



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA-LANGEBIO

**”Identificación de genes de respuesta a la inducción del factor de transcripción
SPATULA en diferentes órganos y pre-tratamiento de citocininas en Arabidopsis”**

Tesis que presenta

Judith Jazmin Bernal Gallardo

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Biología de Plantas

Director de la Tesis: Stefan de Folter

Irapuato, Guanajuato

Julio del 2018

ÍNDICE DE CONTENID

2.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.1.- PLASTICIDAD.....	2
2.2 ARABIDOPSIS THALIANA: MODELO DE ESTUDIO.....	2
2.2.1 Desarrollo de la flor y fruto de Arabidopsis.....	3
2.2.2 Desarrollo de la hoja.....	4
2.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	7
2.4 LA FUNCIÓN DEL GEN SPATULA EN EL GINECEO DE ARABIDOPSIS THALIANA.....	8
2.5 SPATULA INVOLUCRADO EN EL DESARROLLO DE HOJA.....	10
2.6 SPATULA Y SU RELACIÓN CON FITOHORMONAS VEGETALES.....	11
2.6.1 Citocininas y auxinas son necesarias para el correcto desarrollo del gineceo.....	11
2.6.2 Citocininas y auxinas son necesarias para el desarrollo de hoja.....	12
2.6.3 El rol que ejerce SPTcon relación a citocininas y auxinas.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
Justificación.....	17
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Siembra de plantas.....	18
Aplicación de tratamientos y recolección de muestra.....	19
Estrategia experimental.....	20
Extracción y calidad de ARN total.....	21
qRT-PCR.....	22
Medición de aérea y conteo de tricomas.....	22
Análisis microscópico de estomas.....	23
Acumulación antocianinas por inducción de sacarosa.....	24

RESULTADOS.....	25
Código de identificación de muestras.....	25
Siembra de plantas.....	25
Obtención de muestras de ARN de buena calidad necesarios para la secuenciación masiva.....	26
Análisis de datos de secuenciación masiva.....	28
Calidad de los transcritos obtenidos de la secuenciación.....	28
Alineamiento de lecturas a los transcritos de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	29
Contraste “Escape de la línea”	29
Genes de respuesta a SPT.....	31
Genes de respuesta a BAP.....	34
Categorización de los genes de respuesta a SPT en inflorescencia.....	37
Categorización de los genes de respuesta a SPT en hoja.....	39
Conteo de tricomas.....	44
Conteo de estomas.....	46
DISCUSIÓN.....	58
 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	74
 ANEXOS.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Desarrollo del gineceo de <i>Arabidopsis thaliana</i> (ecotipo Landsberg erecta).	4
Fig. 2 La hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	6
Fig. 3 El gen <i>SPATULA</i> es necesario para el desarrollo del gineceo en <i>Arabidopsis</i>.	9
Fig. 5 El gen <i>SPATULA</i> está involucrado en la proliferación celular de la hoja en <i>Arabidopsis</i>.	11
Fig. 5 Esquema general del experimento.	20
Fig. 6 Esquema de las variables del diseño experimental.	21
Fig. 7 Zona de conteo de estomas en un cotiledón.	24
Fig. 8 Fotografía de colecta de muestras en el invernadero.	26
Fig. 9 Esquema general del proyecto de plasticidad transcripcional.	28
Fig. 10 Escape de la línea <i>35S::SPT:GR</i>.	30
Fig. 11 El número de genes de respuesta a SPT disminuye bajo un pre-tratamiento de BAP.	32
Fig. 12 Gráfico del tipo UpSet de interacciones entre los contrastes de los genes de respuesta a SPT.	33
Fig. 13 La inducción de <i>SPT</i> influye en los genes de respuesta a BAP.	35
Fig. 14 Gráfico del tipo UpSet de interacciones entre los contrastes de los genes de respuesta a BAP bajo la no inducción e inducción del gen <i>SPT</i>.	36
Fig. 15 Genes de respuesta a SPT en inflorescencia.	38
Fig. 16 Enrichment map de genes de respuesta a SPT con pre-tratamiento de BAP.	39
Fig. 17 Enrichment map de categorías GO enriquecidas en los genes de respuesta a SPT en hoja.	41
Fig. 18 Enrichment map de categorías GO enriquecidas en los genes de respuesta a SPT en hoja con pretratamiento de BAP.	42
Fig. 19 Hojas de roseta de <i>Arabidopsis</i> de 22 días después de germinación.	43
Fig. 20 Área de líneas sobre-expresantes de <i>SPT</i>, <i>spt-12</i> y <i>spt-2</i>, y líneas silvestres.	44
Fig. 21 Tricomas en las hojas de roseta de <i>Arabidopsis</i>.	46
Fig. 22 Número de tricomas por área de hojas de roseta de <i>Arabidopsis</i>.	46
Fig. 23 Estomas en cotiledones de 20 DDG en líneas Col-0, mutante <i>spt-12</i> y sobre-expresante <i>35S::SPT</i>.	48
Fig. 24 <i>SPT</i> está implicado en el desarrollo de estomas.	48
Fig. 25 Estomas de cotiledones de 20 DDG en líneas Ler, mutante <i>spt-2</i> y sobre-expresante <i>35S::SPT</i>.	50
Fig. 26 <i>SPT</i> está involucrado en el desarrollo de estomas en la parte adaxial.	51

Fig. 27 SPT está involucrado a la respuesta de antocianinas inducidas por sacarosa en cotiledones.....	52
Fig. 28 qRT-PCR análisis de dos genes de respuesta a SPT: <i>SPCH</i> y <i>EGL3</i>.....	55
Fig. 29 qRT-PCR análisis de dos genes de respuesta a SPT: <i>SPCH</i> y <i>EGL3</i> bajo un pre-tratamiento de BAP.....	56
Fig. 30 Posible ruta de regulación del ciclo celular mediada por SPT.....	64
Fig. 31 Posible ruta de señalización de SPT en la ruta de citocininas.....	66
Fig. 32 Posible ruta de señalización de SPT en la ruta de auxinas.....	67
Fig. 33 Posible ruta de señalización de SPT en la represión de <i>SPCH</i>.....	69

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1 Diseño experimental.....	19
Tabla 2 Resumen de resultados de calidad de RNA medidos en nanodrop.....	28
Tabla 3 Resumen de calidad de lecturas por el programa FastQC.....	29
Tabla 4 Resultado del alineamiento de las lecturas con el programa Kallisto.....	29
Tabla 5 Contrastes para identificar genes de respuesta a SPT.....	31

1.RESUMEN

Este proyecto fue dirigido al estudio de los genes de respuesta del factor de transcripción de SPATULA (SPT) implicado, entre otros tejidos, en el desarrollo del gineceo y hoja. El objetivo fue conocer si SPT tiene plasticidad transcripcional dependiente del microambiente en el que se encuentre. Se analizaron por transcriptómica hojas e inflorescencias de la línea inducible *35S::SPT:GR* y los resultados mostraron que los genes blanco de SPT cambian en función del tejido analizado y de un pre-tratamiento de las plantas con la citocinina sintética 6-bencilaminopurina (BAP). Así, la función de SPT, definida a través de la identidad de sus genes blanco, cambia en función del tejido y del microambiente. Es decir, SPT tiene plasticidad funcional.

Entre los blancos de SPT fueron identificados genes involucrados en el desarrollo de estomas y tricomas, y en la biosíntesis de antocianinas. Un análisis de mutantes y líneas de expresión constitutiva de *SPT* confirmaron el papel de SPT en estos procesos. Estas funciones para SPT en hoja no habían sido descritas previamente.

ABSTRACT

This project was directed to study the response genes of the transcription factor SPATULA (SPT), which is involved, among other tissues, in gynoecium and leaf development. The objective was to know if SPT has transcriptional plasticity dependent on the microenvironment. We analyzed by transcriptomics leaves and inflorescences of the inducible line *35S::SPT:GR* and the results showed that the target genes of SPT change depending on the tissue analyzed and a pre-treatment of plants with the synthetic cytokinin 6-benzyl-aminopurine (BAP). Thus, the function of SPT, defined through the identity of its target genes, changes depending on the tissue and microenvironment. This means that SPT has functional plasticity.

Among the target genes of SPT were identified genes involved in stomata and trichome development, and anthocyanin biosynthesis. An analysis of mutants and constitutive expression lines of *SPT* confirmed the role of SPT in these processes. These functions for SPT in leaves have not been previously described.

2.- INTRODUCCIÓN

Esta investigación se ha referido al estudio del factor de transcripción de SPATULA (SPT), en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, desde el aspecto de la plasticidad transcripcional y elucidar si el factor de transcripción presenta una plasticidad tejido-dependiente y condición-específica.

Este trabajo tiene por objetivo saber cuáles son los genes de respuesta del factor de transcripción SPT y conocer la función biológica de estos genes de respuesta. Además de elucidar un poco, si SPT tiene plasticidad transcripcional al estar en presencia de un microambiente diferente, en este caso se abordará el microambiente de citocininas. Y si esta plasticidad transcripcional es tejido-dependiente.

Como objetivos específicos de esta investigación son obtener los genes de respuesta de SPT, tanto en hoja como inflorescencia y bajo un pre-tratamiento con la hormona citocinina (BAP), así como un análisis de enriquecimiento de los genes de respuesta de SPT, para entender más a fondo las funciones que ejerce SPT.

Para ello, se hizo uso de transcriptómica, así como de análisis de datos de genes diferencialmente expresados entre contrastes de la presencia/ausencia del factor de transcripción y bajo pre-tratamiento de BAP. Posteriormente se hicieron análisis de enriquecimiento en base a los datos de Gene Ontology (GO), con el fin de conocer la función biológica de los genes de respuesta de SPT tanto en hoja e inflorescencia y pre-tratamiento de BAP. Así como, ensayos confirmatorios de la función molecular de SPT en hoja.

Tomando en cuenta esta idea, analizando la plasticidad de un factor de transcripción, se formulan las siguientes preguntas: *¿Un factor de transcripción tiene plasticidad?, ¿La regulación de un factor de transcripción se ve afectada por el microambiente?*

2.1.- PLASTICIDAD

El término plasticidad desde un aspecto biológico en plantas se introdujo como: “plasticidad fenotípica”. Este término que se define como: la capacidad que tiene un genotipo de generar diversos fenotipos bajo diferentes condiciones ambientales (Pigliucci et al., 2006). Un ejemplo de esta plasticidad es cuando una planta es expuesta a un fotoperiodo natural (luz durante el día y ausencia de luz durante la noche), presenta un fenotipo de hojas de color verde, mientras que la planta que se expone a luz constante el fenotipo que presenta son hojas de color tinto (Barp et al., 2006). Lo anterior indica que aunque el genotipo de la plantas es el mismo, el fenotipo en el color de las hojas varía dependiendo de las condiciones de luz. Otro aspecto referente a la plasticidad que ha sido poco usado en plantas es la plasticidad transcripcional. Este término de plasticidad se ha dirigido a estudios transcriptómicos con el fin de conocer si la regulación transcripcional es tejido-específico, a lo que se denomina “plasticidad tejido-específico” dependiendo en el microambiente que se encuentre (Opitz et al., 2016).

Debido a que en la literatura no queda clara la definición de plasticidad regulatoria, para fines de este proyecto se define como *la capacidad que tiene un factor de transcripción de regular la transcripción de genes de acuerdo con las condiciones en el que se encuentre*. En este concepto también es necesario definir a que se refieren los genes que regula un factor de transcripción. Los genes blanco de un factor de transcripción pueden ser directos cuando el factor de transcripción se une al promotor para transcribir el gen o indirectos cuando el factor de transcripción se une al promotor de un gen que dará origen a una proteína que transcribirá el gen blanco. Por cuestiones del desarrollo del proyecto, nos interesan ambos tipos de genes blanco a los que denominamos “genes de respuesta” y se definen como *aquel gen que cambia su nivel de expresión como consecuencia de la acción de un factor de transcripción*.

2.2 ARABIDOPSIS THALIANA: MODELO DE ESTUDIO.

El modelo de investigación en este proyecto es *Arabidopsis thaliana* en específico los tejidos de inflorescencias y hojas, enseguida se describe brevemente la conformación de cada uno de estos órganos.

2.2.1 Desarrollo de la flor y fruto de Arabidopsis

Las angiospermas son plantas que producen flores que están formadas por un pistilo también llamado gineceo en su centro. El gineceo comienza a desarrollarse como un cilindro hueco. En los márgenes de los carpelos se desarrolla una región meristemática que se le conoce como el meristemo marginal del carpelo (CMM, por sus siglas en inglés).

A partir del CMM se desarrollan la placenta, los óvulos, el séptum, el tracto de transmisión, el estilo y el estigma, todas estas estructuras se localizan en la región media del carpelo y son importantes para el desarrollo correcto de las semillas. En la parte abaxial del dominio medio del gineceo, células se diferencian en tres tejidos: el réplum, los márgenes de las valvas y las valvas.

Cuando empieza la floración, el meristemo apical del tallo (del inglés: shoot apical meristem, SAM) se convierte a meristemo de inflorescencia, el cual produce un meristemo floral con un patrón organizado. Cada meristemo floral produce una flor que consiste en cuatro verticilos, los cuales tienen de afuera hacia dentro, cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y un gineceo en el centro. Para su estudio el desarrollo de la flor y el fruto en *Arabidopsis* se ha dividido en 20 etapas.

En la etapa 5, se forma el primordio del gineceo. En la etapa 6 comienza a desarrollarse el gineceo. En la etapa 7, el gineceo continúa creciendo como un tubo hueco (Fig. 1). En la etapa 8, los dos meristemas marginales del carpelo (del inglés: carpelmeristem marginal; CMM) entran en contacto y comienzan a desarrollarse. El desarrollo continúa en la etapa 9, los dos CMMs forman el séptum a través de una fusión post-genital, al mismo tiempo, en los flancos del CMM, el tejido de la placenta está formado. En la etapa 10 la placenta produce los primordios de óvulos, y en la parte superior del gineceo las primeras papilas estigmáticas se hacen visibles. Finalmente, el

gineceo empieza acerrarse en la etapa 11, y las papilas estigmáticas cubren totalmente al estigma. Durante la etapa 12, el estilo y el tracto de transmisión se diferencian para dar un gineceo maduro. Además, las valvas, los márgenes de las valvas y el réplum son morfológicamente distintivos.

En la etapa 13, ocurre la antesis y la auto-polinización, y las flores se abren. Después de la polinización y la fecundación de los óvulos, el gineceo se desarrollará en un fruto (Alvarez-Buylla et al., 2010; Reyes-Olalde et al., 2013).

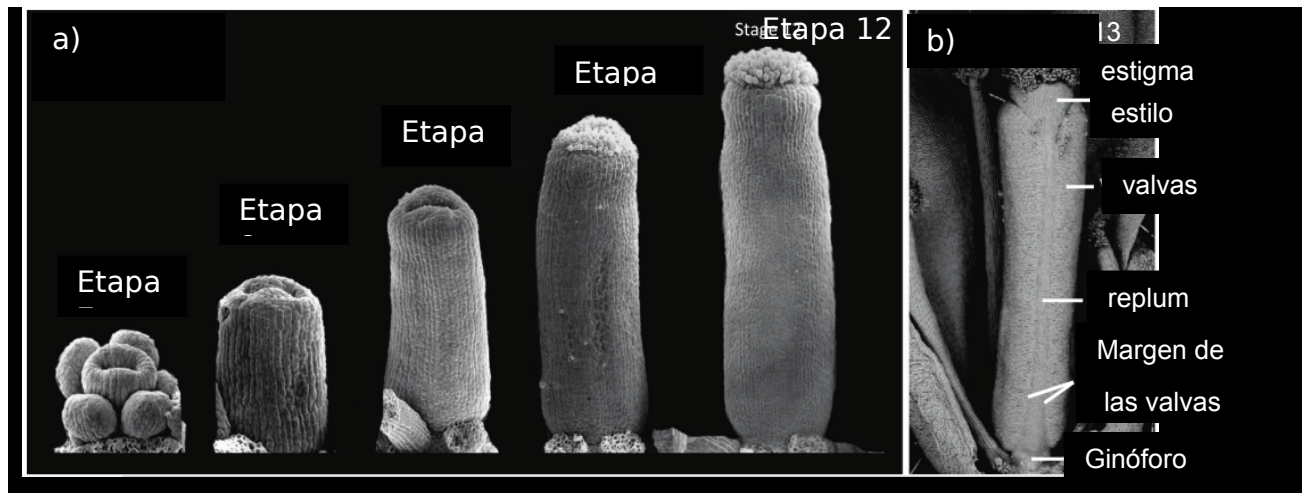


Fig. 1 Desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Landsberg erecta)

a) Imágenes de gineceos silvestres en las etapas 7,8,9,11 y 12, tomadas con microscopía electrónica de barrido. b) Gineceo maduro etapa 13, la flor está abierta. Imágenes en (a) obtenida de Alvarez et al., 2009; (b) obtenida de Zúñiga-Mayo et al., 2012.

2.2.2 Desarrollo de la hoja

Las hojas son los órganos fotosintéticos de las plantas, indispensables para su desarrollo y obtención de energía. Sin hojas, las plantas no podrían ser capaces de percibir condiciones ambientales de la calidad y cantidad de luz, que le permitirán sintetizar compuestos para su desarrollo. El desarrollo de la hoja es complejo, ya que requiere de un control minucioso en la proliferación, expansión y diferenciación celular, dando como resultado las hojas con tamaños y formas distintas entre las especies (Kalve et al., 2014).

El desarrollo de la hoja podría definirse en tres pasos 1) iniciación del primordio de la hoja, 2) establecimiento de la dorsiventralidad de la hoja (formación de la parte abaxial

y adaxial de la hoja) y 3) desarrollo del meristemo marginal. En la etapa 1 el primordio está especificado por un máximo de auxinas, flanqueando la región del meristemo apical del tallo (del inglés: shoot apical meristem; SAM), siguiendo una filotaxis en espiral resultando en un crecimiento asimétrico de las láminas de las hojas.

Posteriormente, se empieza a establecer la dorsiventralidad de la hoja y formación de las láminas de las hojas. Esto va acompañado del nivel de proliferación celular en el SAM, creando primeramente el primordio de hoja, posteriormente, se establece la formación de la unión de la lámina de hoja y la unión a la región del peciolo. La parte apical del primordio de la hoja es ocupado por células pequeñas no polarizadas, con arreglos longitudinales, transversales y oblicuos en los ejes próximo-distales. Después de la diferenciación de las regiones apical y basal, la proliferación celular en el primordio de hoja se acelera entre la lámina y el peciolo. Las nuevas células se suministran direccionalmente desde la región de unión hasta la punta para la construcción de la hoja o lámina de hoja y a la base para la construcción del peciolo. Esta actividad dinámica a que se le denomina meristemo marginal contribuye al desarrollo de la lámina o expansión de la hoja (Tsukaya, 2013).

El crecimiento de las hojas ocurre a través de dos maneras, la expansión celular y la proliferación celular. La proliferación celular incrementa el número de células durante el desarrollo de la hoja, por ello la división celular debe ser estable para el crecimiento del tejido. El ciclo celular es estrictamente regulado por mecanismos moleculares. En plantas el ciclo celular es controlado por la actividad de complejos que consisten en cinasas dependientes de ciclinas como las tipo A y D (CDKA y CYCD) involucradas en la transición de la fase (G1/S) en la que las células se activan para la duplicación del ADN. Las CDKA's son proteínas clave en el control de la división celular en *A. thaliana*, después de la duplicación del ADN las células entran a la fase G2 preparándose para mitosis y las ciclinas CDKA, CDKB y CYCD están involucradas en este proceso (Schaller et al., 2014; Collins et al., 2015). Sin embargo, existe un equilibrio entre la expansión celular y división celular para dar el tamaño final de la hoja, requiriendo reguladores tanto de la proliferación como de la expansión celular, esto no quiere decir

que ambos procesos sean independientes, al contrario, ambos procesos se regulan en conjunto, siendo una regulación minuciosa (Kalve et al., 2014).

