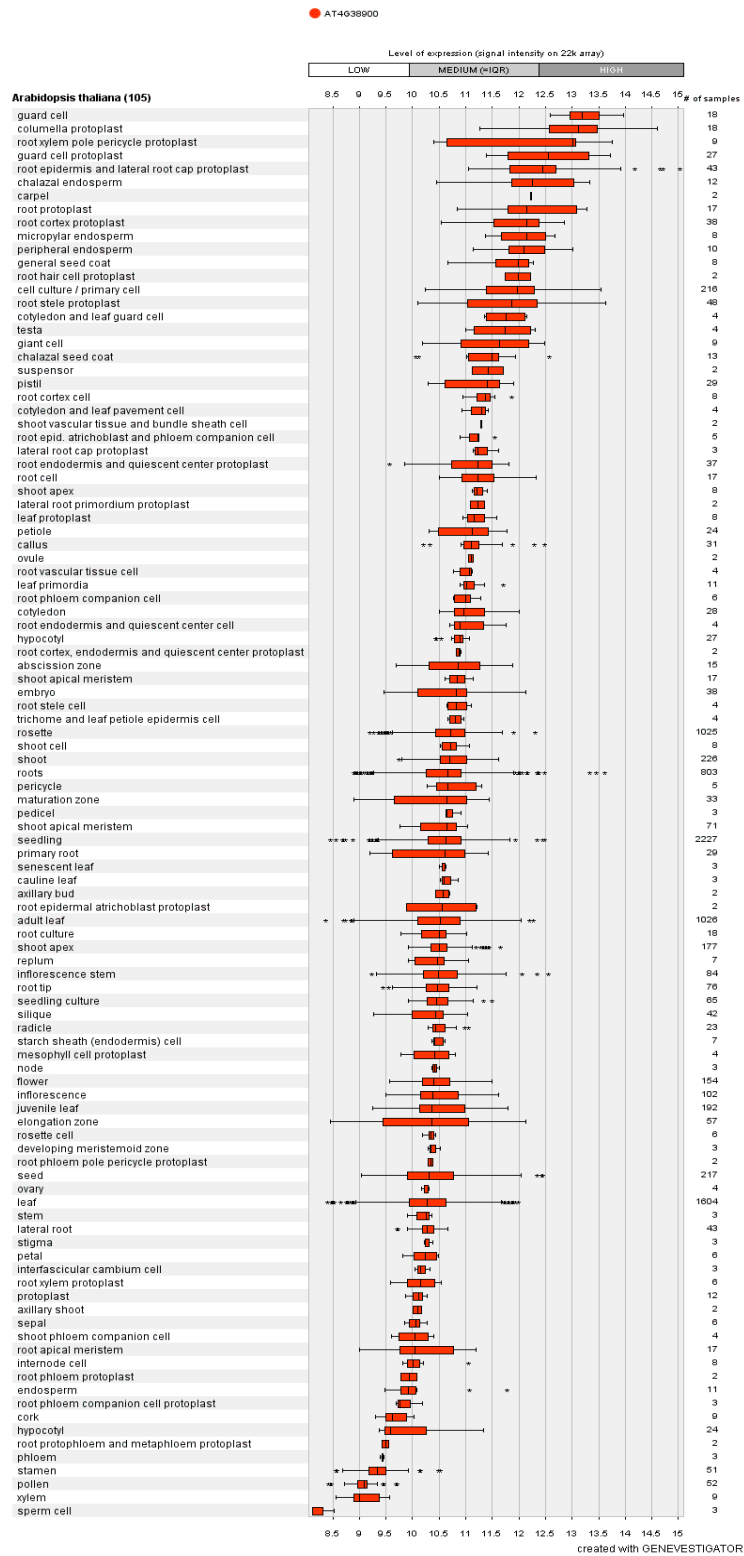
Dataset: 105 anatomical parts (sample selection: AT-SAMPLES-0)
 1 gene (gene selection: AT-GENES-0)