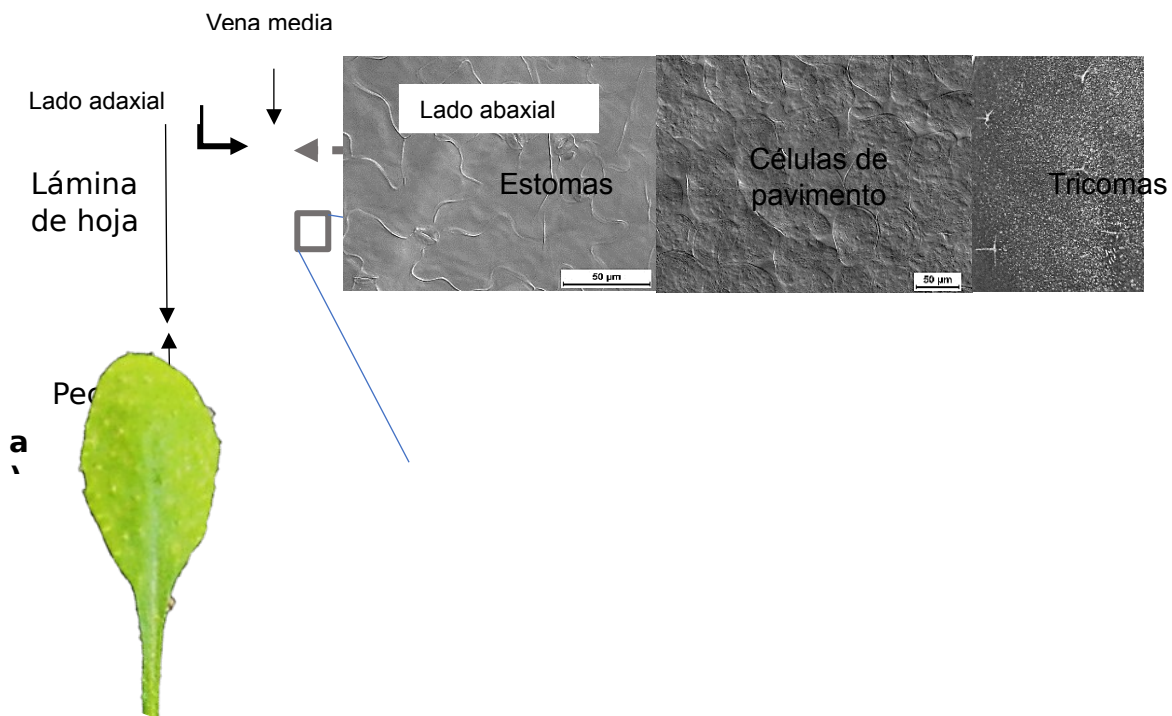


Fig. 2 La hoja de *Arabidopsis thaliana*

Esquema general de las partes y células especializadas de la hoja en *Arabidopsis thaliana*. a) Hoja de *A. thaliana*. b) Estomas en un campo de 40X en microscopio Nomarski con microscopía de contraste diferencial de interferencia, DIC. c) Células de pavimento en un campo de 20X en microscopio Nomarski con microscopía de contraste diferencial de interferencia, DIC. d) Tricomas tomados en estereoscopio.

Por otra parte, durante el proceso de desarrollo de hojas, las células tienen la habilidad de diferenciarse en distintos tipos como son las células guardianas, células de tejido vascular y tricomas, realizando diferentes funciones (Fig. 2). Todos estos tipos de células se desarrollan de células indiferenciadas en el primordio cuando es joven y bajo

el control de distintas rutas regulatorias. El proceso de desarrollo desde una célula indiferenciada a la formación de una estoma, esta principalmente regulado por tres factores de transcripción de la familia bHLH, *SPEECHLESS (SPCH)*, *FAMA (FMA)* y *MUTE*(*MacAlister et al., 2007; Torii et al., 2007; Lee et al., 2017; de Marcos et al., 2017*).

Otras células diferenciadas son las células de la vasculatura reguladas por una concentración alta local de auxina. Este flujo de auxinas induce la identidad pro-vascular dirigiendo la diferenciación de las venas medias y venas laterales. Además, durante el desarrollo de las hojas, células específicas epidermales se convierten en pelos de las hojas o tricomas. Las células de los tricomas se forman después de cuatro ciclos de endoreplicación para su desarrollo (Kalve et al., 2014). El proceso de diferenciación entre una célula de tricoma o una célula de pavimento está regulado por un complejo formado de factores de transcripción pertenecientes a tres familias, denominado complejo bHLH-MYB-WD40. Dicho complejo está formado por el factor de transcripción de la familia WD40 *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)*, el factor de transcripción de la familia bHLH *GLABRA3 (GL3)* y el factor de transcripción de la familia MYB *GLABRA1 (GL1)* (*Payne et al., 2000; Zhao et al., 2008*).

Para el correcto desarrollo vegetal es necesaria la participación de varios factores, entre ellos la modulación molecular de los factores de transcripción y las fitohormonas, cuyo papel describiré brevemente a continuación.

2.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Primeramente, podríamos definir a un factor de transcripción (FT) como “proteína que se une al ADN (ácido desoxirribonucleico), reconociendo una secuencia específica”. Los FT’s pueden actuar como activadores y/o represores de la transcripción de su(s) gen(es) blanco (Arratia & Aguirre, 2013).

Entre las familias de factores de transcripción en *Arabidopsis* se encuentra la familia de proteínas básicas hélice-bucle-hélice (del inglés: basic/helix-loop-helix, bHLH) que cuenta con aproximadamente 147 genes. Esta familia es definida por un dominio bHLH,

que consiste en 60 aminoácidos con dos regiones funcionales distintas. La región básica se encuentra del lado N-terminal, está involucrada en la unión al ADN. La región HLH está en el extremo C-terminal, participa en el proceso de dimerización, ya que algunas proteínas bHLH forman homo y/o heterodímeros (Toledo-Ortiz et al., 2003).

Entre los miembros de esta familia se encuentra el factor de transcripción *SPATULA* (*SPT*). El gen que codifica a *SPT* está conformado por 7 exones y 6 intrones, el gen se sitúa en el cromosoma 4. Para el estudio de *SPT* se han caracterizado dos mutantes insercionales nombradas *spt-11* y *spt-12* y dos mutantes puntuales *spt-2* y *spt-3* (Alvarez & Smyth, 1999; Heisler et al., 2001; Groszmann et al., 2008; Ichihashi et al., 2010) y cuyas funciones se describen brevemente en el siguiente apartado.

2.4 LA FUNCIÓN DEL GEN *SPATULA* EN EL GINECEO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Una de las primeras funciones que se le ha atribuido al *SPT* es en el gineceo, ya que la mutante *spt-2* presenta una incorrecta fusión del séptum y en la parte superior apical del gineceo no se encuentra una correcta fusión (Fig. 3e,f). El gen *SPT* interactúa genéticamente con diferentes factores de transcripción durante el desarrollo del gineceo y fruto en *Arabidopsis*. La primera interacción en describirse fue con el gen *CRABS CLAW* (*CRC*). La mutante *crc-1* presenta un fenotipo parecido a la mutante *spt-2* ya que ambas mutantes tienen defectos en la fusión post-genital de la parte apical del gineceo, aunque, *crc-1* si tiene tracto de transmisión. En cambio, en la doble mutante *crc-1 spt-2* no existe fusión a todo lo largo del gineceo y los carpelos generan pocos óvulos, resultando en plantas estériles, sugiriendo que estos dos genes participan en el desarrollo del gineceo en rutas independientes (Fig.3c-h) (Alvarez & Smyth, 1999).

El gen *SPT* también interactúa con los genes *INDEHISCENT* (*IND*), *ALCATRAZ* (*ALC*) y *HECATE1,2* y *3* (*HEC1,2,3*), ya que las mutantes *spt-12 hec1,2,3* (Fig.3i-k), *spt-12 ind-2* (Fig.3l-n) y *spt-2 alc* (Fig.3ñ-p), presentan un fenotipo de carpelos no fusionados más severos que la mutante sencilla de *spt*, en este caso los resultados sugieren que estos genes participan en el desarrollo del gineceo de manera parcialmente redundante

(Fig. 3i-o) (Liljegren et al., 2004; Gremski et al., 2007; Girin et al., 2011; Groszmann et al., 2011; Schuster et al., 2014; Schuster et al., 2015). Por lo tanto, estas interacciones genéticas de estos genes con *SPT* sugieren que son necesarios para la correcta fusión de los carpelos y del séptum, así como el correcto desarrollo del tracto de transmisión y estilo. Además teniendo en cuenta que su patrón de expresión es amplio en el CMM y en diferentes tejidos como séptum, márgenes de las valvas, óvulos, se amplían las posibles funciones de *SPT* (Groszmann et al., 2010).

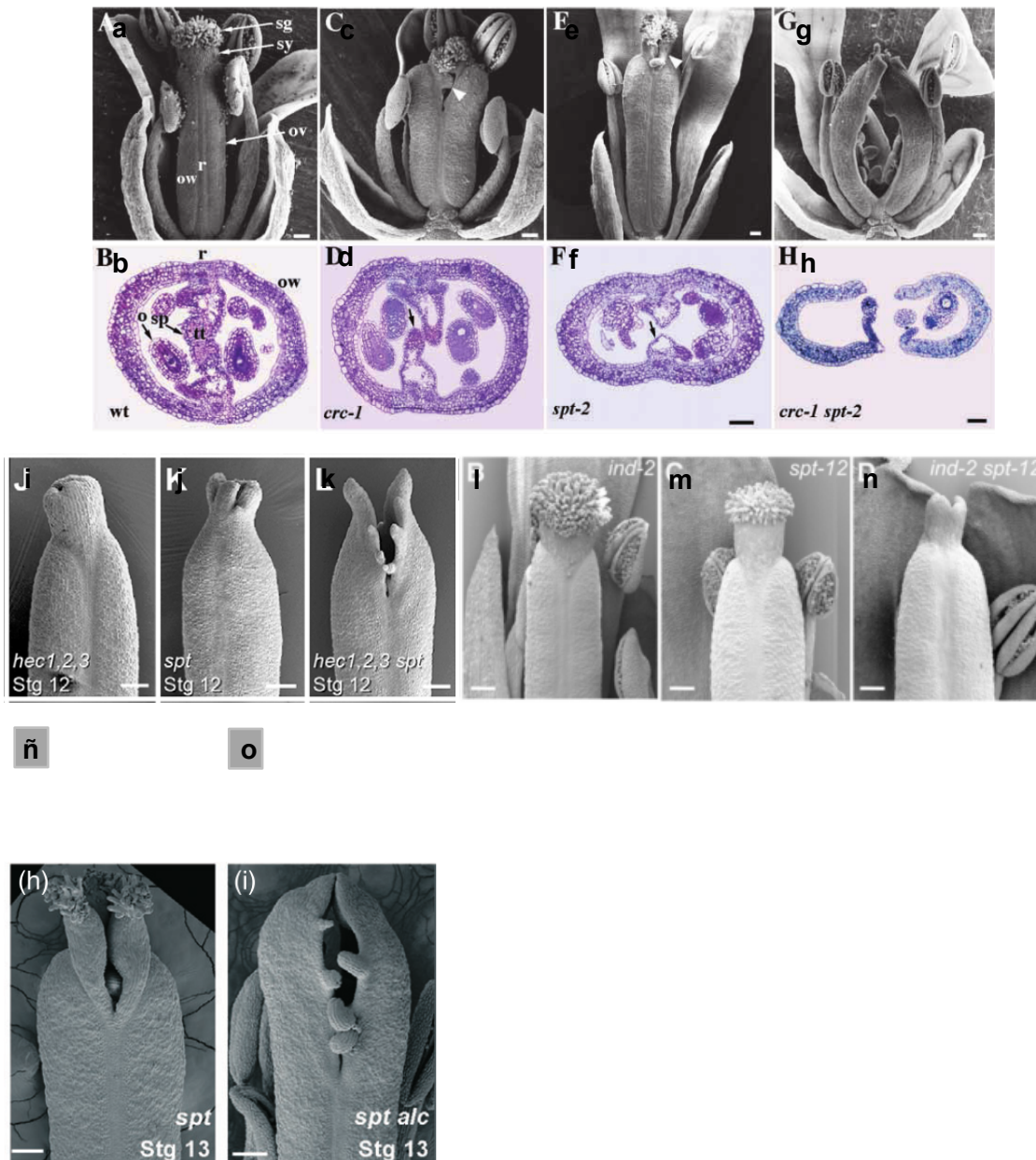


Fig. 3 El gen *SPATULA* es necesario para el desarrollo del gineceo en *Arabidopsis*

Interacciones genéticas entre *SPATULA* y otros factores de transcripción.

(a,b) Gineceo de una planta silvestre, donde se muestra el ovario (ov), el estilo (sy) y estigma (sg) del gineceo. Los dos carpelos están fusionados en la parte media. Las paredes de los ovarios están unidas por el réplum. El séptum (sp) divide al ovario en dos lóculos. La matriz extracelular es secretada por las células dentro del séptum y actúa como un tracto de transmisión para el polen (tt). Los óvulos (o) surgen de regiones placentarias cercanas o dentro de cada lado de los brotes septales. (c,d) *crc-1*, se muestra un gineceo más corto y ancho que no está fusionado en la parte apical del gineceo (puntas de flechas). El séptum no está fusionado, aunque las células del tracto de transmisión están presentes (flechas). (e,f) *spt-2*, muestra defectos en la fusión de los carpelos en la región del estilo (puntas de flecha). No hay células del tracto de transmisión (flechas). (g,h) *crc-1 spt-2* muestra una fuerte reducción de la fusión de los carpelos, y un desarrollo reducido en el estilo, estigma, séptum y óvulos. Escala: A,C,E,G es de 100 µm; F,H 50 µm. Imagen obtenida de (Alvarez and Smyth, 1999).

(i-k) Un efecto más prominente en el defecto de la fusión del carpelo en la cuádruple mutante *hec1,2,3 spt* que las mutantes triple *hec1,2,3* y *spt*. Imagen tomada de (Schuster et al., 2015).

(l-n) Tejidos de la parte apical del gineceo en etapa 13 de mutantes *ind-2,spt-12* e *ind-2 spt-12*. Imagen obtenida de (Girin et al., 2011).

(ñ,o) Desarrollo retardado del gineceo en la doble mutante *spta/c*. Imagen de un gineceo maduro en la etapa 13. Escala de 50 µm. Imagen obtenida de (Groszmann et al., 2010).

2.5 SPATULA INVOLUCRADO EN EL DESARROLLO DE HOJA

Durante la fase vegetativa, el gen *SPT* se expresa en el SAM y los primordios de las hojas. En etapas más tardías, *SPT* se expresa en la vasculatura, los márgenes basales y los hidátoides de la hoja (Groszmann et al., 2010), así como también en células estomatales en hojas maduras (Ichihashi et al., 2010).

Se ha reportado que *SPT* controla la proliferación celular en hoja, ya que la mutante *spt-11* desarrolla hojas con láminas y peciolo más grandes respecto a la silvestre. El aumento de tamaño se debe al incremento en el número de células, sin afectar significativamente la forma de la hoja (Ichihashi et al., 2010). Por otra parte, en la línea sobre-expresante de *SPT*, las hojas son más pequeñas que la silvestre. Además, esta regulación en tamaño es dependiente de la temperatura y el ritmo circadiano (Sidaway-Lee et al., 2010).

El gen *SPT* actúa de manera sinérgica con los genes *DELLA* en el desarrollo de los cotiledones, ya que ambas mutantes *spt-2* y *della-4* presentan cotiledones más grandes

que la silvestre (Ler). Sin embargo, la quintuple mutante *spt-2 della-4* presenta unos cotiledones más grandes comparados con silvestre y las mutantes *spt-2* y *della-4* (Fig. 5C) (Josse et al., 2011). Lo anterior sugiere que estos genes actúan como represores de la proliferación celular. Por lo tanto, está controlando el tamaño de la hoja regulando a través de una regulación negativa de la proliferación celular.

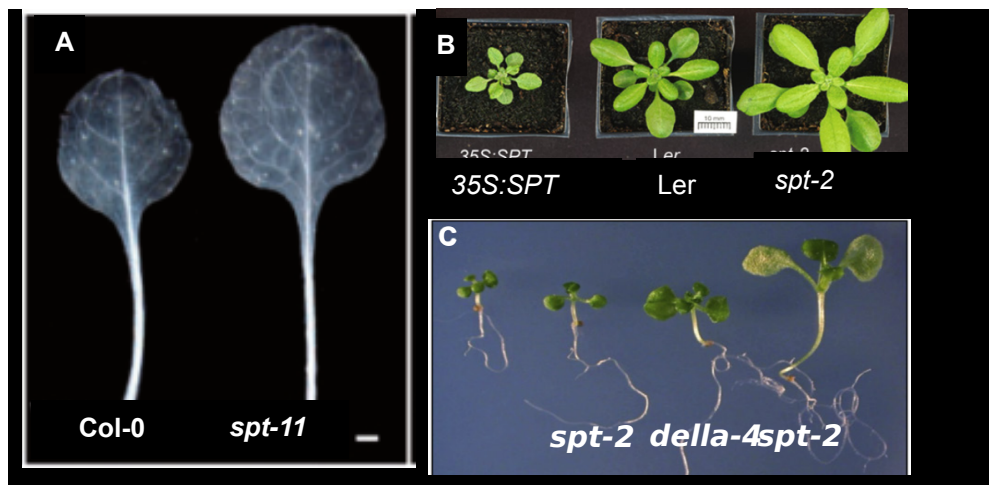


Fig. 4 El gen *SPATULA* está involucrado en la proliferación celular de la hoja en *Arabidopsis*

Fotografías de la caracterización de la mutante *spt*. A) mutante *spt-11* presenta hojas más grandes que la silvestre (Col-0) Escala de la barra 1 mm. Imagen tomada de Ichihashi et al., 2010. B) Fotografía de plantas de la línea sobre-expresante *35S::SPT*, mutante *spt-2* y la silvestre (Ler). Imagen tomada de (Sidaway-Lee et al., 2010). C) Fotografía de las mutantes *spt-2*, *della-4* y *spt-2 della-4*. Imagen tomada de (Josse et al., 2011)

2.6 SPATULA Y SU RELACIÓN CON FITOHORMONAS VEGETALES

Las fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados en una parte de la planta y estos se translocan a otra parte de esta, en la que en bajas concentraciones puede causar un efecto fisiológico. A las fitohormonas se les han atribuido funciones en el control de actividad celular (división, elongación y diferenciación), organogénesis y respuestas a estrés biótico o abiótico (Raven et al., 1991; Kieber & Schaller, 2014). Existen distintas fitohormonas vegetales como son: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, brasinoesteroides, ácido jasmónico, ácido abscísico, estrigolactonas, poliaminas y sistemina. Las cuales cada una ejerce funciones específicas, pero también pueden regular los mismos procesos biológicos de manera sinérgica o

antagónica, a lo que se le llama “cross-talk” entre las fitohormonas (Das et al., 2012; Marsch-Martínez et al., 2012b; Cai et al., 2014; Chen et al., 2014; Müller et al., 2017; Reyes-Olalde et al., 2017a).

2.6.1 Citocininas y auxinas son necesarias para el correcto desarrollo del gineceo

Estudios en el laboratorio, han caracterizado el patrón de expresión de citocininas en el gineceo y en los frutos, usando una línea marcadora de la señalización de citocininas *TCS::GFP*, cuya fluorescencia se muestra a lo largo del desarrollo del gineceo, desde el botón hasta la parte superior, en la parte central de la región media y en los márgenes. En etapas de un gineceo maduro continua la señal en el tracto de transmisión, en la parte apical del gineceo y en los márgenes de las valvas. Además, alteraciones en el desarrollo del gineceo se han observado al aplicar tratamiento de citocininas, causando tejidos ectópicos y diferencias en el ancho del réplumen los gineceos de Arabidopsis. Por otra parte, la aplicación exógena de citocininas restaura fenotipos de genes involucrados en la formación del gineceo (Köllmer & Schmülling, 2011; Marsch-Martínez et al., 2012; Marsch-Martínez & de Folter, 2016; Müller, Larsson, Spíchal, & Sundberg, 2017; Reyes-Olalde et al., 2013, 2017; Schuster et al., 2015).

Se ha observado que una concentración alta local de auxinas se requieren en el desarrollo del estilo, ya que el defecto causado en el estilo en las mutantes del gen *STYLISH1 (STY1)*, *sty1-1 sty2-1* es por una reducción de la concentración de auxinas, y al aplicar altas concentraciones de auxinas se recupera el correcto desarrollo del estilo (Ståldal et al., 2008).

Durante el desarrollo del gineceo la distribución de auxinas está controlada en espacio y tiempo, ya que el patrón de expresión de la línea reportera de la señalización de auxinas, *DR5::GFP*, ya que dos puntos específicos, y se establecen en los dominios laterales en las etapas 5 y 6 del desarrollo del gineceo. Subsecuentemente dos focos específicos emergen en las etapas 8/9, e inmediatamente antes de la formación del estilo en la etapa 10 (Marsch-Martínez et al., 2012a). Se sugirió que estos patrones contrarrestan son importantes para la transición de la simetría bilateral a radial

(Moubayidin & Ostergaard, 2014). Además, se ha estudiado como es necesaria el sensor de las auxinas por la planta para el desarrollo del gineceo, y ejemplos de dos genes involucrado son *ETTIN (ETT)*, codifica para un gen *ARF*, e *INDEHISCENT (IND)*, que es un miembro de la familia bHLH como *SPT* (Sessions et al., 1995; Yang & Sack, 1995b; Sessions et al., 1997; Liljegren et al., 2004; Wu et al., 2006; Simonini et al., 2016).

2.6.2 Citocininas y auxinas son necesarias para el desarrollo de hoja

Las citocininas son derivados de las adeninas y con distintas sustituciones en la posición N⁶ del anillo de la adenina. Esta fitohormona está implicada en aspectos de crecimiento del desarrollo vegetal, así como, en la división celular, en el mantenimiento de meristemas, senescencia de hojas, dominancia apical, desarrollo vascular, desarrollo gametofítico y foto-morfológico (Kieber & Schaller, 2014; Schaller et al., 2015).

El rol de las citocininas en la regulación del desarrollo en hoja, ha sido por la regulación de las ciclinas del tipo D, *CYCD3*, que regulan la transición de la fase G1-S del ciclo celular, controlando la proliferación celular y la fase G2-M (Riou-Khamlichi et al., 1999; Schaller et al., 2014; Collins et al., 2015). Además, las citocininas están involucradas en la apertura/cierre de los estomas, ya que la aplicación exógena de citocininas antagoniza el efecto del ácido abscísico (del inglés: abscisic acid, ABA) la cual es la principal hormona que regula el cierre de estomas (Tanaka et al., 2006). También las citocininas están involucradas en la regulación positiva del desarrollo de tricomas de las hojas (Matías-Hernández et al., 2016). Así como en el proceso de senescencia de la hoja y maduración de la hoja (Efroni et al., 2013; Raines et al., 2016).

En hoja, las auxinas juegan un papel importante en el desarrollo, especialmente en la iniciación de la formación de la hoja ya que se requiere de un máximo de auxinas en la periferia del SAM que marca los sitios de iniciación del primordio de hoja. Además que mutaciones de genes de la familia *AUX/LAX*, importadores de auxinas, alteran la distribución de auxinas y una desorganización en la formación del primordio de la hoja

(Bainbridge et al., 2008). Además, las auxinas se han asociado a la formación de vasculatura en la hoja, así como el posicionamiento de las venas en la hoja y cuya expresión converge con el gen *PIN-FORMED1* (*PIN1*) que codifica para un transportador del efflux de auxinas (Gardiner et al., 2011; Ljung, 2013; Marcos and Berleth, 2014; Mu et al., 2014; de Marcos et al., 2017). Así como, la regulación de la filotaxis en la disposición de las hojas mediante el patrón de auxinas regulado por el transportador PIN (Reinhardt et al., 2000; Reinhardt et al., 2003; Bainbridge et al., 2008).

2.6.3 El rol que ejerce SPT con relación a citocininas y auxinas

Las auxinas y las citocininas son dos de las hormonas más estudiadas en *Arabidopsis* y SPT está relacionado con ambas hormonas. Se ha demostrado que SPT interactúa con IND a nivel de proteína-proteína y dicha interacción es necesaria para la correcta distribución de auxinas en los márgenes de las valvas del fruto en *Arabidopsis*, además que regulan genes en común para la correcta distribución de auxinas (Girin et al., 2011; Smaczniak et al., 2012; Jiang et al., 2014; Moubayidin & Ostergaard, 2014; Simonini et al., 2016).

Por otra parte, se han usado inhibidores para interferir el flujo polar de auxinas y se ha observado que el fenotipo de la mutante *spt-2* en gineceo se recupera por la aplicación del inhibidor del transporte polar de auxinas (del inglés: N-1-naphthylphthalamic acid, NPA), lo que sugiere que la función de SPT está vinculada al correcto transporte polar de auxinas en el gineceo (Nemhauser et al., 2000). También se ha observado que la mutante *spt* presenta un fenotipo más aberrante en el estilo del gineceo cuando está en presencia de 6-benziladenina (del inglés: 6-benzyladenine, BAP), por lo que sugiere que la mutante *spt* es hipersensible a citocininas en el estilo (Schuster et al., 2015).

Por otra parte, se ha observado que la respuesta de citocininas en el gineceo es diferente en la ausencia de *SPT*, ya que un gineceo silvestre expuesto a BAP presenta tejido ectópico en el gineceo, mientras que en la mutante *spt* expuesta a un mismo tratamiento de BAP, presenta solo un tejido ectópico en la parte superior apical del

gineceo, mientras que la parte media del gineceo (el ovario) es insensible al tratamiento con BAP. Esto nos sugiere que la respuesta a citocininas en la que está involucrado SPT es específica en el ovario (Reyes-Olalde et al., 2017a).

Sin embargo el cross-talk entre hormonas es un tema que se ha abordado en nuestro laboratorio (Marsch-Martínez & de Folter, 2016), en el cual se ha hecho énfasis en el estudio de SPT y auxinas y citocininas (Reyes-Olalde et al., 2017a; Reyes-Olalde et al., 2017b), los estudios anteriores nos marcan un pauta de la relación de SPT con estas dos fitohormonas. Un trabajo clave de la relación de SPT con citocininas y auxinas abordado en el laboratorio, en la cual hay evidencia de que SPT es necesario para la señalización de citocininas en gineceo, ya que el patrón de expresión se ve afectado en la parte media del gineceo (en el ovario) en la mutante de *spt* en relación con la silvestre, así como en la sobre-expresante de *SPT* (*35S::SPT*). Esto también sucede cuando a la mutante se le agrega citocinina (BAP). Por otra parte, se ha demostrado que SPT regula a genes de respuesta de citocininas tipo-B, siendo *ARR1* y *ARR12* (del inglés: *Arabidopsis Response Regulators*). Sin embargo, la participación de SPT en el cross-talk de citocininas y auxinas, se observa cuando en la mutante *spt*, el patrón de expresión de un gen de biosíntesis de auxinas *Amino Transferasa de Arabidopsis* (*TAA1*) existe menos intensidad de la señal que en la silvestre, y además, cuando se aplica BAP se observa un patrón de *TAA1::GFP* más intenso que no ocurre en la mutante *spt*, lo que sugiere que las citocininas pueden regular genes de biosíntesis de auxinas y que SPT contribuye a esta regulación (Reyes-Olalde et al., 2017b).

Una de las funciones de SPT es en la dormancia de las semillas en relación con las giberelinas cuya síntesis y percepción es establecida por la respuesta a luz y frío en la germinación de semillas, siendo éstas requeridas para la germinación de semillas (Penfield et al., 2005; Sidaway-Lee et al., 2010; Vaistij et al., 2013). Además, las giberelinas son esenciales en el proceso de transición de la etapa vegetativa a la etapa reproductiva (tiempo de floración), en la elongación del tallo y desarrollo floral (Schwechheimer, 2008). Se ha observado que en las mutantes *spt-2* y *spt-10* hay un mayor porcentaje de germinación que en la silvestre (Penfield et al., 2005). Además, la mutante *spt-11* presenta un hipocótilo más grande que la silvestre (Josse et al., 2011),

demostrando la importancia de la relación de SPT y giberelinas en el control en germinación y crecimiento.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y partiendo del concepto de plasticidad regulatoria de un factor de transcripción, planteo varias preguntas. Ya que es un factor de transcripción cuyo patrón de expresión es extenso a lo largo del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, *¿Presenta SPATULA plasticidad regulatoria en cuanto al tipo de tejidos en los que se expresa? Por ejemplo, ¿Existen diferencias en la función de SPT en tejidos distintos, como hojas y flores?* Y ya que es un factor de transcripción implicado en fitohormonas, *¿La regulación de SPT se ve modificada por la presencia de fitohormonas, por ejemplo, citocininas?* Estas son las preguntas que se abordarán en esta investigación, finalizando con un análisis funcional del rol regulatorio de SPT en la diferenciación de tejidos de hojas.

Planteamiento del problema

La extensibilidad de la plasticidad de un factor de transcripción no es clara, al menos es aún una pregunta fundamental que en plantas no se ha esclarecido del todo. Esta plasticidad desde un nivel molecular transcripcional podría empezar a elucidarse al saber cuáles son sus genes respuesta dependiendo del órgano en el cual esté regulando o ejerciendo una función. Por otra parte, las hormonas juegan un papel importante en el desarrollo y, por su presencia o ausencia, pudiesen modificar esta regulación transcripcional. Por ello se plantearon las siguientes preguntas para el factor de transcripción SPATULA (SPT): primero, desde el aspecto general, *¿Tiene el factor de transcripción SPT plasticidad regulatoria?* Si es así, puede ser dependiendo del órgano que regule. *¿Serán los genes de respuesta a SPT diferentes en hojas e inflorescencias?* Ahora, también las hormonas influyen en esta plasticidad creando distintos microambientes. *¿Serán los genes de respuesta a SPT diferentes en presencia/ausencia de citocininas?* Estas preguntas son fundamentales y aún no son respondidas con claridad.

Justificación

Debido a que SPATULA es un factor de transcripción involucrado en el desarrollo de diferentes órganos vegetales, en especial en el desarrollo del gineceo y de las hojas. Por ende, es importante para la producción de semillas en *Arabidopsis*. Por ello, a futuro el entender su rol como factor de transcripción y saber molecularmente como ejerce una plasticidad regulatoria, podríamos modificar algunos de sus genes de respuesta homólogos en otras plantas con el fin de mejorar la producción de cultivos de interés agronómico.

Hipótesis

El factor de transcripción SPATULA de *Arabidopsis thaliana* tiene plasticidad regulatoria, la cual se verá reflejada en cambios en los niveles de expresión de sus genes de respuesta dependiendo del tipo de tejido o pre-tratamiento con una citocinina sintética (6-Benzilamino-purina, BAP).

Objetivo general

Identificar y cuantificar los genes de respuesta del factor de transcripción SPATULA en hojas e inflorescencias sin y con pre-tratamiento de BAP.

Objetivos específicos

1. Obtener transcriptomas de la inducción de SPATULA en hojas e inflorescencia sin y con pre-tratamiento de BAP.
2. Analizar los transcriptomas con el fin de identificar genes de respuesta al factor de transcripción SPATULA.

3. Seleccionar genes de respuesta a SPATULA de interés y verificar su expresión por qRT-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Siembra de plantas

Se sembraron aproximadamente 90 semillas por charola, siendo tres charolas por tratamiento en tierra estéril. Las charolas estuvieron en cuarto frío por 3 días y posteriormente se dejaron crecer en invernadero durante los meses de marzo y abril. Las plantas tuvieron una supervisión de riego sólo con agua y se aplicó fertilizante Miracle-Gro® Fertilizante Universal (1 cucharada/L) a las dos semanas después de haber estado en invernadero. Pasando tres semanas después de germinación para las hojas y 5 semanas para inflorescencia se procedió a la aplicación de los pre-tratamientos.

Pre-tratamientos

El tratamiento control (“no hormona”, NH) fue Vac-In StuffSilwet L-77, al 0.015% (v/v) en agua. Para el pre-tratamiento de citocininas se utilizó el 6-Benzil-aminopurina (BAP) de la marca DuchefaBiochemies, del cual se hizo una dilución al 100 μ M. Para ello, se preparó un stock de 100 mM en NaOH al 0.2 N y después se hizo la dilución al 100 μ M en agua y se añadió Silwet L-77 a una concentración final de 0.015%. Las aplicaciones

de BAP fueron dos veces cada 24 horas. En la Tabla 1 se muestra de forma general el diseño experimental.

Tabla 0 Diseño experimental

CONDICIONES	PRE-TRATAMIENTOS	
	No hormona (NH)	Citocinina (BAP)
35S::SPT::GR + 10 μ M Dexametasona	Silwet al 0.015% (v/v) en Agua	Citocinina (BAP) BAP al 100 μ M + Silwet al 0.015% (v/v) en agua.
35S::SPT::GR Dexametasona	Silwet al 0.015% (v/v) en agua.	BAP al 100 μ M + Silwet al 0.015% (v/v) en agua.
Silvestre (Col-0)	Silwet al 0.015% (v/v) en agua.	BAP al 100 μ M + Silwet al 0.015% (v/v) en agua.

Aplicación de tratamientos y recolección de muestra

Después de pasar 24 horas del segundo tratamiento de BAP, se hizo la inducción con dexametasona al 10 μ M. Cuatro horas después de la inducción se procedió a la toma de muestra: la inflorescencia principal de dos plantas independientes y tres hojas jóvenes de dos plantas independientes. La colecta de las muestras fue por triplicado de cada tratamiento. Además, las muestras de las plantas restantes se colectaron como resguardo. Después de haber sido colectada la muestra se guardaron a -80°C . La Fig. 5 muestra el diseño experimental de los pre-tratamientos y el tratamiento de inducción con dexametasona.

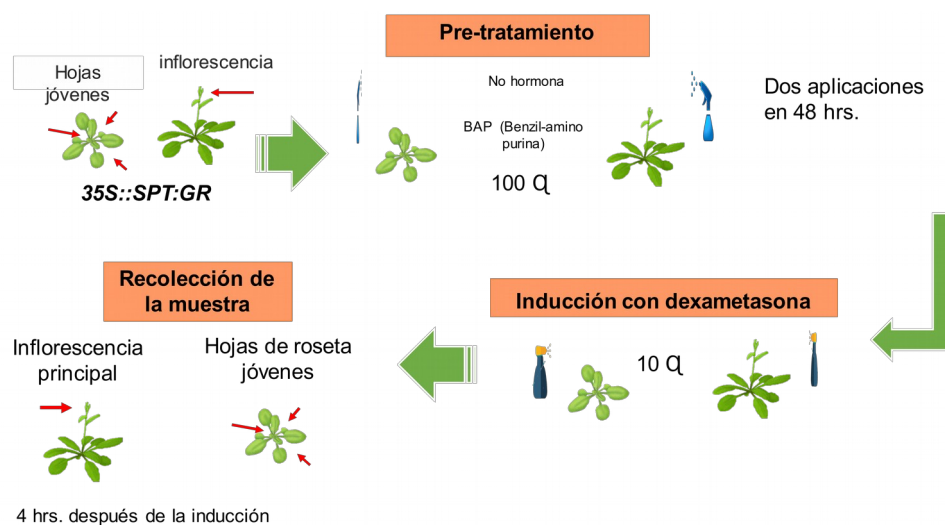


Fig. 0 Esquema general del experimento

Estrategia experimental

Las variables de la estrategia experimental se muestran en la Fig. 6, en la cual se observa la línea control *Columbia* (Col-0) y la línea inducible del factor de transcripción SPATULA (SPT) (*35S::SPT::GR*) en fondo silvestre, la línea se indujo con dexametasona (D) y como control sin haber sido inducida la línea (ND). Las muestras fueron dos tejidos: dos inflorescencias (I) y 6 hojas más jóvenes (L). Los tratamientos que se emplearon para cada una de las muestras fueron: como control positivo no hormona (NH), y pre-tratamiento de citocininas (BAP), con tres réplicas biológicas por tratamiento.

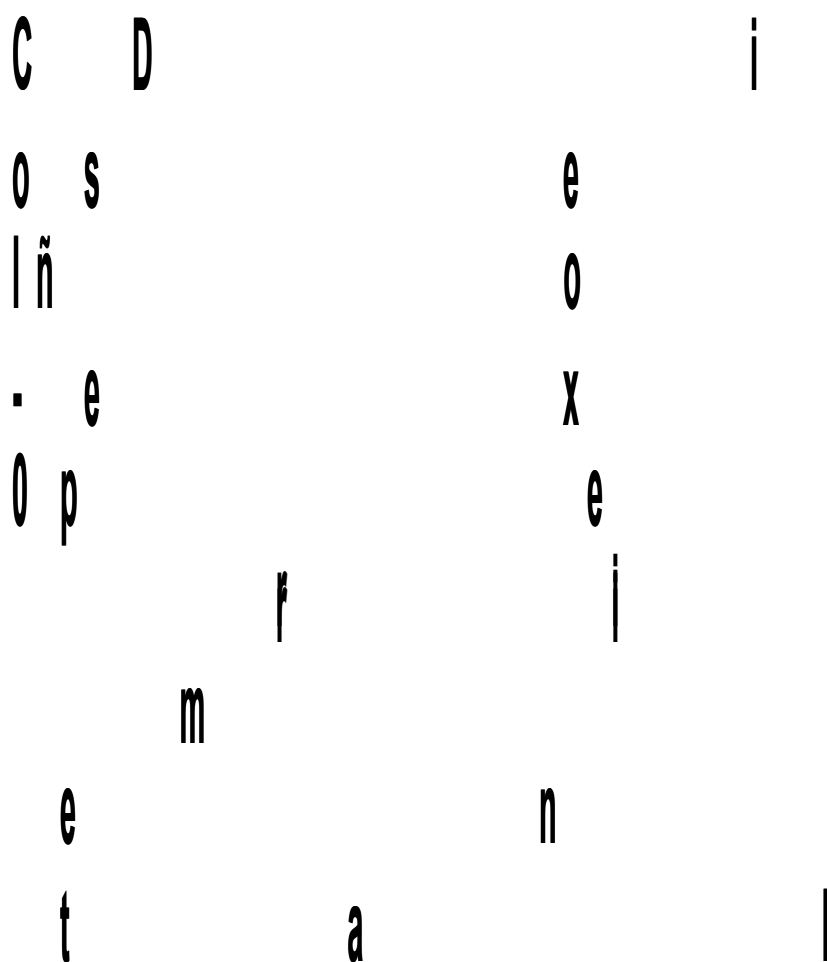


Fig. 0 Esquema de las variables del diseño experimental

Extracción y calidad de ARN total

Las muestras fueron trituradas en nitrógeno líquido y se procedió a la extracción de RNA con el kit OMEGA-BIOTEK E.Z.N.A Plant RNA (siguiendo el protocolo establecido). Una vez obtenido el suspendido de ARN en 50 µL en agua DEPC, las muestras se analizaron por espectrofotometría en un Nanodrop ND-1000 Thermo Fisher. Además, se analizó la integridad del ARN por electroforesis. Una vez confirmada la calidad de las muestras, se tomó el volumen de 3-5 µg de ARN siguiendo las siguientes indicaciones para el envío de muestras para secuenciación: se añadió 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH=5.5 a la disolución de ARN y se mezcló suavemente. Después se añadió 2 volúmenes de etanol al 100% a la disolución y se volvió a mezclar. Una vez obtenidas las muestras se enviaron a secuenciar y el resto se guardaron a -80°C como respaldo.

Secuenciación de muestras

La secuenciación y preparación de librerías fueron con el protocolo TruSeq 2.0. La secuenciación fue paired-end de 100 pb, con un secuenciador IlluminaHiSeq 4000. elaboradas en la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur.

Análisis de datos

Una vez obtenidos los archivos fastq de la secuenciación se procedió a verificar la calidad de las lecturas con el programa *FastQC*(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) de acuerdo con el parámetro \geq QC30 de cada transcrito por muestra. Una vez verificada la calidad de las lecturas obtenidas de la secuenciación, se procedió al alineamiento y cuantificación de los transcritos con el programa *kallisto*(*Bray et al., 2016*) haciendo un alineamiento contra los transcritos de *Arabidopsisthaliana* que se encuentran en el archivo Araport11 (<https://www.araport.org>).

Una vez obtenidos el alineamiento y la cuantificación se realizaron los contrastes con el paquete de *edgeR* siendo los contrastes: inducción vs no inducción (DvsND); como contrastes control: pre-tratamiento de BAP vs el control no hormona y la línea inducida

con pre-tratamiento con BAP vs la línea inducida sin pre-tratamiento de BAP (BAPvsNH) y la línea no inducible vs la línea silvestre sin inducción (NDvsWT).

Posteriormente, se realizó un análisis de los genes de respuesta de SPT de acuerdo con la base de datos de Gene Ontology (GO), representadas en un mapa de enriquecimiento (del inglés: enrichmentmap) (Mi et al., 2017). Esta red fue elaborada con los genes diferencialmente expresados que presentaban un $FDR \leq 0.05$ y con los parámetros de p-value cut-off de 0.001, Q-value cut-off de 0.05 y Jaccard Coefficient de 0.25 (Merico et al., 2010).

qRT-PCR

Para los genes de interés se les realizó una cuantificación con qRT-PCR usando el kit KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR LightCycler® 480, con el fin de verificar los datos transcriptómicos. La normalización de los datos fue con el gen *ACTINAS* (Ver Anexo 6).

Medición de área y conteo de tricomas

Se dejaron crecer las líneas Col-0, Ler, *35S::SPT*(en fondo Col-0), *35S::SPT*(en fondo Ler), *35S::SPT::HA*(en fondo Ler),, *spt-2* (en fondo Ler), y *spt-12* (en fondo Col-0), en charolas. Tuvieron una estratificación de frío por 3 días y después se colocaron en una cámara de incubación a 22°C de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 10 DDG para muestra de cotiledones y 20 DDG para hojas de roseta. Posteriormente se tomaron fotos de la 1er y 2da hoja de roseta en el estereoscopio Leica EZ4D.

Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa de ImageJ para el conteo de tricomas y medición del área. Se realizó el conteo de tricomas por área y un análisis de Tukey-HSD con un p-value de 0.05 en R.