● AT2G21230

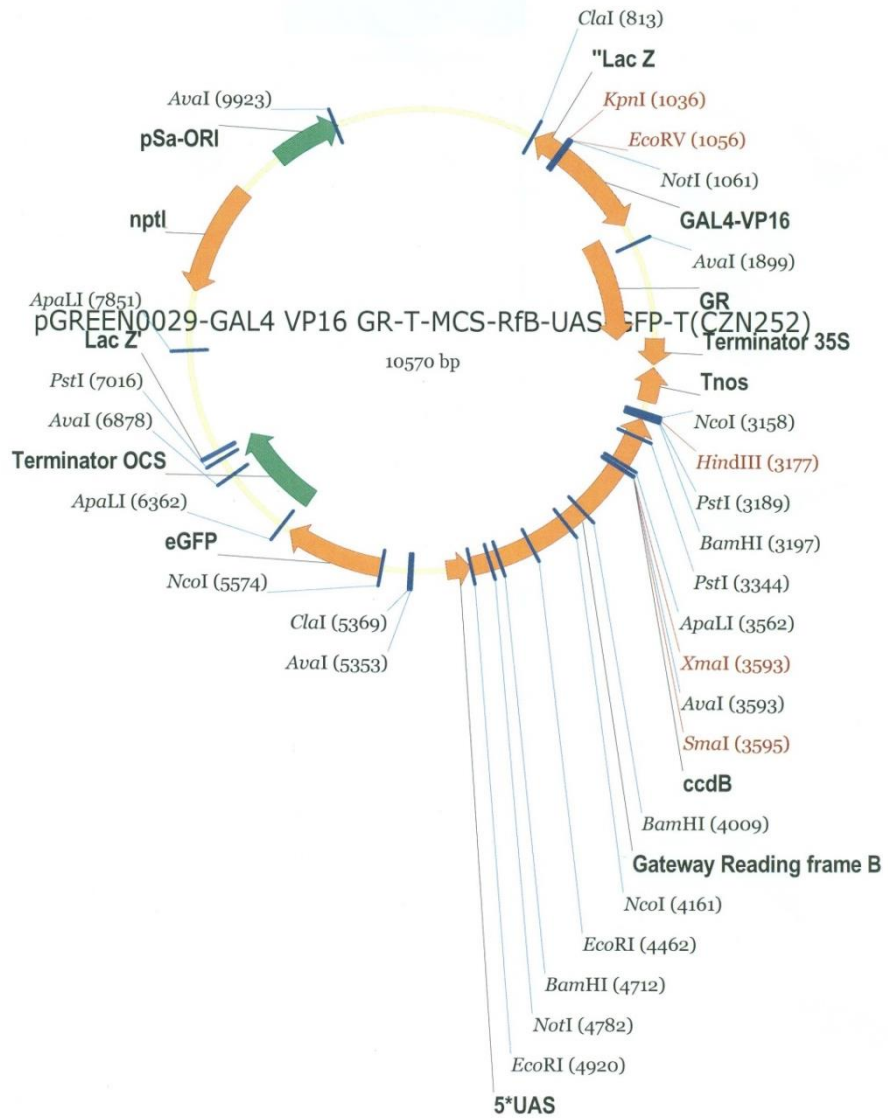


12.3 Datos de expresión del gen *DKML* en la plataforma GENEVESTIGATOR

Dataset: 105 anatomical parts (sample selection: AT-SAMPLES-4)
1 gene (gene selection: AT-GENES-4)



12.4 Mapa del plásmido CZN252



Anexo 12.5 Factores de transcripción sobreexpresados (z-score ≥ 2) y reprimidos (z-score ≤ -2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM

Sobreexpresados

Reprimidos

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT4G08455	AT4G08455	---	4.13
AT5G01840	OFP1	ATOFP1 // OFP1	4.10
AT5G38895	AT5G38895	---	3.55
AT3G30260	AGL79	AGL79	3.08
AT4G22070	WRKY31	ATWRKY31 // WRKY31	3.07
AT2G21230	AT2G21230	---	3.03
AT5G15060	AT5G15060	---	3.01
AT1G01780	PLIM2b	PLIM2b	2.90
AT3G15740	AT3G15740	---	2.75
AT4G03250	AT4G03250	---	2.67
AT2G21230	AT2G21230	---	2.64
AT1G76580	AT1G76580	---	2.55
AT5G17320	HDG9	HDG9	2.48
AT1G79700	WRI4	WRI4	2.44
AT1G68480	JAG	JAG	2.44
AT3G58720	AT3G58720	---	2.37
AT1G60880	AGL56	AGL56	2.34
AT1G06170	AT1G06170	---	2.32
AT1G05420	OFP12	ATOFP12 // OFP12	2.31
AT4G23860	AT4G23860	---	2.28
AT5G02470	DPA	DPA	2.27
AT1G57730	AT1G57730	---	2.27
AT5G25830	GATA12	GATA12	2.26
AT2G30410	KIS	TFCA // KIS	2.20
AT3G46950	AT3G46950	---	2.15
AT2G22750	AT2G22750	---	2.14
AT1G59890	SNL5	SNL5	2.13
AT3G58190	LBD29	ASL16 // LBD29	2.09
AT1G26610	AT1G26610	---	2.08
AT5G56860	GNC	GATA21 // GNC	2.07
AT5G50820	NAC097	NAC097 // anac097	2.07
AT5G65790	MYB68	MYB68 // ATMYB68	2.05
AT2G15660	AGL95	AGL95	2.03
AT5G39690	NAC093	ANAC093 // NAC093	2.02
AT3G53200	MYB27	MYB27 // AtMYB27	2.02
AT3G19080	AT3G19080	---	2.02
AT2G19260	AT2G19260	---	-2.003402312

AT5G40710	AT5G40710	---	-2.00671321
AT5G67480	BT4	BT4 // ATBT4	-2.013181617
AT1G22590	AGL87	AGL87	-2.0133924
AT4G27410	RD26	ANAC072 // RD26	-2.013714615
AT3G50870	HAN	HAN // MNP // GATA18	-2.026143631
AT2G40750	WRKY54	WRKY54 // ATWRKY54	-2.03816078
AT5G66700	HB53	HB-8 // ATHB53 // HB53	-2.03957843
AT3G16600	AT3G16600	---	-2.046775251
AT1G10585	AT1G10585	---	-2.076232674
AT1G19220	ARF19	IAA22 // ARF11 // ARF19	-2.076519523
AT5G29000	PHL1	PHL1	-2.086304752
AT1G49130	BBX17	BBX17	-2.086317366
AT1G33280	BRN1	BRN1 // ANAC015 // NAC015	-2.089530435
AT1G02580	MEA	MEA // FIS1 // SDG5 // EMB173	-2.091774484
AT5G64810	WRKY51	WRKY51 // ATWRKY51	-2.101735928
AT3G25730	EDF3	EDF3	-2.122501907
AT1G62830	LDL1	SWP1 // ATSWP1 // ATLSO1 // LDL1 // LSD1	-2.12648109
AT3G20770	EIN3	AtEIN3 // EIN3	-2.134641712
AT4G33565	AT4G33565	---	-2.139172651
AT1G58220	AT1G58220	---	-2.150605466
AT1G61970	AT1G61970	---	-2.153682243
AT1G68150	WRKY9	WRKY9 // ATWRKY9	-2.158056063
AT3G10470	AT3G10470	---	-2.160517503
AT1G72830	NF-YA3	ATHAP2C // NF-YA3 // HAP2C	-2.174855304
AT2G45680	TCP9	TCP9	-2.175820345
AT2G42350	AT2G42350	---	-2.185598806
AT3G54990	SMZ	SMZ	-2.215707049
AT2G47210	AT2G47210	---	-2.242999785
AT3G03760	LBD20	LBD20	-2.255702343
AT3G46080	AT3G46080	---	-2.263189785
AT5G47140	GATA27	GATA27	-2.269737803
AT1G16640	REM14	---	-2.277875794
AT1G74410	AT1G74410	---	-2.289130182
AT4G23550	WRKY29	WRKY29 // ATWRKY29	-2.302555452
AT1G53230	TCP3	TCP3	-2.335920265
AT4G19510	AT4G19510	---	-2.335996572
AT5G43650	BHLH92	BHLH92	-2.345810892
AT4G35610	AT4G35610	---	-2.357085399
AT3G61600	POB1	ATPOB1 // POB1 // LRB2	-2.440181498
AT1G76900	TLP1	AtTLP1 // TLP1	-2.448696545
AT1G68200	AT1G68200	---	-2.452933078
AT3G47870	LBD27	LBD27 // ASL29 // SCP	-2.475000351
AT1G61980	AT1G61980	---	-2.494394702