Análisis microscópico de estomas

Se dejaron crecer las líneas Col-0, Ler, 35S::*SPT* (en fondo Col-0), 35S::*SPT* (en fondo Ler), 35S::*SPT*::*HA* (en fondo Ler), *spt-2* (en fondo Ler) y *spt-12* (en fondo Col-0), en charolas. Se dejaron en frío 3 días y después en cámara de incubación a 22°C de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 10 DDG. Se tomó la muestra de cotiledones, posteriormente se realizó un clareado con diluciones de etanol al 75%, 85%, 95% y 100% con una exposición de dos horas por cada dilución y se dejaron en una solución de Hoyer. Después, se observaron en microscopio NomarskiLeica DM4000 en función DIC, analizando la parte abaxial y adaxial del cotiledón en un campo de 20X (Fig. 7) y se hizo el conteo por campo. Los datos se analizaron con una prueba de Tukey-HSD con un p-value de 0.05 en R.

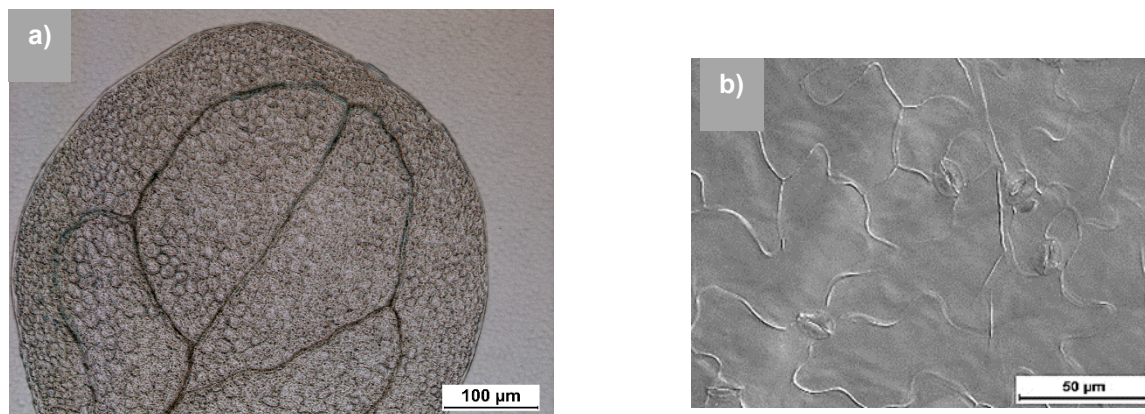


Fig. 5 Zona de conteo de estomas en un cotiledón

Cotiledón de *Arabidopsis thaliana* en microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). a) Parte superior del cotiledón en objetivo de 5X. Círculos negros muestran el campo utilizado para el conteo de estomas de la parte abaxial y adaxial del cotiledón. b) Fotografía de la parte adaxial del cotiledón en objetivo 20X. Las flechas señalan las estomas.

Acumulación antocianinas por inducción de sacarosa

Se utilizaron las líneas Col-0, Ler, 35S::*SPT* (en fondo Col-0), 35S::*SPT* (en fondo Ler), 35S::*SPT*::*HA*, *spt-2* (en fondo Ler) y *spt-12* (en fondo Col-0). Se dejaron en cuarto frío a 4°C por 3 días después se sembraron en placas con agar Murashige and Skoog (MS) a

un pH de 5.9, agar al 0.8% y sacarosa al 4% en cámara de incubación a 22°C de 16 horas de luz y 8 horas de obscuridad durante 6 días. Y se tomaron fotografías en estereoscopio Leica EZ4D para observar la acumulación de antocianinas.

RESULTADOS

Obtención de las muestras para la secuenciación masiva

Durante este trabajo estudiamos la plasticidad regulatoria del factor de transcripción *SPATULA* en dos tejidos de la planta de *Arabidopsis thaliana* (hoja e inflorescencia) y en ausencia o presencia de citocininas, para lo cual se realizó lo que se describe a continuación.

Código de identificación de muestras

Para un rápido etiquetado para la colecta y referencia para la secuenciación, además de llevar un orden adecuado, se elaboró el siguiente código en las muestras: primero se anotó la línea Columbia-0 (COL) o la línea sobre-expresante *35S::SPT:GR* (SPT), seguido del tipo de tejido sea hoja (L) o inflorescencia (I), después, tratamiento control “no hormona” (NH) o pre-tratamiento de citocininas (BAP), seguido de (D) si la línea fue

inducida con dexametasona o (ND) si no se aplicó dexametasona. Para referirnos a las 3 réplicas biológicas se utilizó R1, R2 y R3. A continuación muestro el siguiente ejemplo: COL_I_BAP_ND_R1 indica línea Col-0, muestra de tejido inflorescencia, con pre-tratamiento de BAP sin haber aplicado dexametasona y es la réplica biológica 1.

Siembra en invernadero

La siembra fue en charolas largas, con una distribución adecuada para el correcto crecimiento, la siembra fue en el mes de marzo y la colecta a finales de abril de ambas muestras para que el acondicionamiento ambiental del invernadero fuese el mismo. Las hojas fueron colectadas 15 días después de germinación (DDG) y las muestras de inflorescencia de 30 DDG (Fig. 8).



Fig. 6 Fotografía de colecta de muestras en el invernadero

La siembra y acomodo de las charolas se hizo de manera cuidadosa para no mezclar muestras ni tratamientos. Además, se separaron por tratamiento, para que no hubiese un flujo de BAP y/o dexametasona entre las diferentes muestras.

Obtención de muestras de ARN de buena calidad necesarios para la secuenciación masiva.

Este trabajo contribuyó a la obtención de muestras de cuatro factores de transcripción (AG, NTT, SPT y BOL), entre los cuales se encuentra SPT, con el fin de estudiar la plasticidad transcripcional. Para ello, este proyecto pretende estudiar desde la

plasticidad de diferentes niveles moleculares, apoyándose de datos estudios transcriptómicos, proteómica y de conformación de cromatina. En lo cual este proyecto apoyó a la obtención de muestras para análisis transcriptómico. En resumen, para cada factor de transcripción, se realizó una inducción de la función del factor de transcripción (FT). Primeramente, las plantas recibieron durante dos días un tratamiento de una hormona (citocinina o auxina), que llamamos aquí un pre-tratamiento y posteriormente se hizo la inducción del FT. Esta manera de aplicar antes un pre-tratamiento de hormonas se hizo esto con la idea que este podría alterar por ejemplo el estado de la cromatina y así la capacidad de regulación del factor de transcripción. En los materiales y métodos el procedimiento está descrito en detalle, pero como muestras control para el pre-tratamiento con hormona, fueron las líneas sin hormona. Los controles para las líneas inducidas con dexametasona (o β -estradiol en el caso de BOL) fueron las líneas sin inducir. Por otra parte, se tuvieron como otro tipo de control, las líneas silvestres Col-0 y Ler. Al final, las muestras colectadas fueron hojas e inflorescencias.

Todas las muestras fueron por triplicado y las concentraciones de los pre-tratamientos de BAP y AUX fueron al 100 μ M y se hicieron dos aplicaciones en 48 horas. Posteriormente, se hizo la inducción con dexametasona al 10 μ M y cuatro horas después se hizo la colecta de las muestras. Sumando todas las variables son 180 muestras en total (Fig. 9). Nota, en esta tesis no se discuten los resultados obtenidos con la aplicación de auxina, porque no se vi mucho efecto en relación con SPT. Tampoco se discuten los resultados de los otras tres factores de transcripción (AG, NTT y BOL).

E
S
T
R
A
D
O
R
E
N
A
B
N
D
E
A
A
N
A
S
C
R
I
P
O
N
E
S
T
R
A
D
O
R
E
N
A
B
N
D
E
A
A
N
A
S
C
R
I
P
O
N
E

Fig. 7 Esquema general del proyecto de plasticidad transcripcional

El esquema muestra el proyecto general de la obtención de las 180 muestras. Se observa el estudio de 4 FTs: AG, NTT,SPT y BOL, en muestras de hoja e inflorescencia. Posteriormente se realizó pre-tratamiento de BAP o AIA y el control es no hormona, y la inducción o no inducción del FT, cada muestra es por triplicado y aparte un control de las líneas silvestres Col-0 y Ler, con y sin pre-tratamiento de BAP o AIA.

Una vez obtenidas las muestras de tejido vegetal, se hizo la extracción de ARN utilizando el kit OMEGA-BIOTEK, E.Z.N.A Plant RNA. Posteriormente se verificó la calidad del ARN mediante espectrofotometría haciendo uso de un aparato nanodrop. En la Tabla 2 se muestra el resumen de los resultados obtenidos de los parámetros de absorbancias 260/280 y 260/230.

Tabla 1 Resumen de resultados de calidad de RNA medidos en nanodrop

No. De muestras	µg de RNA total / muestra	Absorbancias	
		260/280	260/230
180	10-20	1.8-2.2	1.8-2.2

Las 180 muestras oscilaron entre 1.8 y 2.2 en ambos parámetros de absorbancias (260/280 y 260/230) cuyo valor indica que el ARN es puro y no hay contaminación de proteínas o alguna sustancia utilizada en la extracción. Además, se observó la integridad del ARN en electroforesis (Anexo 2), en la cual se observa una buena integridad del ARN con las respectivas bandas del 28S y 18S, asegurándonos de que no había degradación de la muestra, ni contaminación con ADN. Posteriormente se resguardaron las muestras a -80°C hasta el envío para la secuenciación.

Análisis de datos de secuenciación masiva

Calidad de los transcritos obtenidos de la secuenciación

Las muestras de ARN fueron enviadas por paquetería para su secuenciación a la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur. Se generó librerías con TruSeq RNA Library Kit versión 2.0 y se secuenció todas las 180 muestras en cuatro carriles en un secuenciador IlluminaHiSeq 4000. Después recibiendo las lecturas, lo primero que se hizo fue analizar la calidad de las lecturas de las 180 muestras con el programa FastQC.

Los fragmentos obtenidos por la secuenciación fueron “paired-end” de 100 pb y se obtuvieron entre 14 a 15 millones de lecturas por muestra. El análisis arrojó que entre el 93% y el 95% de las lecturas tienen un valor de \geq QC30 (del inglés: % Quality

control) (Tabla 3). Dicho valor indica que las lecturas son de muy buena calidad. Este resultado nos dio la pauta para seguir con el alineamiento de las lecturas a los transcritos de *Arabidopsisthaliana*.

Tabla 2 Resumen de calidad de lecturas por el programa FastQC

Numero de muestras	Tipo de fragmentos	Número de lecturas por muestra	%QC30
180	Paired-end 100 pb	14M-15M	93-95

NOTA: El parámetro %QC30 indica la probabilidad de haber nombrado incorrectamente 1 base cada 1000 durante la secuenciación, lo que indica un 99.99% de precisión de haber sido anotada una base.

Alineamiento de lecturas a los transcritos de *Arabidopsisthaliana*

Una vez evaluada la calidad de las lecturas, estas se alinearon con el programa *kallisto* a los transcritos de *Arabidopsisthaliana* de la lista del archivo Araport11, en la Tabla 4 se muestra el resumen del alineamiento de las 180 muestras. De los 5 millones a 10 millones de total de pares de lectura por muestra se obtuvo un alineamiento de 94%-98% a los transcritos de *Arabidopsisthaliana*, lo cual nos indica un buen porcentaje de alineamiento necesario para continuar con el análisis de los datos.

Tabla 3 Resultado del alineamiento de las lecturas con el programa Kallisto

Muestras	Total de pares de lectura/muestra	% de alineamiento /muestra
180	5M-10M	94-98

Contraste “Escape de la línea”

Para la obtención de los datos transcriptómicos se utilizó una línea sobre-expresante (35S::*SPT:GR*) en fondo Col-0. Uno de los controles empleados en este proyecto, es el saber si la construcción de línea sobre-expresante tuviese un efecto en nuestros análisis, que le confieran falsos positivos a nuestros análisis por la construcción utilizada, y no por la inducción de SPT.

Al efecto que pudiese tener la línea lo denominamos “escape de la línea”, y para ello hicimos el contraste de la línea sobre-expresante sin pre-tratamiento de BAP y sin hacer la inducción de SPT con dexametasona comprándola con la silvestre (35S::SPT::GR_NH_ND vs Col_NH_ND). El análisis se hizo para los tejidos de hoja e inflorescencia.

Los resultados muestran que la línea tiene si tiene un escape. Y se observó que 18 genes respondieron en hoja (12 inducidos y 6 reprimidos) y 110 genes en inflorescencia 68 inducidos y 42 reprimidos (Fig. 10). Para saber si estos genes son genes de respuesta a SPT, se prosiguió a realizar los contrastes de la inducción de SPT vs la no inducción de SPT para la obtención de los genes de respuesta de SPT y verificar las listas de los genes diferencialmente expresados.

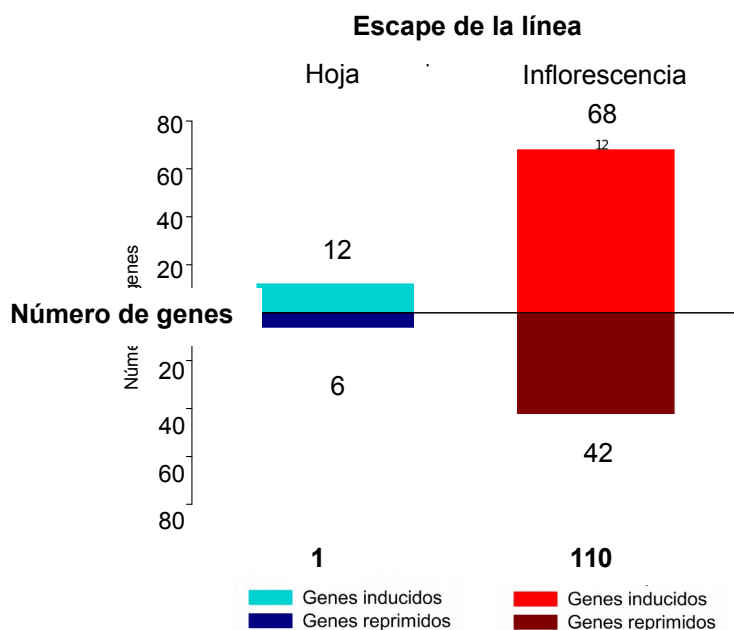


Fig. 8 Escape de la línea 35S::SPT:GR

Gráfico del número de genes del escape de la línea 35S::SPT:GR en hoja e inflorescencia. Número de genes expresados diferencialmente con un false discovery rate, $FDR \leq 0.05$ calculado en el programa de edgeR. Un $FDR \leq 0.05$ nos indica que los genes diferencialmente expresados tienen un $\geq 95\%$ de confianza que el gen es diferencialmente expresado. Los datos referentes a hoja se muestran en la barra de color azul y los datos referentes a la muestra de inflorescencia son la barra de color rojo. Los

genes inducidos gráficamente se representan por arriba del eje x, y los genes reprimidos por debajo del eje x. Los números en negritas por debajo de cada barra representa el total de genes de cada contraste.

*Contraste en edgeR: **Col-0_ND vs 35S::SPT:GR_ND**

Genes de respuesta a SPT

Para saber cuáles son los genes de respuesta a SPT se realizaron diferentes comparaciones entre la línea sobre-expresante con/sin pre-tratamiento de BAP siendo inducida con dexametasona contra el control, que es la línea sobre-expresante con/sin pre-tratamiento de BAP sin haber sido inducida con dexametasona. En la Tabla 5 se muestran los contrastes utilizados dependiendo de la variable.

Tabla 4 Contrastes para identificar genes de respuesta a SPT

Tejido	Pre-tratamiento	Contraste	Información que se obtiene del contraste
Hoja	No pre-tratamiento	35S::SPT_L_NH_D vs_35S::SPT_L_NH_ND	Genes de respuesta de SPT en hoja
Inflorescencia	No pre-tratamiento	35S::SPT_I_NH_D vs_35S::SPT_I_NH_ND	Genes de respuesta de SPT en inflorescencia
Hoja	Pre-tratamiento de BAP	35S::SPT_L_BAP_D vs_35S::SPT_L_BAP_ND	Genes de respuesta de SPT cuando hay pre-tratamiento de BAP en hoja.
Inflorescencia	Pre-tratamiento de BAP	35S::SPT_I_BAP_D vs_35S::SPT_I_BAP_ND	Genes de respuesta de SPT cuando hay pre-tratamiento de BAP en inflorescencia.

NOTA: El código de los contrastes son los siguientes:

*Tejido: L: hoja, I: inflorescencia

** Pre-tratamiento: NH: no hormona, BAP: pre-tratamiento con BAP al 100 μM .

*** Línea inducida con dexametasona: D, línea no inducida con dexametasona: ND.

El resultado de los contrastes muestra que los genes de respuesta a SPT en hoja son 3199 en total, de los cuales 1932 genes son inducidos y 1267 genes de respuesta son

reprimidos. Cuando la muestra se sometió a un pre-tratamiento de BAP los genes de respuesta disminuyen drásticamente, ya que en esta condición sólo se identificaron 264, de los cuales 97 son genes de respuesta inducidos y 167 genes de respuesta reprimidos (Fig. 11a).

Por otra parte, los genes de respuesta de SPT en inflorescencia son en total 207, de los cuales 54 genes son inducidos y 153 genes son reprimidos (Fig. 11b). En las muestras sometidas a un pre-tratamiento de BAP se identificaron 114 genes de respuesta en total, de los cuales 12 genes son inducidos y 101 genes son reprimidos.

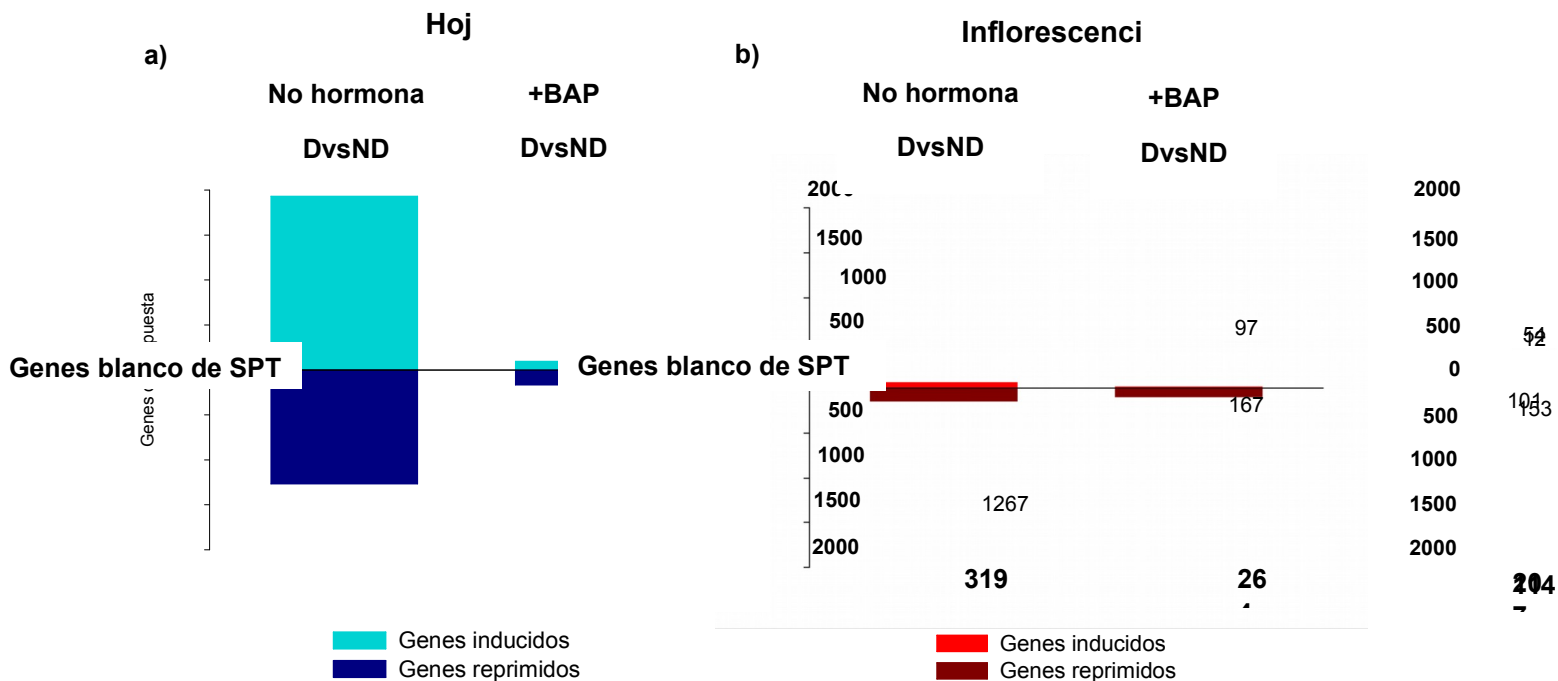


Fig. 9 El número de genes de respuesta a SPT disminuye bajo un pre-tratamiento de BAP

Número de genes de respuesta a SPT sin tratamiento de hormona y con pre-tratamiento de BAP en hoja e inflorescencia. El número de genes de respuesta corresponde a genes expresados diferencialmente *false discovery rate*, $FDR \leq 0.05$ calculado en el programa de *edgeR*. Un $FDR \leq 0.05$ nos indica que los genes diferencialmente expresados tienen un $\geq 95\%$ de confianza que el gen es diferencialmente expresado. a) Gráfico de genes de respuesta a SPT en hoja. b) Gráfico de genes de respuesta a SPT en

inflorescencia. Los números en negritas debajo de cada barra representa el número total de genes blanco de SPT.

*NH: control sin pre-tratamiento de BAP.

**+BAP: pre-tratamiento de BAP.

***DvsND: contraste de la línea 35S::*SPT:GR* inducida(D) vs la línea 35S::*SPT:GR* no inducida (ND).

Estos resultados sugieren que SPT tiene una plasticidad regulatoria tejido-dependiente, ya que en hoja se identificaron miles de genes de respuesta a SPT mientras que en inflorescencia solo unos cientos. Además, en ambas muestras los genes de respuesta disminuyen al momento de ser pre-tratadas con BAP, este efecto se observó drásticamente en la hoja. Estos resultados nos sugieren que la regulación por SPT se ve modificada ante un pre-tratamiento de BAP, por lo tanto, SPT tiene una plasticidad regulatoria condición-específica que depende de las citocininas.

Sin embargo, para saber cuáles de estos genes de respuesta son exclusivos de cada contraste, se realizó un gráfico con UpSet en R (Fig.12). En este gráfico se observa que, de los 3199 genes de respuesta a SPT en hoja, 3079 genes son exclusivos del tejido de hoja y 213 genes son exclusivos cuando se aplica BAP. Además, sólo 39 genes de respuesta se comparten entre ambos contrastes.

Mientras que en inflorescencia de los 207 genes de respuesta totales, 131 genes son exclusivos de inflorescencia y 55 genes son regulados sólo cuando se aplica el pre-tratamiento de BAP. Entre ambos contrastes solo se comparten 18 genes de respuesta.

Por otra parte, solo 44 genes de respuesta se comparten entre ambos tejidos sin haber tenido algún pre-tratamiento. Además, tomando en cuenta la influencia del pre-tratamiento de BAP en ambos tejidos, solo se comparten tres genes de respuesta. Estos resultados nos sugieren que la plasticidad regulatoria de SPT es dependiente del tejido y de las citocininas.

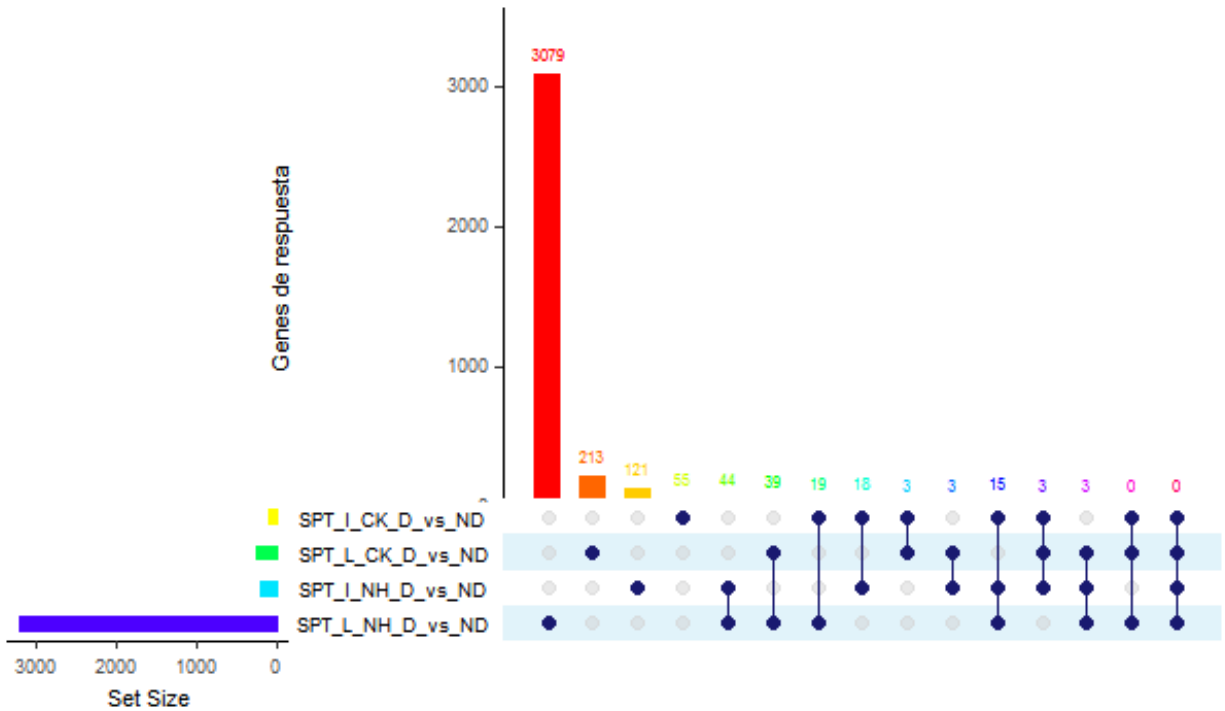


Fig. 10 Gráfico del tipo UpSet de interacciones entre los contrastes de los genes de respuesta a SPT

Genes de respuesta entre los distintos tejidos y con pre-tratamiento de BAP e intersecciones de los genes en común entre las listas de genes de respuesta de cada tratamiento. El diagrama UpSet muestra el número de genes de respuesta a SPT diferencialmente expresados con $FDR \leq 0.05$ entre la condición en hoja sin hormona (SPT_L_NH_D_VS_ND), pre-tratamiento de BAP en hoja (SPT_L_CK_D_VS_ND), genes de respuesta del tejido de inflorescencia sin hormona (SPT_I_NH_D_vs_ND) y en inflorescencia con pre-tratamiento de BAP (SPT_I_CK_D_vs_ND). En el eje y son el número de genes de respuesta. El set size representa el tamaño total de los genes de respuesta a SPT en cada condición. Los puntos azules de la matriz inferior representan las intersecciones entre las condiciones de los genes en común de cada tratamiento. Los números sobre cada barra representan el número de genes de respuesta de cada condición.

Genes de respuesta a BAP

Con el fin de identificar aquellos genes que son de respuesta a BAP en ambos tejidos, se realizó el contraste de la línea sobre-expresante con pre-tratamiento de BAP contra la línea sobre-expresante sin pre-tratamiento de BAP sin inducción de SPT en hoja (35S::SPT_L_BAP_ND vs 35S::SPT_L_NH_ND) e inflorescencia (35S::SPT_I_BAP_ND vs 35S::SPT_I_NH_ND) y con la inducción de SPT en hoja

(35S::SPT_L_BAP_D vs 35S::SPT_L_NH_D) e inflorescencia (35S::SPT_I_BAP_D vs 35S::SPT_I_NH_D).

El análisis mostró que en hoja los genes de respuesta a BAP cuando la línea 35S::SPT:GR no fue inducida con dexametasona fueron 6623, de los cuales 3624 genes fueron inducidos y 2999 genes reprimidos (Fig. 13a). Sin embargo, en el mismo tejido, los genes de respuesta a BAP disminuyen drásticamente a 212 genes, cuando la línea 35S::SPT:GR fue inducida con dexametasona, de los cuales 127 genes fueron inducidos y 85 genes reprimidos (Fig. 13a). Este mismo efecto de disminución de la respuesta a BAP dependiente de la inducción de SPT por dexametasona también se observó en inflorescencia. Cuando la línea 35S::SPT:GR no fue inducida con dexametasona los genes de respuesta a BAP fueron 6268, de los cuales 3130 genes fueron inducidos y 3138 genes reprimidos. Cuando la línea 35S::SPT:GR fue inducida con dexametasona los genes de respuesta a BAP disminuyeron a 5161 genes, de los cuales 2451 genes fueron inducidos y 2710 genes reprimidos (Fig. 13b). Estos resultados nos sugieren que la inducción de SPT afecta negativamente la respuesta a BAP en ambos tejidos.

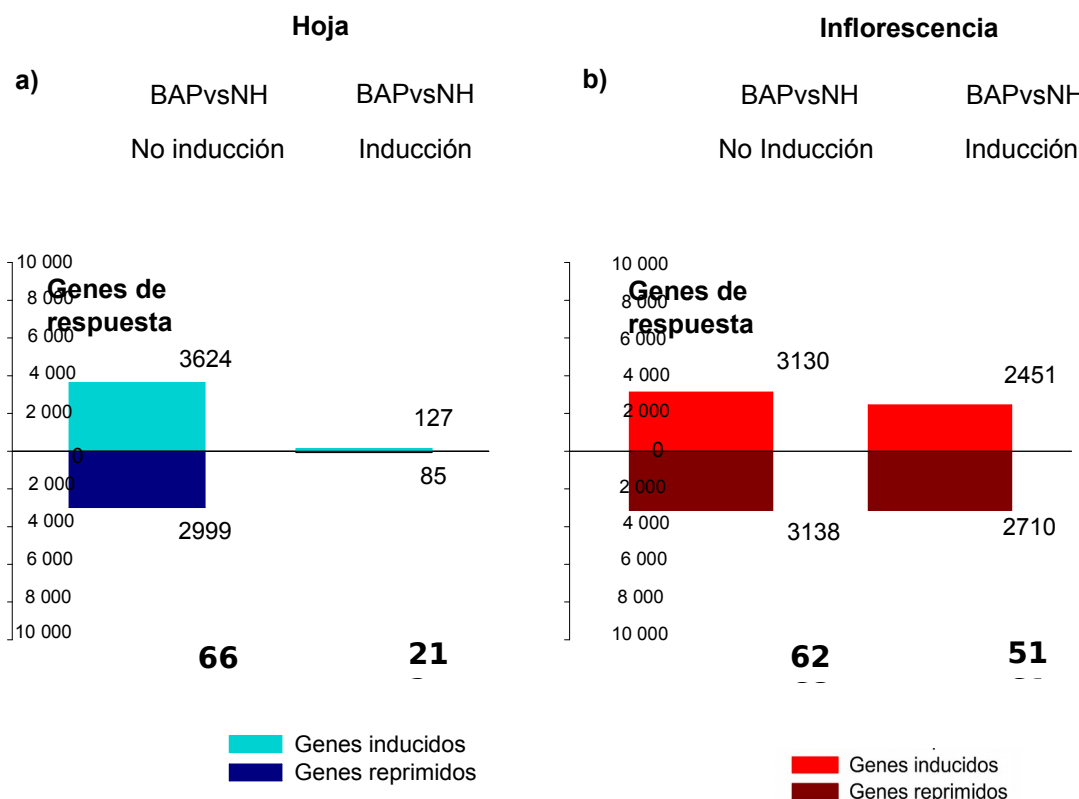


Fig. 11 La inducción de SPT influye en los genes de respuesta a BAP

Número de genes de respuesta a BAP bajo la no inducción e inducción de SPT. El número de genes de respuesta corresponde a genes expresados diferencialmente con false discoveryrate, $FDR \leq 0.05$ calculado en el programa de edgeR. Un $FDR \leq 0.05$ nos indica que los genes diferencialmente expresados tienen un $\geq 95\%$ de confianza que el gen es diferencialmente expresado.

Sin embargo, con el fin de saber cuáles genes son los que responden a BAP en común entre las condiciones se elaboró un UpSet (Fig.14). Se observa que de los 6623 genes que responden a BAP, tomando como muestras aquellas plantas que se no se hizo una inducción posterior de SPT, son 4119 genes que responden a BAP en esta condición. Cuando se tomaron las muestras a las que se le indujo SPT, son 56 genes que responden a BAP específicos de este contraste y los genes en común son 28 genes que responden a BAP en ambas condiciones. Por otra parte, los genes que responden a BAP en inflorescencia tomando como muestra aquellas que no se indujo SPT, de los 6268 genes en total, específicamente solo 1669 genes que responden a BAP en este contraste, mientras que cuando se toman como muestras aquellas plantas que se indujo SPT son 952 genes que responden a BAP. Y entre ambas condiciones son 2443 genes que responden a BAP. Los genes que responden a BAP en común en ambos tejidos tomando las muestras sin inducir a SPT son 744 genes, mientras cuando se toma de muestra en las que se indujo SPT son solo 7 genes de respuesta a BAP en común entre hoja e inflorescencia.

Estos datos nos sugieren, una posible afectación en la respuesta a BAP en las muestras de inducción de SPT. Y este efecto se ve drásticamente en hoja, aunque en ambos órganos se ve el efecto de la disminución de los genes que responden a BAP. Por parte, aunque los genes de respuesta a BAP son tejido-especifico, los 744 genes que responden a BAP en ambos tejidos nos sugiere una regulación conservada en ambos tejidos.

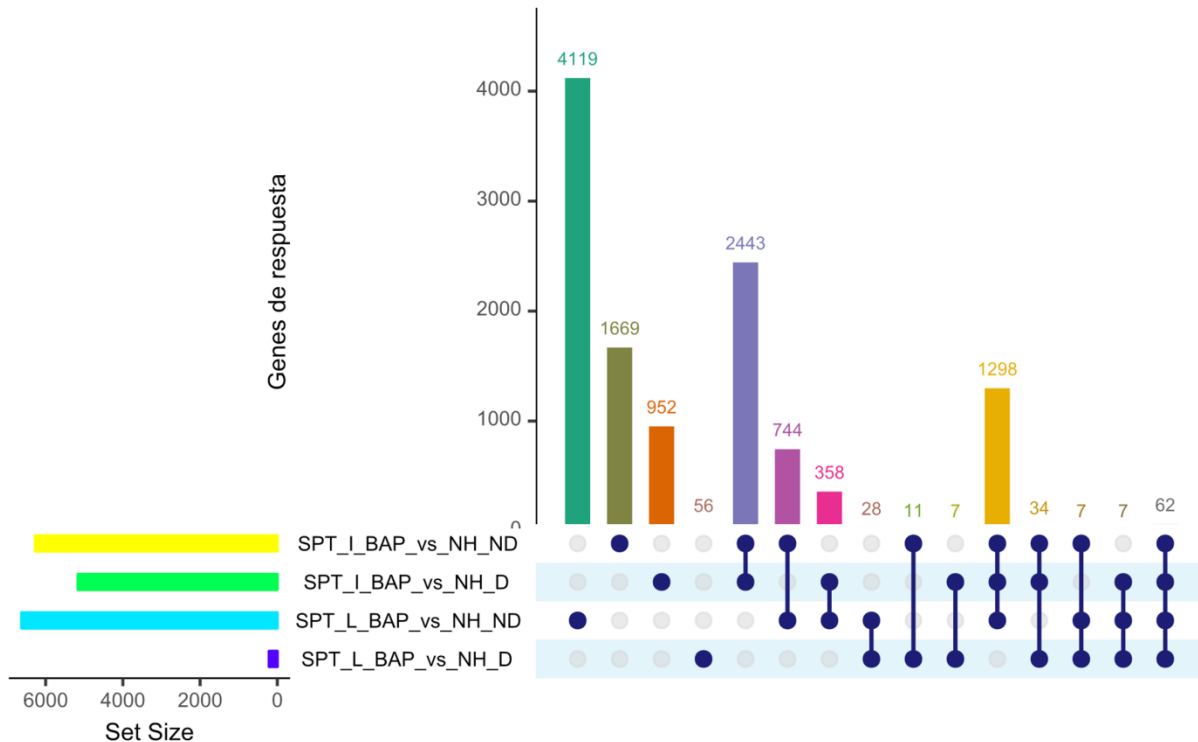


Fig. 12 Gráfico del tipo UpSet de interacciones entre los contrastes de los genes de respuesta a BAP bajo la no inducción e inducción de SPT

Genes de respuesta a BAP e intersecciones de los genes en común entre las listas de genes de respuesta de cada tratamiento. El diagrama UpSet muestra el número de genes de respuesta a BAP diferencialmente expresados con $FDR \leq 0.05$ entre la condición en hoja: teniendo como muestra aquellas líneas que no se indujo SPT (SPT_L_BAP_vs_NH_ND) y genes de respuesta a BAP teniendo como muestra aquellas líneas que se les hizo la inducción de SPT después del pre-tratamiento de BAP (SPT_L_BAP_vs_NH_D), genes de respuesta del tejido de inflorescencia; teniendo como muestra aquellas líneas que no se indujo SPT(SPT_I_BAP_vs_NH_ND) y genes de respuesta a BAP teniendo como muestra aquellas líneas que se les hizo la inducción de SPT después del pre-tratamiento de BAP (SPT_I_BAP_vs_NH_D). En el eje y son el número de genes de respuesta. El set size representa el tamaño total de los genes de respuesta a SPT en cada condición. Los puntos azules de la matriz inferior representan las intersecciones entre las condiciones de los genes en común de cada tratamiento. Los números sobre cada barra representan el número de genes de respuesta de cada condición.

Categorización de los genes de respuesta a SPT en inflorescencia.

Una vez obtenidos los genes de respuesta a SPT en inflorescencia, se procedió a realizar una categorización de acuerdo con la función molecular asignada a los genes de respuesta a SPT. Para ello se utilizó un mapa de enriquecimiento (del inglés: enrichmentmap), con base en la categorización de GO (del inglés: Gene Ontology). En la Fig. 15, los nodos de la red representan las categorías GO, cada categoría esta

mapeada al número de genes de respuesta inducidos y reprimidos de cada categoría (color verde o rojo respectivamente). El tamaño del nodo es de acuerdo con el número de genes de respuesta que enriquecen esa categoría, mientras que el grosor de las líneas representa cuantos genes se comparten entre categorías.

En la red se observan algunas funciones biológicas ya descritas para SPT (cuadros negros), como la respuesta a estímulos de luz (Reymond et al., 2012), la regulación de la germinación y la respuesta a la estratificación de frío en semillas (Penfield et al., 2005; Sidaway-Lee et al., 2010; Vaistij et al., 2013), corroborando los datos transcriptómicos. Una gran parte de las funciones biológicas de los genes de respuesta a SPT, son de biosíntesis de compuestos orgánicos, estrés y metabolismo, funciones aun no exploradas para SPT (Fig. 15).

Además, en cuanto a hormonas podemos observar la respuesta a auxinas y su transporte como categorías destacadas de los genes de respuesta a SPT. La relación entre SPT y las auxinas ya ha sido explorada en el laboratorio (Reyes-Olalde et al., 2017b; Reyes-Olalde et al., 2017a), corroborando la participación de SPT en la respuesta y el transporte de auxinas.

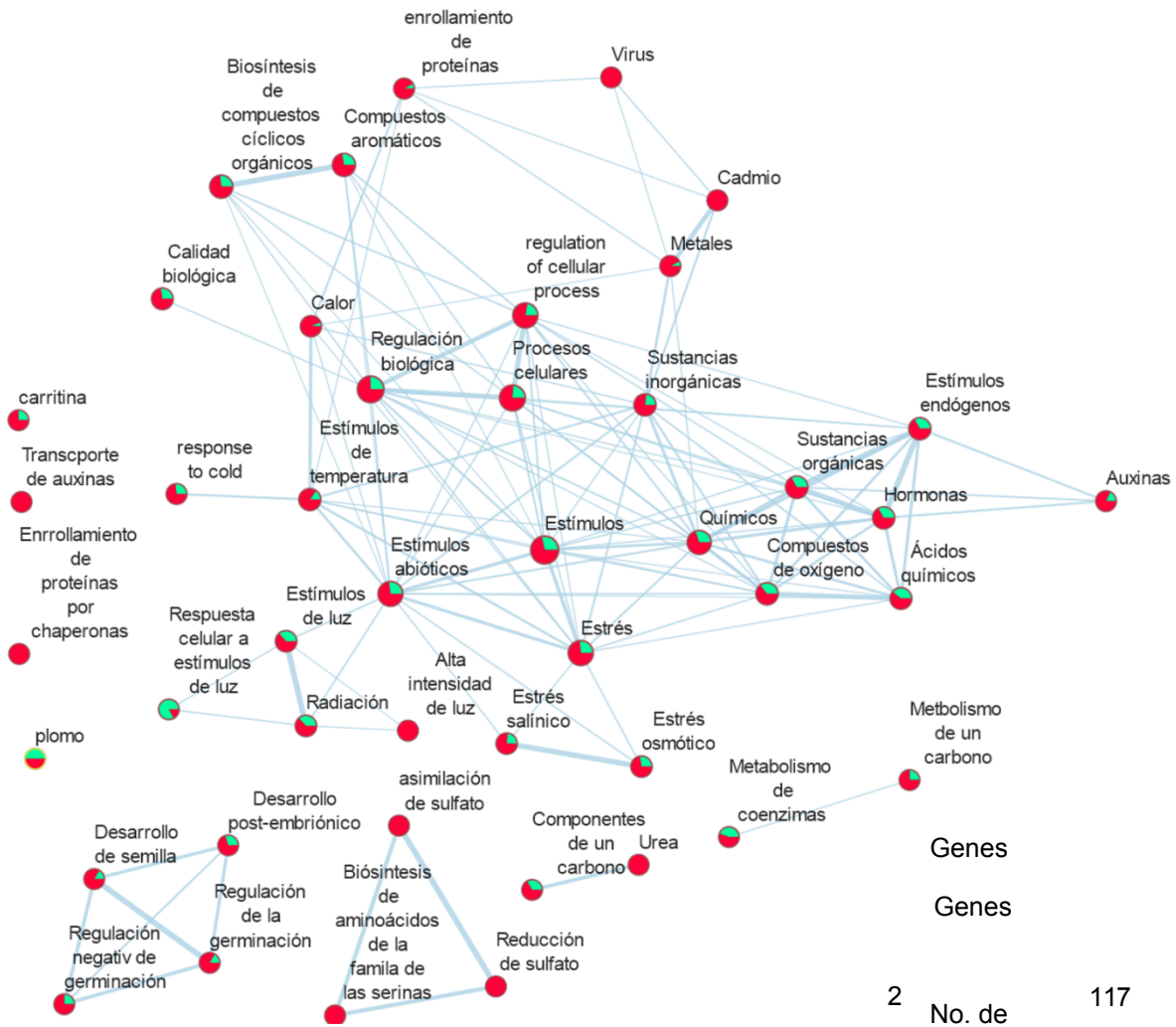


Fig. 13 Genes de respuesta a SPT en inflorescencia.