AT3G21890	BBX31	BBX31	-2.511856912
AT2G28550	TOE1	TOE1 // RAP2.7	-2.572685119
AT5G20420	CHR42	CHR42	-2.588861018
AT4G19660	NPR4	NPR4 // ATNPR4	-2.611960592
AT1G13600	bZIP58	AtbZIP58 // bZIP58	-2.639090452
AT5G60410	SIZ1	ATSIZ1 // SIZ1	-2.662715542
AT5G47790	AT5G47790	---	-2.66947699
AT4G25400	AT4G25400	---	-2.698651104
AT4G14860	OFP11	AtOFP11 // OFP11	-2.699831791
AT5G27650	AT5G27650	---	-2.701174654
AT5G58280	REM3	---	-2.811827926
AT5G13220	JAZ10	JAZ10 // JAS1 // TIFY9	-2.825915449
AT3G21330	AT3G21330	---	-2.852294371
AT2G19380	AT2G19380	---	-2.913612977
AT4G35700	DAZ3	DAZ3	-2.920392526
AT4G36920	AP2	AP2 // AtAP2 // FLO2 // FL1	-2.938036386
AT1G25280	TLP10	TLP10 // AtTLP10	-2.958577498
AT1G17590	NF-YA8	NF-YA8	-2.969246503
AT2G22800	HAT9	HAT9	-2.984203446
AT2G42430	LBD16	ASL18 // LBD16	-2.999973216
AT5G01200	AT5G01200	---	-3.000620541
AT1G04360	AT1G04360	---	-3.012673145
AT1G19210	AT1G19210	---	-3.073541884
AT2G47850	AT2G47850	---	-3.08630191
AT2G35000	ATL9	ATL9	-3.126156077
AT4G06746	RAP2.9	RAP2.9 // DEAR5	-3.139147998
AT5G67010	AT5G67010	---	-3.172973428
AT1G27730	STZ	STZ // ZAT10	-3.180405404
AT5G59450	AT5G59450	---	-3.241947833
AT1G70030	AT1G70030	---	-3.278523071
AT2G16485	NERD	NERD	-3.309620161
AT4G31650	REM39	---	-3.32919532
AT5G41410	BEL1	BEL1	-3.347368976
AT1G27320	HK3	HK3 // AHK3	-3.486943963
AT1G64530	AT1G64530	---	-3.492773658
AT1G52830	IAA6	SHY1 // IAA6	-3.568285056
AT3G55530	SDIR1	SDIR1 // AtSDIR1	-3.616570237
AT4G25490	CBF1	DREB1B // CBF1 // ATCBF1	-3.691890824
AT1G68670	AT1G68670	---	-3.989652313
AT4G19630	AT4G19630	---	-4.561170756

Anexo 12.6 Genes relacionados a hormonas que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ -2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM

Sobreexpresados

Reprimidos

ABA

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT3G14440	NCED3	ATNCED3 // STO1 // SIS7 // NCED3	2.21
AT4G27410	RD26	ANAC072 // RD26	-2.01
AT2G31470	DOR	DOR	-2.10
AT2G31660	SAD2	SAD2 // URM9 // EMA1	-2.18
AT5G05700	ATE1	ATATE1 // DLS1 // ATE1	-2.26
AT4G17870	PYR1	RCAR11 // PYR1	-2.26
AT2G47770	TSPO	TSPO // ATTSPO	-2.32
AT3G18490	ASPG1	ASPG1	-2.48
AT1G30100	NCED5	ATNCED5 // NCED5	-2.69
AT4G18350	NCED2	NCED2 // ATNCED2	-2.72
AT3G25655	IDL1	IDL1	-2.82
AT2G34900	IMB1	GTE1 // IMB1 // GTE01	-3.09
AT1G71960	ABCG25	ATABCG25 // ABCG25	-3.19
AT3G55530	SDIR1	SDIR1 // AtSDIR1	-3.62
AT4G25490	CBF1	DREB1B // CBF1 // ATCBF1	-3.69

AUXINAS

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT3G05630	PLDP2	PDLZ2 // PLDZETA2 // PLDP2	2.20
AT3G58190	LBD29	ASL16 // LBD29	2.09
AT2G21050	LAX2	LAX2	-2.02
AT5G66700	HB53	HB-8 // ATHB53 // HB53	-2.04
AT4G10100	CNX7	CNX7 // SIR5	-2.07
AT1G19220	ARF19	IAA22 // ARF11 // ARF19	-2.08
AT1G47510	5PTASE11	AT5PTASE11 // 5PTASE11	-2.45
AT5G20820	AT5G20820	---	-2.52
AT2G39550	PGGT-I	PGGT-I // ATGGT-IB // GGB	-2.90
AT1G23080	PIN7	ATPIN7 // PIN7	-2.97
AT2G42430	LBD16	ASL18 // LBD16	-3.00
AT4G00880	AT4G00880	---	-3.06
AT4G13770	CYP83A1	CYP83A1 // REF2	-3.49
AT1G52830	SHY1	SHY1 // IAA6	-3.57

BRASINOSTEROIDES

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
--------	---------	-------	---------

AT5G02800	CDL1	CDL1	3.64
AT4G02330	ATPMEPCRB	AtPME41 // PME41 // ATPMEPCRB	-2.03
AT3G46290	HERK1	HERK1	-2.26
AT4G08950	EXO	EXO	-2.36
AT2G26710	BAS1	BAS1 // CYP72B1 // CYP734A1	-4.33

CITOCININAS

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT5G66700	HB53	HB-8 // ATHB53 // HB53 ATCTL1 // ERH2 // HOT2 // ELP1 // ELP // CTL1 //	-2.04
AT1G05850	POM1	POM1	-2.38
AT2G19500	CKX2	ATCKX2 // CKX2	-3.32
AT1G27320	AHK3	HK3 // AHK3	-3.49

ETILENO

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT3G44880	ACD1	LLS1 // PAO // ACD1	2.63
AT1G19220	ARF19	IAA22 // ARF11 // ARF19	-2.08
AT2G26070	RTE1	AtRTE1 // RTE1	-2.11
AT3G25730	EDF3	EDF3	-2.12
AT3G20770	EIN3	AtEIN3 // EIN3	-2.13
AT4G36920	AP2	AP2 // AtAP2 // FLO2 // FL1	-2.94
AT5G67010	AT5G67010	---	-3.17

GIBERELINAS

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT4G24210	SLY1	SLY1	2.31
AT1G02400	GA2OX6	DTA1 // ATGA2OX4 // GA2OX6 // ATGA2OX6	-2.07
AT1G44090	GA20OX5	GA20OX5 // ATGA20OX5	-2.39

JASMONATO

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT1G28290	AGP31	AGP31	2.06
AT5G64810	WRKY51	WRKY51 // ATWRKY51	-2.10
AT5G13220	JAZ10	JAZ10 // JAS1 // TIFY9	-2.83
AT1G05800	DGL	DGL	-3.19
AT3G28740	CYP81D11	CYP81D11	-3.22

Anexo 12.7 Genes que codifican para proteínas de la familia P450 que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ -2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM

Sobreexpresados

Reprimidos

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT1G73340	AT1G73340	---	-2.34
AT3G20120	CYP705A21	CYP705A21	-2.24
AT3G26320	CYP71B36	CYP71B36	-2.87
AT3G44250	CYP71B38	CYP71B38	-3.42
AT4G13770	CYP83A1	CYP83A1 // REF2	-3.49
AT4G31970	CYP82C2	CYP82C2	-3.23
AT5G06905	CYP712A2	CYP712A2	-2.17

AT5G07990	TT7	CYP75B1 // TT7 // D501	2.14
AT4G37370	CYP81D8	CYP81D8	2.35
AT4G37340	CYP81D3	CYP81D3	2.41
AT3G28740	CYP81D11	CYP81D11	-3.22
AT5G09970	CYP78A7	CYP78A7	2.71

AT2G26710	BAS1	BAS1 // CYP72B1 // CYP734A1	-4.33
-----------	------	-----------------------------	-------

AT1G11600	CYP77B1	CYP77B1	-2.06
AT3G10560	UNE9	UNE9 // CYP77A7	2.42
AT1G63710	CYP86A7	CYP86A7	-2.39
AT2G23180	CYP96A1	CYP96A1	-2.08

Anexo 12.8 Genes con función en ciclo celular que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ -2) en inflorescencias de plantas 35S::DKM

Sobreexpresados

Reprimidos

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT3G61650	TUBG1	TUBG1	2.97
AT1G22920	CSN5A	CSN5A // AJH1	2.73
AT1G67140	SWEETIE	SWEETIE	2.45
AT1G68480	JAG	JAG	2.44
AT5G02470	DPA	DPA	2.27
AT2G30410	KIS	TFCA // KIS	2.20
AT3G60740	TTN1	EMB133 // TFC D // CHO // TTN1	2.15
AT4G21800	QQT2	QQT2	2.13

AT5G48630	AT5G48630	---	2.11
AT4G16440	NAR1	GOLLUM // NAR1	2.09
AT3G01690	AT3G01690	---	-2.04
AT4G27060	TOR1	SPR2 // TOR1 // CN	-2.05
AT4G21530	APC4	APC4	-2.06
AT1G55250	HUB2	HUB2	-2.06
AT4G17380	MSH4	ATMSH4 // MSH4	-2.09
AT2G21390	AT2G21390	---	-2.14
AT5G43020	AT5G43020	---	-2.16
AT1G08180	AT1G08180	---	-2.20
AT2G30040	MAPKKK14	MAPKKK14	-2.21
AT1G72670	iqd8	iqd8	-2.25
AT1G47220	CYCA3;3	CYCA3;3	-2.25
AT4G09140	MLH1	MLH1 // ATMLH1	-2.28
AT1G66740	ASF1A	ASF1A // SP7 // SGA2 // AtSP7	-2.34
AT4G28980	CDKF;1	CAK1AT // CDKF;1 ATSKP1 // ASK1 // UIP1 // SKP1 //	-2.34
AT1G75950	SKP1	SKP1A	-2.38
AT3G19590	BUB3.1	BUB3.1	-2.44
AT3G47870	LBD27	LBD27 // ASL29 // SCP	-2.48
AT4G28520	CRU3	CRC // CRU3	-2.49
AT4G28200	AT4G28200	---	-2.49
AT2G41230	ORS1	ORS1	-2.51
AT3G11270	MEE34	MEE34	-2.57
AT3G19150	KRP6	KRP6 // ACK1 // AtKRP6 // ICK4	-2.60
AT5G06460	UBA 2	ATUBA2 // UBA 2	-2.60
AT5G43560	AT5G43560	---	-2.60
AT2G46920	POL	POL	-2.61
AT1G49540	ELP2	AtELP2 // ELP2	-2.64
AT5G60410	SIZ1	ATSIZ1 // SIZ1	-2.66
AT3G13530	MAPKKK7	MAPKKK7 // MAP3KE1	-2.81
AT1G15570	CYCA2;3	CYCA2;3	-2.87
AT5G46210	CUL4	CUL4 // ATCUL4	-3.03
AT4G15830	AT4G15830	---	-3.46
AT5G54440	CLUB	AtTRS130 // CLUB	-3.51