Red de categorización GO por función biológica. Los nodos representan las categorías que fueron enriquecidas de acuerdo con los genes de respuesta a SPT. En cada uno de los nodos se observa la proporción de genes inducidos (verde) y genes reprimidos (rojo) que enriquecen cada categoría. El tamaño del nodo va de acuerdo con el número de genes que enriquecen la categoría. Las líneas que interceptan cada categoría representan el número de genes que comparten las categorías entre ellas, eso quiere decir, una línea con un mayor grosor comparte más número de genes entre las categorías. Los cuadrados negros representan funciones biológicas de SPT ya reportadas.

Por otra parte, cuando se realizó un pre-tratamiento de BAP en inflorescencia, SPT parece comportarse como represor, ya que la mayoría de los genes que enriquecen a las categorías de GO, son genes reprimidos. Los genes de respuesta que enriquecen estas categorías son en total 12 genes inducidos y 101 reprimidos. Además, ciertas categorías enriquecidas cambian a biosíntesis de ARN, transcripción del ADN, expresión génica, etc (Fig. 16). Aunque, otra categorías como las relacionadas con el

metabolismo, la respuesta a estrés y la regulación del transporte de auxinas se mantienen. Esto último nos sugiere un cross-talk entre auxinas, citocininas y *SPT*, un tema que también ha sido corroborado por investigaciones en el laboratorio (Reyes-Olalde et al., 2017b; Reyes-Olalde et al., 2017a).

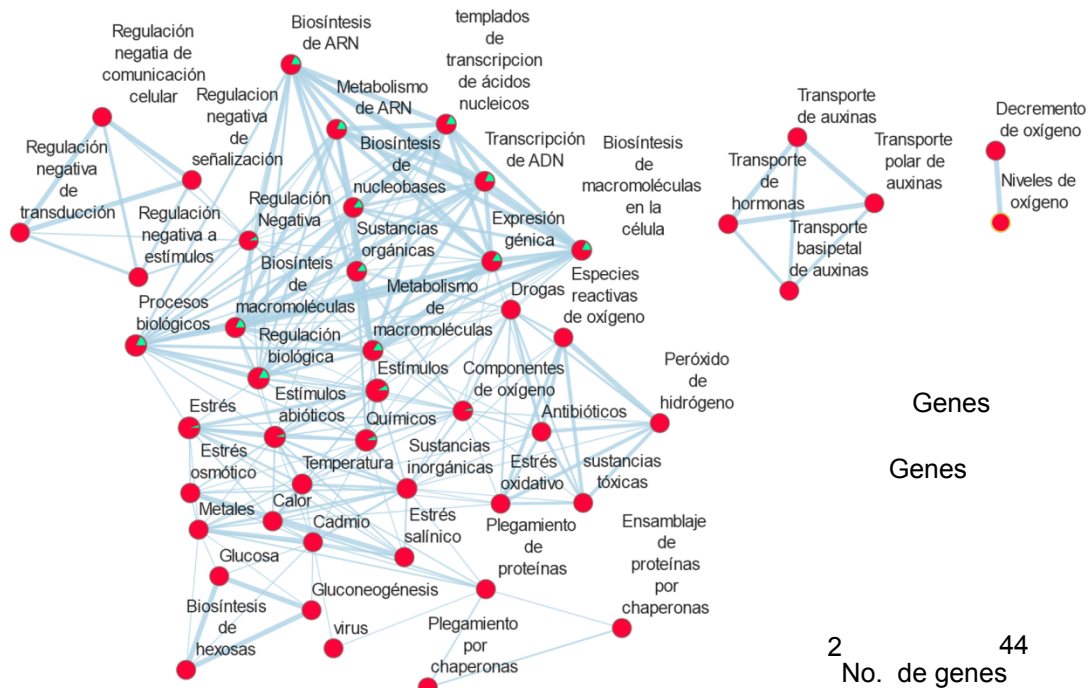


Fig. 14 Enrichment map de genes de respuesta a SPT con pre-tratamiento de BAP

Red de categorización GO por función biológica. Los nodos representan las categorías que fueron enriquecidas de acuerdo con los genes de respuesta a SPT al tener un pre-tratamiento de BAP. En cada uno de los nodos se observa la proporción de genes inducidos (verde) y genes reprimidos (rojo) que enriquecen cada categoría. El tamaño del nodo va de acuerdo con el número de genes que enriquecen la categoría. Las líneas que interceptan cada categoría representan el número de genes que comparten las categorías entre ellas, eso quiere decir, una línea con un mayor grosor comparte más número de genes entre las categorías.

Ambas redes nos sugieren que SPT ejerce diferentes funciones y la mayoría de ellas no han sido exploradas. Sin embargo parte de nuestros datos son comprobables con la literatura ya reportada, lo que nos da certeza de nuestro trabajo. Por otra parte, se puede observar la plasticidad de SPT en la función biológica que ejerce dependiendo del microambiente en el que se encuentre. Además, SPT podría ejercer otras funciones o la misma función biológica, pero regulando a diferentes genes de respuesta dependiendo del tejido.

Categorización de los genes de respuesta a SPT en hoja

Los estudios de SPT se han orientado a tejidos como la inflorescencia, germinación de semillas y hoja, sin embargo aunque el fenotipo de SPT en *Arabidopsis* y su patrón de expresión ya se han descrito detalladamente (Alvarez & Smyth, 1999; Groszmann et al., 2010; Ichihashi et al., 2010; Makkena & Lamb, 2013), alguna función en la diferenciación celular de la hoja no se ha sido reportada. Por ello, el trabajo se ha enfocado en dar respuesta a la pregunta: *¿Qué hace realmente SPT en hoja?*

Por otra parte, varias funciones ya descritas de SPT se confirman en nuestros datos transcriptómicos y en los mapas de enriquecimiento, así como genes blanco de SPT son datos ya reportados, sugiriendo que el trabajo fue satisfactorio. La continuación de este trabajo se enfocó en la función de SPT en hoja.

Con el fin de saber la función biológica asignada por GO de los genes de respuesta a SPT en hoja se realizó un mapa de enriquecimiento. El análisis mostró un amplio grupo de categorías de rutas metabólicas y de respuesta a estrés, lo cual no ha sido explorado para *SPT* y podría ser interesante en estudios futuros. Por otra parte, se observó la categoría de desarrollo de hoja, así como la categoría de respuesta a citocininas, antocianinas, funciones de transporte, etc (Fig. 17). Lo anterior nos dan una idea general de las funciones que SPT puede estar realizando en hoja.

Esta misma categorización se realizó para los genes de respuesta a SPT cuando hay un pre-tratamiento de BAP. La mayoría de los genes que enriquecen a las categorías son reprimidos. En hoja, al igual que en inflorescencia, aparecen categorías relacionadas con auxinas, esto sugiere que el cross-talk entre auxinas, citocininas y SPT que se ha demostrado que existe en gineceo, podría estar sucediendo también en hoja. Las categorías de defensa y respuesta inmune también se comparten en ambos tejidos pero los genes que las conforman son diferentes (Fig. 18).

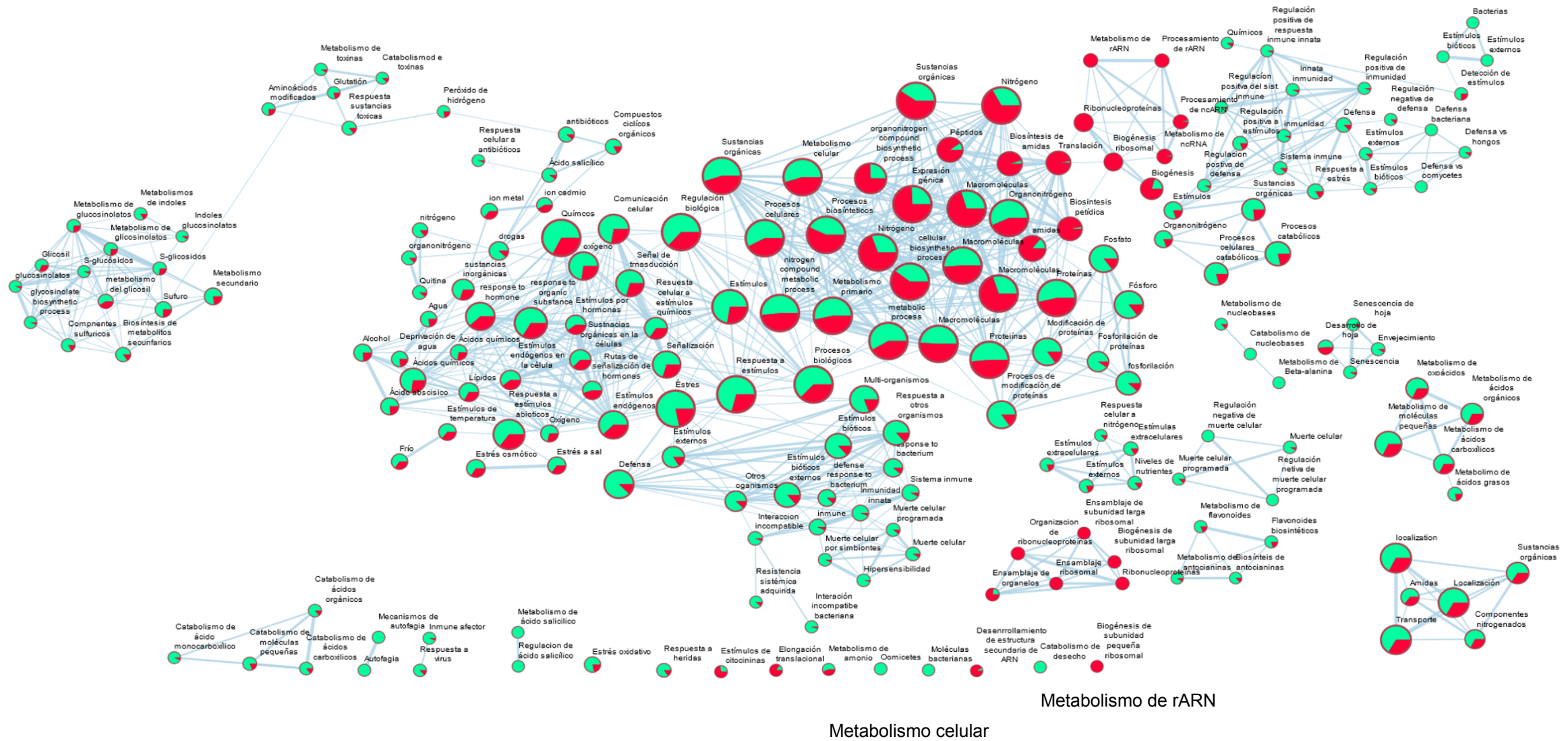


Fig. 15 Enrichment map de categorías GO enriquecidas en los genes de respuesta a SPT en hoja

Red de categorización GO por función biológica. Los nodos representan las categorías que fueron enriquecidas de acuerdo con los genes de respuesta a SPT. En cada uno de los nodos se observa la proporción de genes inducidos (verde) y genes reprimidos (rojo) que enriquecen cada categoría. El tamaño del nodo va de acuerdo con el número de genes que enriquecen la categoría.

categoría. Las líneas que interceptan cada categoría representan el número de genes que comparten las categorías entre ellas, eso quiere decir, una línea con un mayor grosor comparte más número de genes entre las categorías.

Estos esquemas nos dan un panorama general de las funciones biológicas en los que podrían estar involucrados los genes de respuesta a SPT. Sin embargo, no todos los genes están categorizados.

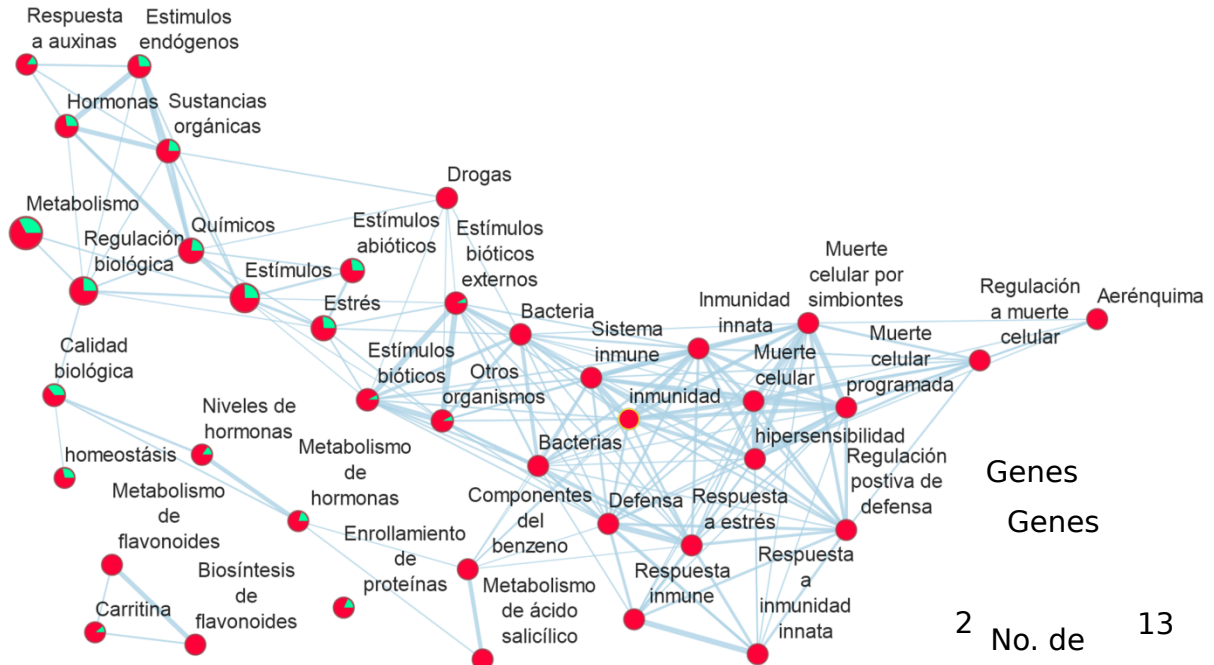


Fig. 16 Enrichmentmap de categorías GO enriquecidas en los genes de respuesta a SPT en hoja con pretratamiento de BAP

Red de categorización GO por función biológica. Los nodos representan las categorías que fueron enriquecidas de acuerdo con los genes de respuesta a SPT al tener un pre-tratamiento de BAP. En cada uno de los nodos se observa la proporción de genes inducidos (verde) y genes reprimidos (rojo) que enriquecen cada categoría. El tamaño del nodo va de acuerdo con el número de genes que enriquecen la categoría. Las líneas que interceptan cada categoría representan el número de genes que comparten las categorías entre ellas, eso quiere decir, una línea con un mayor grosor comparte más número de genes entre las categorías.

Por ello, se realizó un análisis manual más detallado de los genes de respuesta a SPT en hoja. Esto nos proporcionó información más clara sobre las posibles funciones de SPT en dicho tejido. Después del análisis, se seleccionaron genes que participan en el desarrollo de tricomas, estomas y respuesta a antocianinas para verificar los niveles de expresión mediante qRT-PCR en las diferentes condiciones del estudio. Además, se realizaron algunos experimentos para corroborar los datos transcriptómicos.

Primero, se analizó el efecto que tiene SPT en el tamaño de la hoja que ha sido previamente reportado (Ichihashi et al., 2010). Por lo cual, se tomaron fotografías de las líneas de pérdida y ganancia de función de SPT en los ecotipos Col-0 y Ler, así como sus respectivos fondos silvestres (Fig. 19). Las fotografías se utilizaron para medir el área de las hojas de roseta utilizando el programa ImageJ para el análisis de las fotografías y medición del área. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis estadístico de Tukey-HDS (del inglés: HonestlySignificantDifference), que nos permite saber si existen diferencias entre las diferentes líneas clasificando sus medias con una letra, por lo que letras diferentes, quiere decir que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el área (mm^2) de dichas líneas (Fig. 12).



Fig. 17 Hojas de roseta de Arabidopsis de 22 días después de germinación

Hojas de roseta de 22 días después de la germinación (DDG), en cámara de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

El análisis estadístico mostró que la mutante *spt-12* tiene un área mayor comparada con la silvestre (Col-0), mientras que la línea sobre-expresante *35S::SPT*, tiene un área similar a la silvestre, como ya se ha reportado (Fig. 20a) (Ichihashi et al., 2010; Sidaway-Lee et al., 2010; Makkena & Lamb, 2013). Por otra parte, la mutante *spt-2* al igual que la sobre-expresante *35S::SPT* no parece presentar algún cambio en el área con respecto a la silvestre (Ler). Sin embargo, la sobre-expresante *35S::SPT:HA* tiene un área menor que la silvestre (Ler). Estos resultados, indican que en nuestras condiciones de crecimiento, el efecto que tiene *SPT* sobre la proliferación celular en hoja se observó de manera más clara en la mutante *spt-12* en el fondo Col-0 y en la sobre-expresante en el fondo Ler.

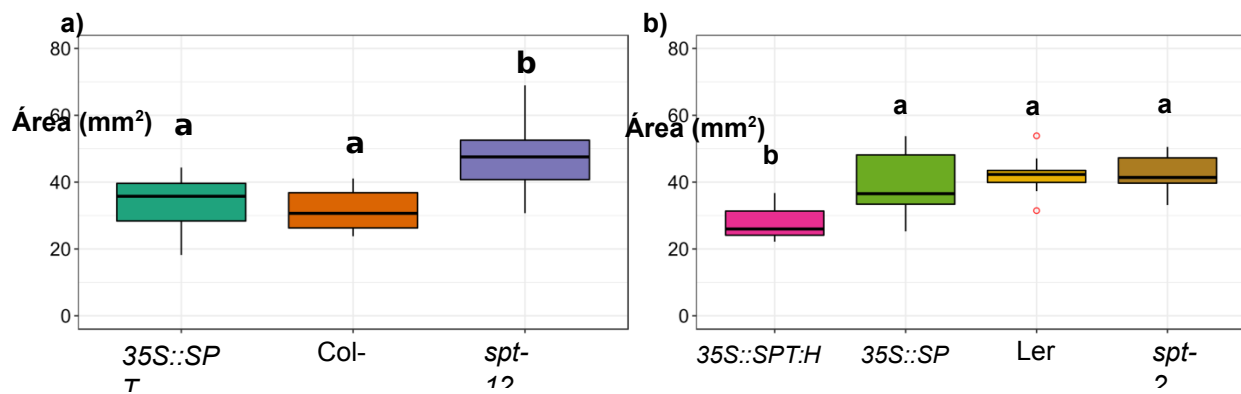


Fig. 18 Área de líneas sobre-expresantes de *SPT*, *spt-12* y *spt-2*, y líneas silvestres.

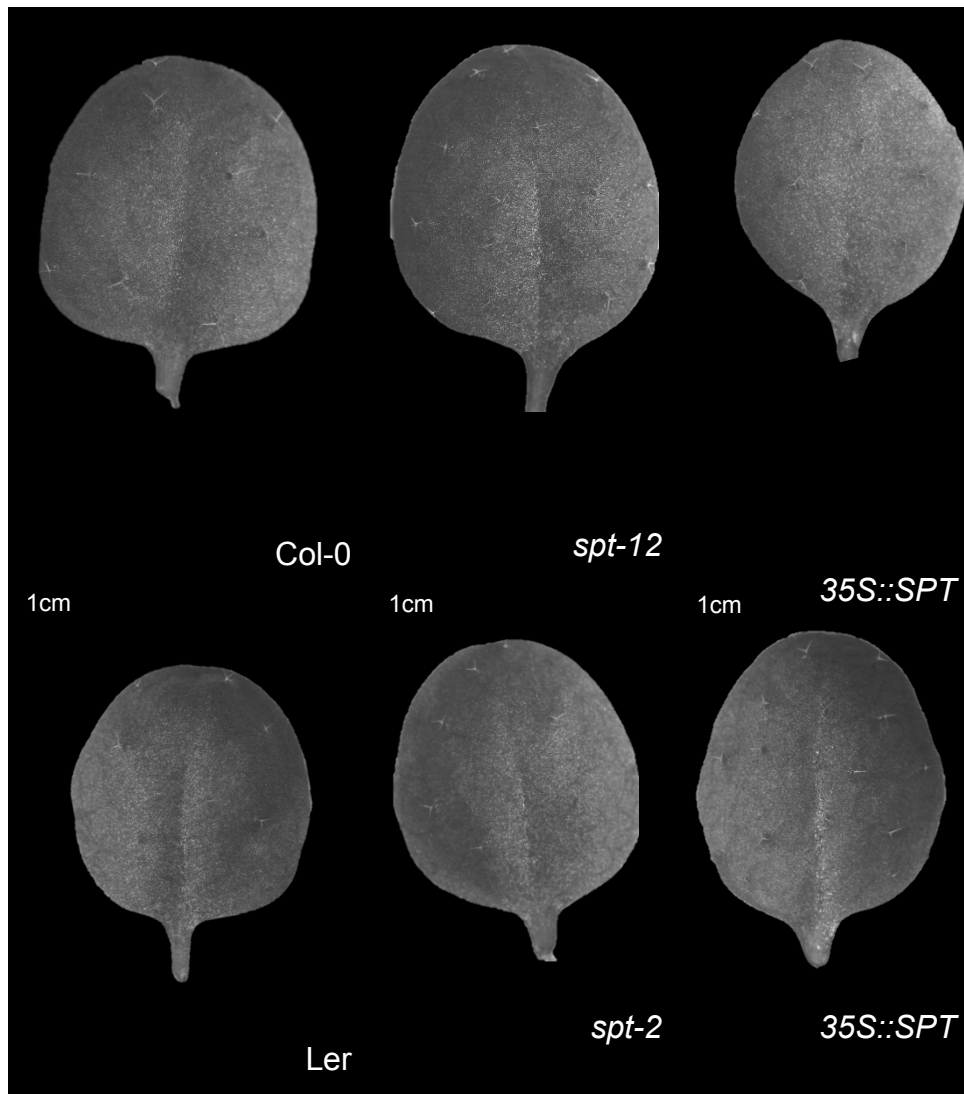
Área en mm² de la 1er y 2da hoja verdadera de roseta a los 22 DDG. a) Comparación de áreas entre la línea silvestre), sobre-expresante *35S::SPT* y mutante *spt-12* en fondo Col-0. b) Comparación de áreas entre la línea silvestre, sobre-expresante *35S::SPT* y mutante *spt-2* en fondo Ler. Los datos se analizaron mediante Tukey-HSD en R, con p-value de 0.05 y las diferencias significativas entre el área de cada una de las líneas se representan con una letra, lo que quiere decir que, letras diferentes entre las líneas se refieren a diferencias estadísticamente significativas entre el área de las líneas. Círculos rojos representan datos fuera de rango. El tamaño de la muestra fueron 20 en cada línea.

Este experimento se realizó dos veces y los resultados fueron similares, lo que confirma que *SPT* está involucrado en el tamaño de la hoja.

Conteo de tricomas

Debido a que, entre los genes de respuesta a SPT se identificaron genes relacionados con la formación de tricomas y estomas se realizó un ensayo para el conteo de ambas células especializadas.

Primero, se hizo el conteo de tricomas de la 1era y 2da hoja verdadera de roseta a los 22 días después de germinación (DDG), las mismas que se utilizaron para medir el área. Para ello se tomó como parámetro, el número de tricomas por área (mm^2) de cada una de las líneas (Fig. 21).



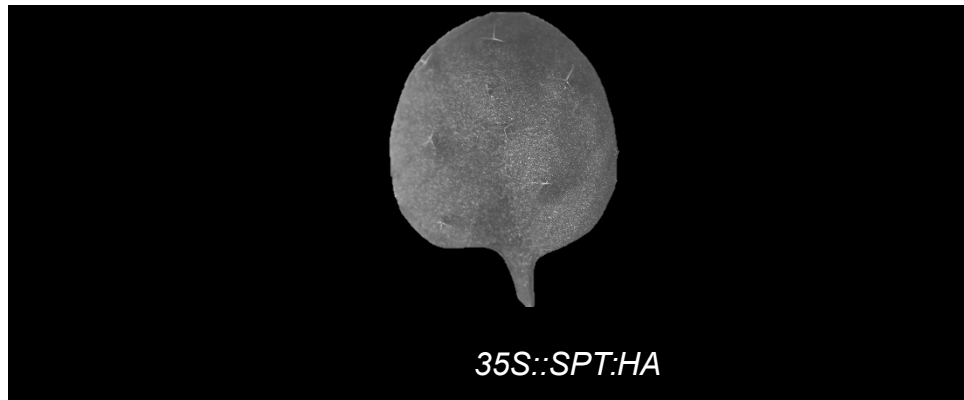


Fig. 19 Tricomas en las hojas de roseta de Arabidopsis

Fotografías de hoja de roseta a los 22 DDG, tomadas en estereoscopio. Las puntas de flechas color naranja señalan los tricomas.

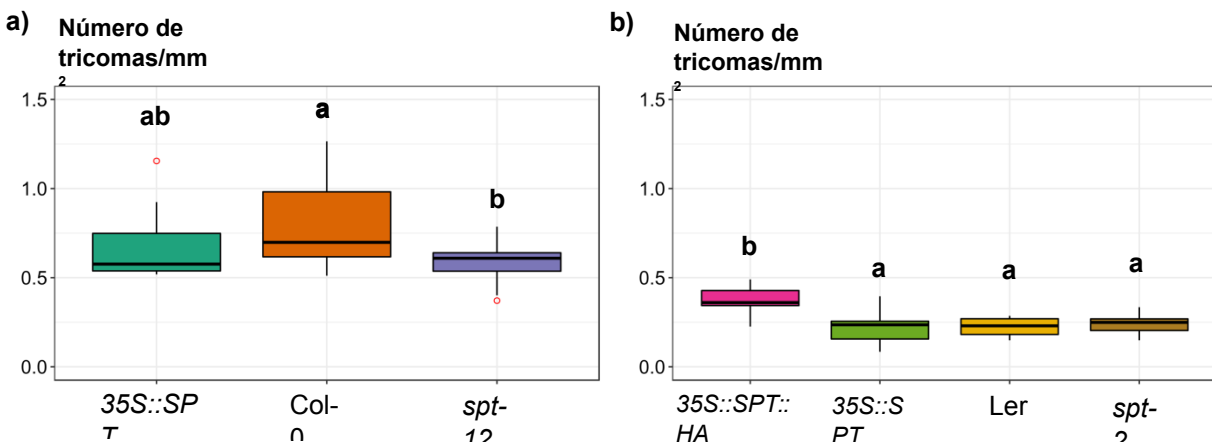


Fig. 20 Número de tricomas por área de hojas de roseta de Arabidopsis

La figura muestra el número de tricomas/mm² de la 1er y 2da hoja verdadera de roseta a los 22 DDG a) Comparación de las áreas entre las líneas Col-0, sobre-expresante 35S::SPT y mutante *spt-12*. b) Comparación de las áreas entre las líneas silvestre Ler, sobre-expresante 35S::SPT y mutante *spt-2*. Un análisis de Tukey-ANOVA-HSD, con p-value de 0.05 y las diferencias significativas entre el área de cada una de las líneas se representan con una letra y letras diferentes entre áreas de líneas se refieren a diferencias estadísticamente significativas. Círculos rojos representan datos fuera de rango. El tamaño de la población fue de 20 muestras por cada línea.

El conteo de tricomas mostró que la línea mutante *spt-12*, tiene menos tricomas por mm² comparada con la silvestre (Col-0), mientras que la línea sobre-expresante 35S::SPT no tiene diferencia significativa respecto a la silvestre (Col-0) (Fig. 22a). Por otra parte, en el fondo Ler la mutante *spt-2* y las línea sobre-expresante 35S::SPT no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la silvestre. Mientras que la línea 35S::SPT:HA presenta más número de tricomas/mm² con respecto a la silvestre (Ler). Lo que sugiere que esta línea sobre-

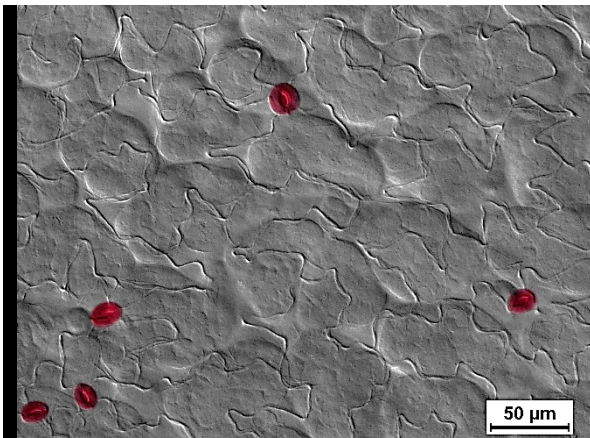
expresante tiene algún escape, que está propiciando este fenotipo (Fig. 22b). Estos resultados sugieren que SPT, sí está involucrado de alguna manera de forma positiva con la formación de tricomas, ya que al menos la mutante *spt-12* presenta un fenotipo de menor número de tricomas por área comparado con la silvestre.

Conteo de estomas

Otra característica que se analizó fue el número de estomas por unidad de área. Para esto se contaron los estomas de ambos lados (parte adaxial y abaxial) de los cotiledones de 10 días después de germinación (Fig. 23). El análisis de la parte adaxial del cotiledón mostró que la mutante *spt-12* presenta un mayor número de estomas en comparación con la silvestre (Col-0), mientras que la sobre-expresante *35S::SPT* no presenta diferencias con respecto a la silvestre (Fig. 24a). En la parte abaxial del cotiledón, la mutante *spt-12* presenta más estomas y la línea sobre-expresante presenta menos estomas respecto a la silvestre (Fig. 24b).

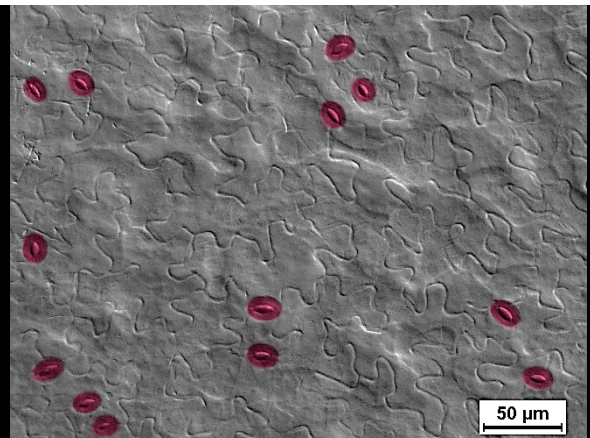
De acuerdo con estos resultados tanto de la parte adaxial y abaxial de los cotiledones la mutante *spt-12* presenta más estomas, sugiriendo que *SPT*, regula de forma negativa la formación de estomas, contribuyendo a la correcta diferenciación celular en hoja.

Adaxial	Abaxial
a)	b)



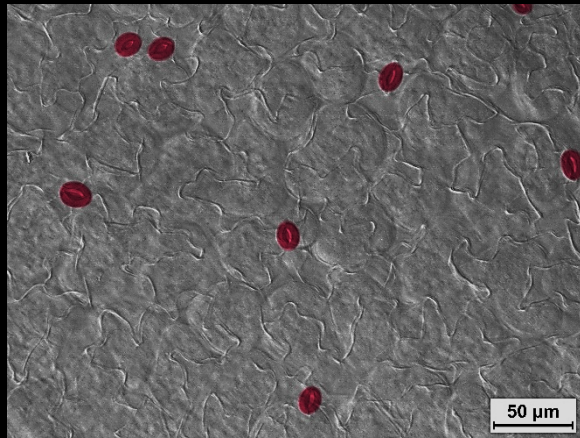
Col-0

c)



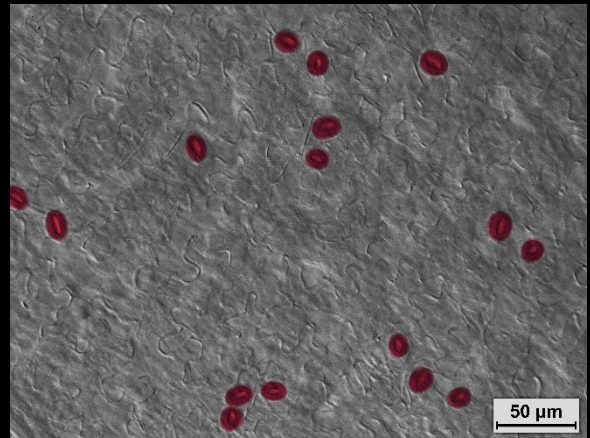
Col-0

d)



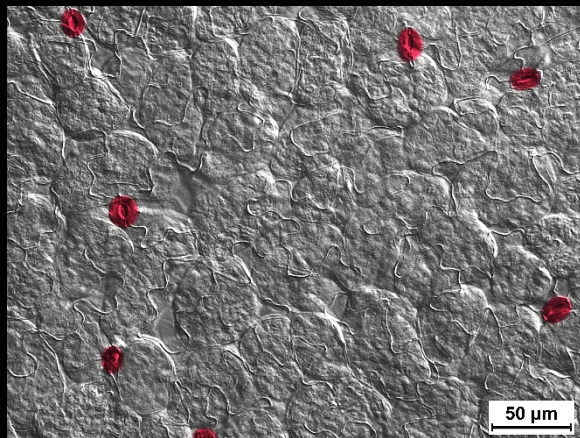
spt-12

e)

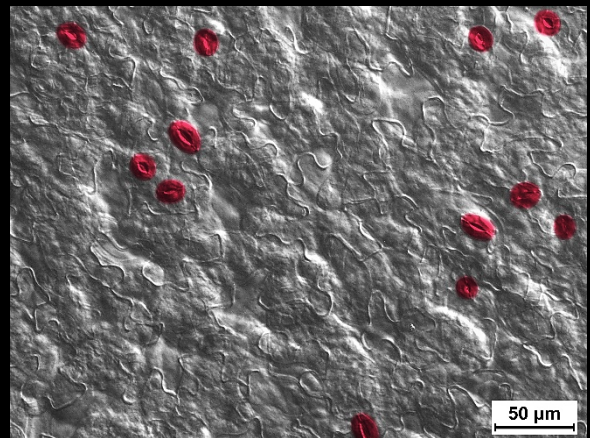


spt-12

f)



35S::SPT



35S::SPT

Fig. 21 Estomas en cotiledones de 20 DDG en líneas Col-0, mutante *spt-12* y sobre-expresante *35S::SPT*

Las imágenes representan los estomas de cotiledones de 20 DDG en un campo de 20X en microscopio Nomarski con microscopía de contraste diferencial de interferencia (Del inglés: Differentialinterferencecontrast (DIC) microscopy). (a,b) Estomas de la línea silvestre Col-0 de la parte adaxial y abaxial del cotiledón. (c,d) Estomas de la mutante *spt-12* de la parte adaxial y abaxial del cotiledón. (e,f) Estomas de la línea sobre-expresante *35S::SPT* de la parte adaxial y abaxial del cotiledón. Los estomas fueron pintados artificialmente con un editor de fotografía para su mejor observación.

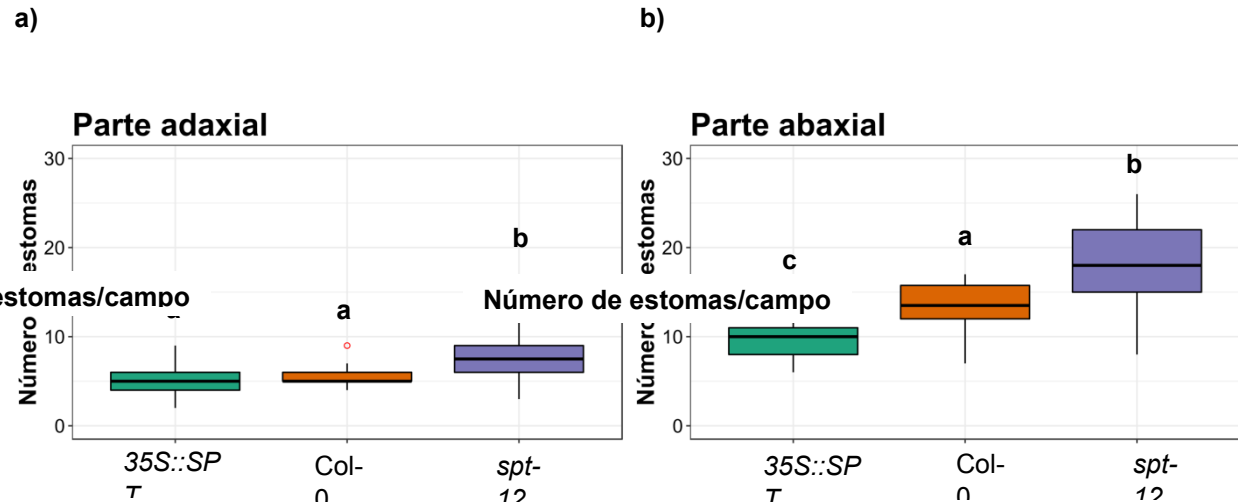


Fig. 22 *SPT* está implicado en el desarrollo de estomas

Número de estomas de cotiledones de 10 días después de la germinación. a) Gráfico que representa el número de estomas de la parte abaxial del cotiledón en las líneas silvestre, *35S::SPT* y mutante *spt-12* en fondo Col-0. b) Gráfico que representa el número de estomas de la parte adaxial del cotiledón en las líneas silvestre, *35S::SPT* y mutante *spt-12* en fondo Col-0. Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey HDS con un p-value de 0.05. Las diferencias significativas entre el área de cada una de las líneas se representan con una letra diferente, lo que quiere decir que letras diferentes entre líneas se refieren a diferencias estadísticamente significativas en el número de estomas/campo. Círculos rojos representan datos fuera de rango. El tamaño de la población fue de 15 muestras.

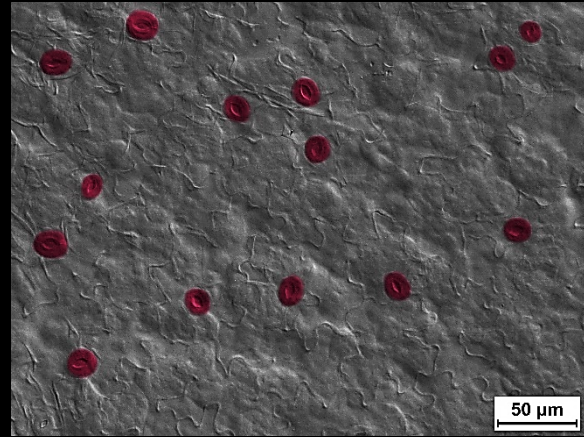
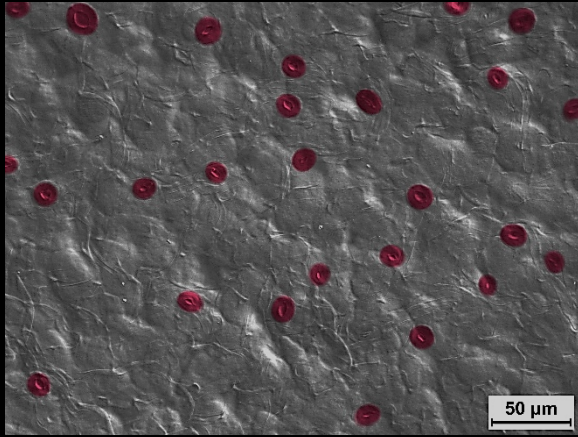
También, se analizaron las línea silvestre Ler, *spt-2*, *35S::SPT* y *35S::SPT:HA* en el fondo Ler (Fig. 25). El análisis mostró que en la parte abaxial no hay cambios en el número de estomas en ninguna de las líneas con respecto a la silvestre (Fig. 26a). En la parte adaxial del cotiledón se observó que la mutante *spt-2* tiene menos estomas que la silvestre (Ler), mientras que las líneas sobre-expresantes no presentan un cambio estadísticamente significativo con respecto a la silvestre (Fig. 26b).