Anexo 12.9 Genes con función en pared celular que están sobreexpresados (z-score ≥ 2) o reprimidos (z-score ≤ -2) en inflorescencias de plantas 35S::*DKM*

Sobreexpresados
Reprimidos

agi_id	Símbolo	Alias	z_score
AT3G07830	PGA3	PGA3	3.45
AT5G48140	AT5G48140	---	3.03
AT5G15630	IRX6	IRX6 // COBL4	2.97
AT2G45890	ROPGEF4	ROPGEF4 // RHS11 // ATROPGEF4 // GEF4	2.72
AT5G60490	FLA12	FLA12 // AtFLA12	2.71
AT5G06200	CASP4	CASP4	2.70
AT5G44070	CAD1	ARA8 // PCS1 // CAD1 // ATPCS1	2.63
AT4G27110	COBL11	COBL11	2.57
AT4G08685	SAH7	SAH7	2.54
AT4G01430	UMAMIT29	UMAMIT29	2.48
AT4G14360	AT4G14360	---	2.22
AT4G33220	PME44	ATPME44 // PME44	2.10
AT4G02330	PME41	AtPME41 // PME41 // ATPMEPCRB	-2.03
AT3G24620	ROPGEF8	ATROPGEF8 // ROPGEF8	-2.04
AT1G19220	ARF19	IAA22 // ARF11 // ARF19	-2.08
AT5G13290	CRN	CRN // SOL2	-2.08
AT1G33280	BRN1	BRN1 // ANAC015 // NAC015	-2.09
AT5G48760	AT5G48760	---	-2.10
AT3G62060	AT3G62060	---	-2.12
AT5G58600	TBL44	PMR5 // TBL44	-2.14
AT2G40320	TBL33	TBL33	-2.14
AT3G10470	AT3G10470	---	-2.16
AT2G47030	VGDH1	VGDH1	-2.22
AT1G48880	TBL7	TBL7	-2.23
AT2G20870	AT2G20870	---	-2.28
AT1G70310	SPDS2	SPDS2	-2.33
AT2G40150	TBL28	TBL28	-2.33
AT3G50990	PER36	PER36	-2.34
AT4G08950	EXO	EXO	-2.36
AT1G05850	POM1	ATCTL1 // ERH2 // HOT2 // ELP1 // ELP // CTL1 // POM1	-2.38
AT5G20890	AT5G20890	---	-2.45
AT5G47500	PME5	PME5	-2.51
AT4G09740	GH9B14	AtGH9B14 // GH9B14	-2.51
AT2G28250	NCRK	NCRK	-2.57
AT2G46920	POL	POL	-2.61
AT5G51820	PGM	ATPGMP // STF1 // PGM1 // PGM	-2.62
AT3G25050	XTH3	XTH3	-2.73
AT1G79250	AGC1.7	AGC1.7	-2.73
AT5G57560	XTH22	XTH22 // TCH4	-2.75

AT4G02320	AT4G02320	---	-2.83
AT4G18640	MRH1	MRH1	-2.91
AT1G17910	AT1G17910	---	-2.93
AT4G37800	XTH7	XTH7	-2.95
AT1G23080	PIN7	ATPIN7 // PIN7	-2.97
AT5G46340	RWA1	RWA1	-3.10
AT2G43050	ATPMEPCRD	ATPMEPCRD	-3.37
AT4G11450	AT4G11450	---	-3.38
AT5G43060	RD21B	RD21B	-3.43
AT1G24170	LGT9	LGT9 // GATL8	-3.46
AT3G29360	UGD2	UGD2	-3.54
AT3G28180	CSLC4	CSLC4 // ATCSLC04 // ATCSLC4 // CSLC04	-3.62
AT4G25570	ACYB-2	ACYB-2	-4.19