Abaxial

Adaxial

a)

b)

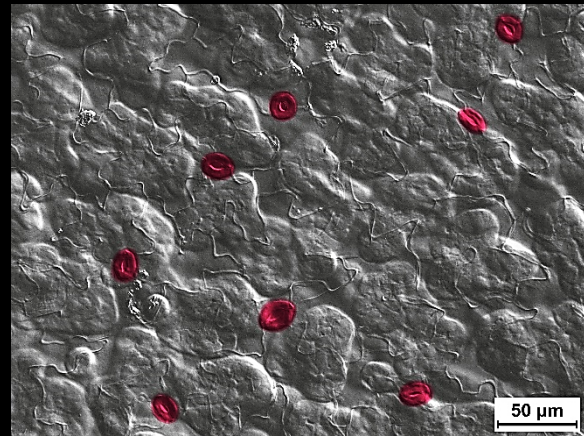
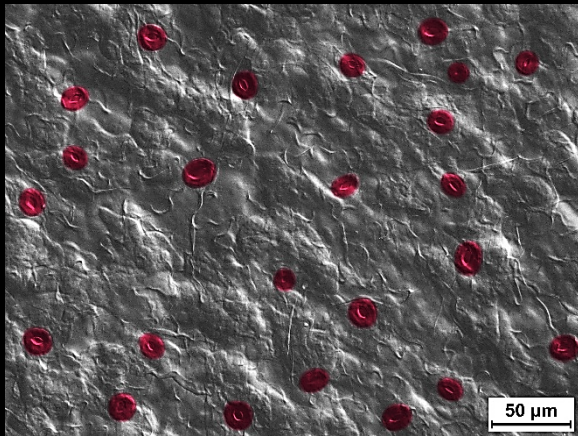


Ler

Ler

c)

d)

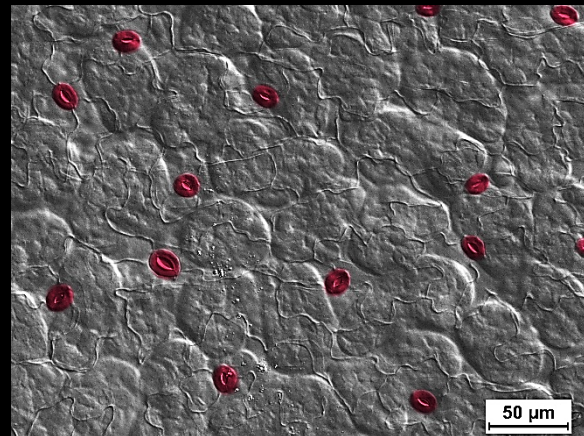
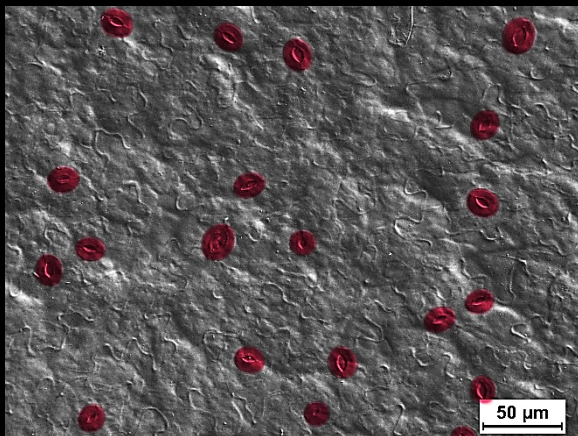


spt-2

spt-2

e)

f)



35::SPT

35::SPT

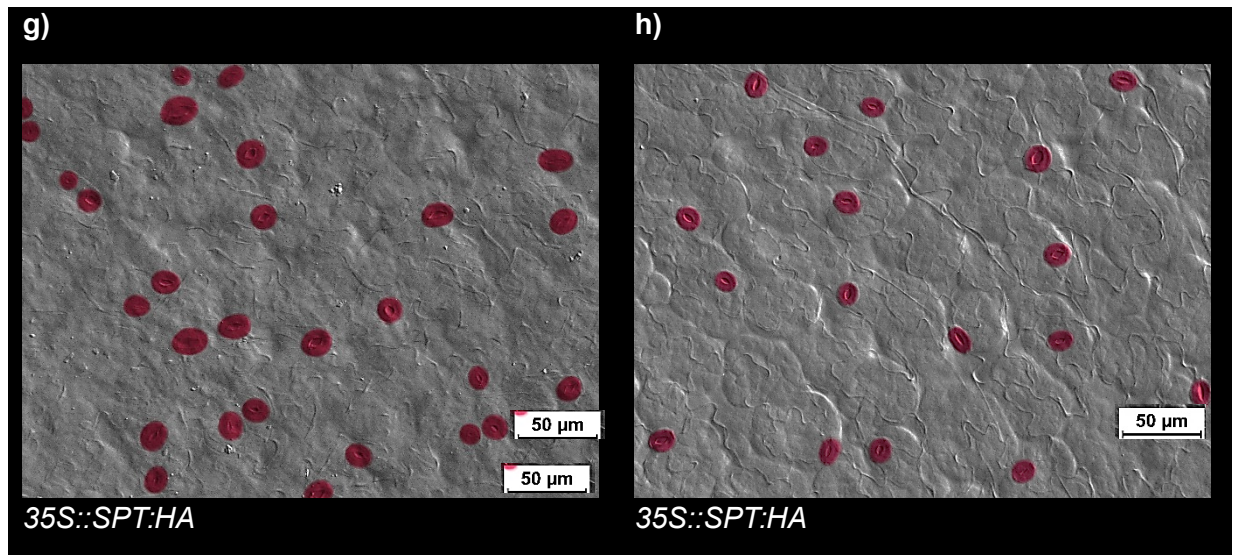


Fig. 23 Estomas de cotiledones de 20 DDG en líneas Ler, mutante *spt-2* y sobre-expresante *35S::SPT*

Las imágenes representan el campo de 20X en microscopio Nomarski con microscopía de contraste diferencial de interferencia (Del inglés: Differentialinterferencecontrast (**DIC**) microscopy). Los estomas fueron pintados artificialmente con un editor de fotografía. (a,b) Estomas de la línea silvestre Ler de la parte adaxial y abaxial del cotiledón. (c,d) Estomas de la mutante *spt-2* de la parte adaxial y abaxial del cotiledón. (e,f) Estomas de la línea sobre-expresante *35S::SPT* de la parte adaxial y abaxial del cotiledón. (g,h) Estomas de la línea sobre-expresante *35S::SPT:HA* de la parte adaxial y abaxial del cotiledón.

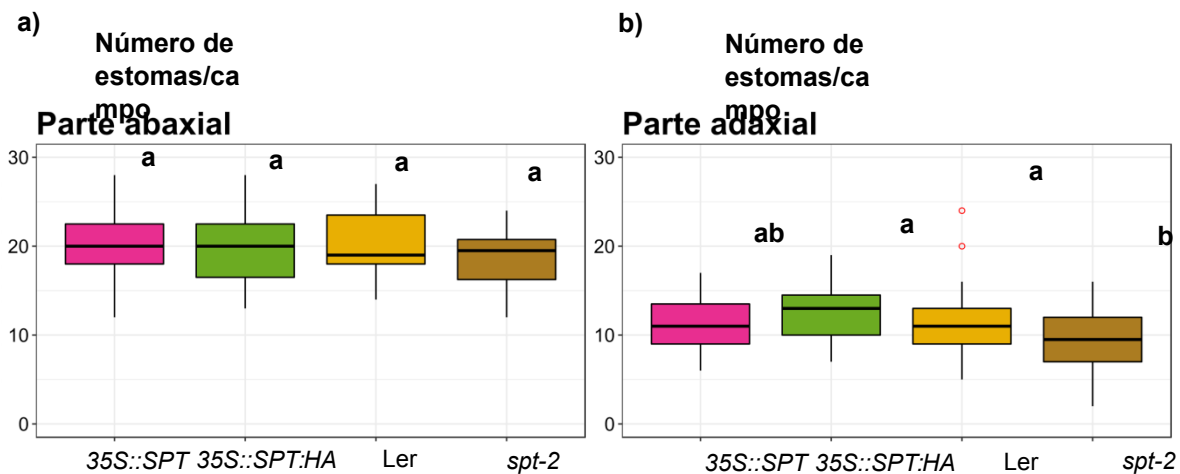


Fig. 24 *SPT* está involucrado en el desarrollo de estomas en la parte adaxial

Número de estomas de cotiledones de 10 días después de la geminación. a) Gráfico que representa el número de estomas de la parte abaxial del cotiledón en las líneas silvestre, *35S::SPT* y mutante *spt-12* en fondo Ler. b) Gráfico que representa el número de estomas de la parte adaxial del cotiledón en las líneas silvestre, *35S::SPT* y mutante *spt-12* en fondo Ler. Las letras representan un análisis diferencial estadístico del tipo ANOVA-Tukey HDS con un p-value de 0.05. Las diferencias significativas entre el área de cada una de las líneas se representan con una letra diferente, lo que quiere decir que letras diferentes entre líneas se refieren a diferencias estadísticamente significativas en el número de

estomas/campo. Círculos rojos representan datos fuera de rango. El tamaño de la muestra fue de 15 cotiledones por línea.

Teniendo en cuenta lo observado en la parte abaxial en el que la mutante *spt-12* tiene más estomas que la silvestre (Col-0) y la mutante *spt-2* tiene menos estomas que la silvestre (Ler), sugiere que el fenotipo diferencial al menos en la parte abaxial del cotiledón es dependiente del ecotipo. Este resultado fue similar cuando se estudió el porcentaje de germinación de las mutantes *spt-12* y *spt-2*, ya que la mutante *spt-12* tiene más porcentaje de germinación comparada con la silvestre (Col-0), mientras que la mutante *spt-2* tiene menos porcentaje de germinación comparada con la silvestre (Ler) (Vaistij et al., 2013), por lo que, la función de SPT como regulador de la formación de estomas también sugiere ser ecotipo-dependiente.

La acumulación de antocianinas inducida por sacarosa es parcialmente dependiente de SPT

Debido a la conexión de algunos de los genes de respuesta a SPT con la biosíntesis de antocianinas, se realizó un experimento de acumulación de antocianinas inducida por sacarosa para explorar el posible papel de SPT en este proceso.

Para este experimento, las semillas de las líneas Col-0, Ler, *spt-12*, *spt-2* y sobre-expresantes fueron sembradas en un medio con 4% de sacarosa y las plántulas fueron observadas 2 y 6 DDG (Fig. 27).

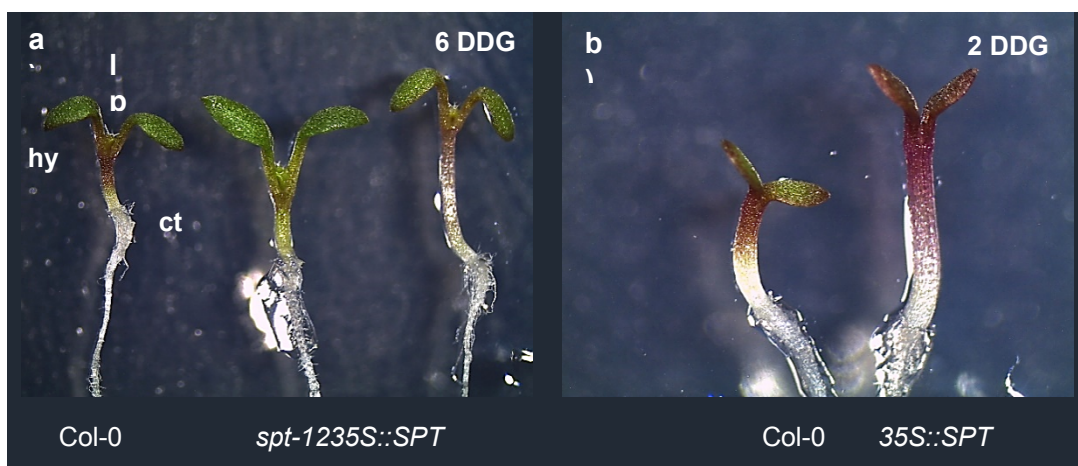




Fig. 25 *SPT* está involucrado a la respuesta de antocianinas inducidas por sacarosa en cotiledones

Imágenes de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 6 DDG en medio MS con 4% de sacarosa. Hipocótilo (hy), cotiledón (ct) y primordio de hoja (lp). a) Plántulas de líneas silvestre Col-0, *spt-12* en fondo Col-0 y sobre-expresante *35S::SPT*. En la cual se observa que la línea silvestre presenta una acumulación de antocianinas en la parte del primordio de hoja en el hipocótilo y en el ápice del cotiledón, mientras que la mutante *spt-12* carece de esta pigmentación, siendo muy tenue la pigmentación en el primordio de hoja. b) Plántulas de las líneas silvestre Col-0 y sobre-expresante *35S::SPT*. c) Plántulas de líneas silvestre Ler, *spt-2* en fondo Ler y sobre-expresante *35S::SPT*. En la cual se observa que la línea silvestre (Ler) presenta una acumulación de antocianinas en la parte del primordio de la hoja y del hipocótilo, mientras que la mutante *spt-2* presenta en las mismas zonas esta pigmentación, pero tenue y la línea sobre-expresante si presenta esta pigmentación, siendo similar a la línea silvestre. d) Plántulas del inciso c, desde una vista aérea. Se observa que la línea silvestre presenta la pigmentación en la parte circundante del cotiledón, mientras que la mutante *spt-2* esta pigmentación es difusa y tenue, sin embargo, la línea sobre-expresante tiene esta coloración más similar a la línea silvestre.

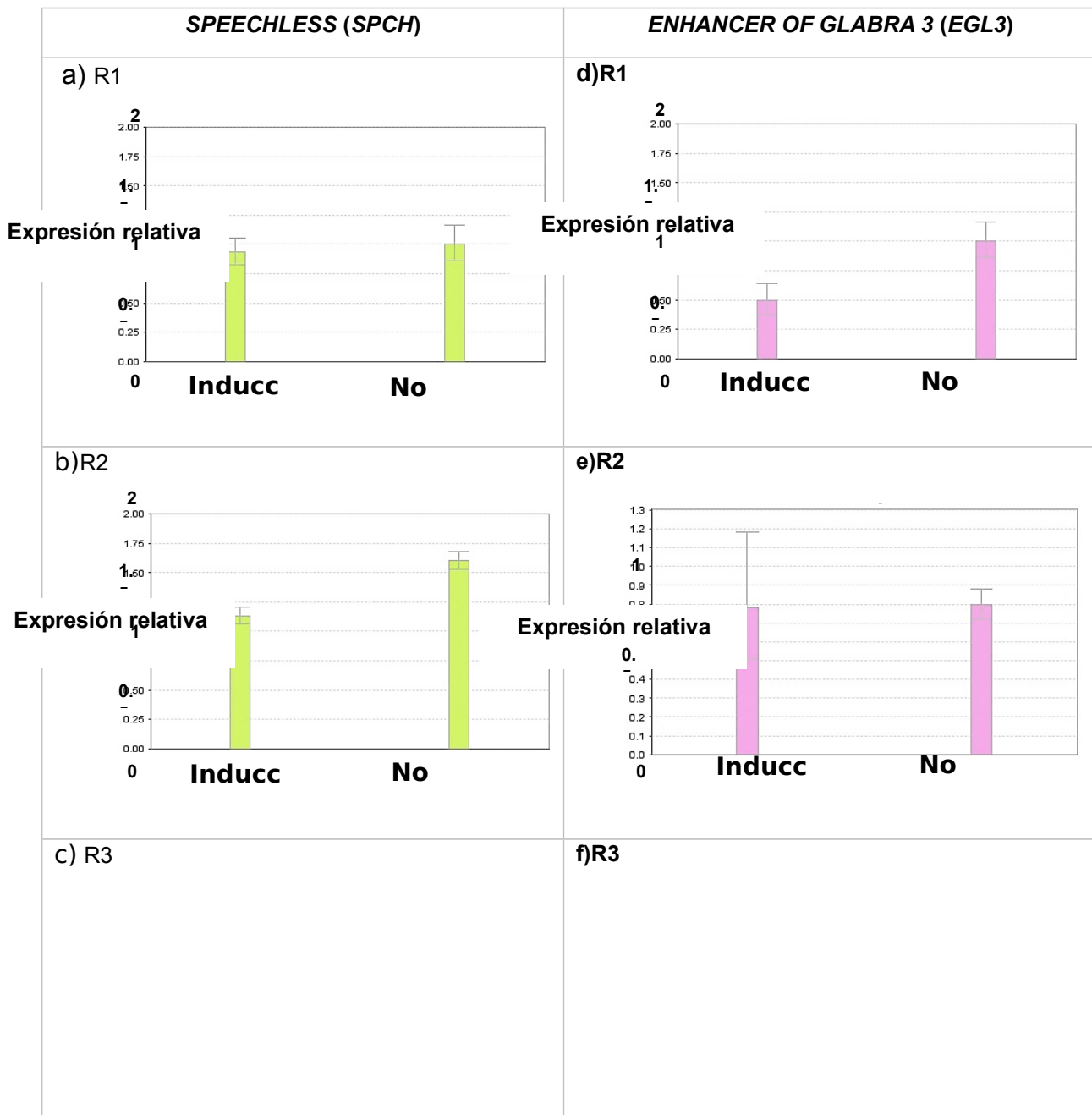
En una planta silvestre las antocianinas se acumulan en la parte superior del hipocótilo, en la zona meristemática y sus alrededores cuando crece en un medio con alta concentración de sacarosa (Winkel-Shirley et al., 2001; Li et al., 2014a; Ilk et al., 2015). Esta acumulación es fácilmente observable a través de una coloración guinda (Fig. 27a). Bajo las mismas condiciones de crecimiento, la mutante *spt-12* no presenta esta

acumulación de antocianinas en el primordio de la hoja ni en los cotiledones, solo se observa una ligera acumulación en el hipocótilo, mientras que la línea sobre-expresante *35S::SPT*, presenta una acumulación de antocianinas similar a la línea silvestre (Col-0) (Fig. 27a). Por otra parte, en plántulas a los 2 DDG, se observó una diferencia de acumulación entre la línea silvestre y la sobre-expresante, sobre todo porque la pigmentación se extiende en el cotiledón de la línea sobre-expresante mientras que en la silvestre esta coloración es menor en los cotiledones (Fig. 27b). Estos datos sugieren que *SPT* es necesario para la respuesta de antocianinas y que la respuesta podría ser dependiente de la etapa de desarrollo. Analizando la mutante *spt-2* se observa que acumula menos antocianinas que la silvestre. Este efecto se observa más claramente a los 6 DDG, ya que la línea silvestre presenta una acumulación de antocianinas en la parte del hipocótilo, primordio de la hoja y en el ápice de los cotiledones, esta respuesta a antocianinas es similar en la línea sobre-expresante, mientras que la mutante *spt-2* esta pigmentación es más tenue (Fig. 27c). Desde una vista aérea de los cotiledones, vemos que la acumulación de las antocianinas en la línea silvestre Ler, es en la periferia del cotiledón, mientras que en la línea *spt-2*, esta pigmentación es difusa, y la línea sobre-expresante presenta un fenotipo más marcado que en la línea silvestre (Fig. 27d). En etapas más tempranas, no se observa la diferencia entre la mutante *spt-2* y la silvestre (Fig. 27e). Estos resultados sugieren que la presencia de *SPT* es necesaria para la acumulación de antocianinas inducida por sacarosa se lleve a cabo de manera correcta.

Análisis de expresión de genes blanco de *SPT* por qRT-PCR

Por último, se seleccionaron dos genes de respuesta a *SPT* que están involucrados en los procesos de formación de tricomas, estomas y respuesta a antocianinas. Por ello, se seleccionó a *SPEECHLESS (SPCH)* involucrado en el desarrollo de estomas (MacAlister et al., 2007; Pillitteri et al., 2007; Keuskamp et al., 2010; Torii, 2015; Zoulias et al., 2018) y a *ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3)* por participar en el desarrollo de tricomas y en la respuesta de antocianinas (Morohashi et al., 2007; Li et al., 2014b; Bulgakov et al., 2017).

De acuerdo con los datos transcriptómicos, en el contraste de la inducción de SPT vs la no inducción de SPT, los genes *SPCH* y *EGL3* están reprimidos por la inducción de SPT. Se analizó la expresión de los genes *SPCH* y *EGL3* por RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) usando las mismas muestras que se usó para el RNA-seq. Se confirmó que si los dos genes presentan una represión en la expresión por la inducción de SPT (Fig. 20), aunque esta represión de ambos genes solo se observó en 2 de las 3 réplicas biológicas.



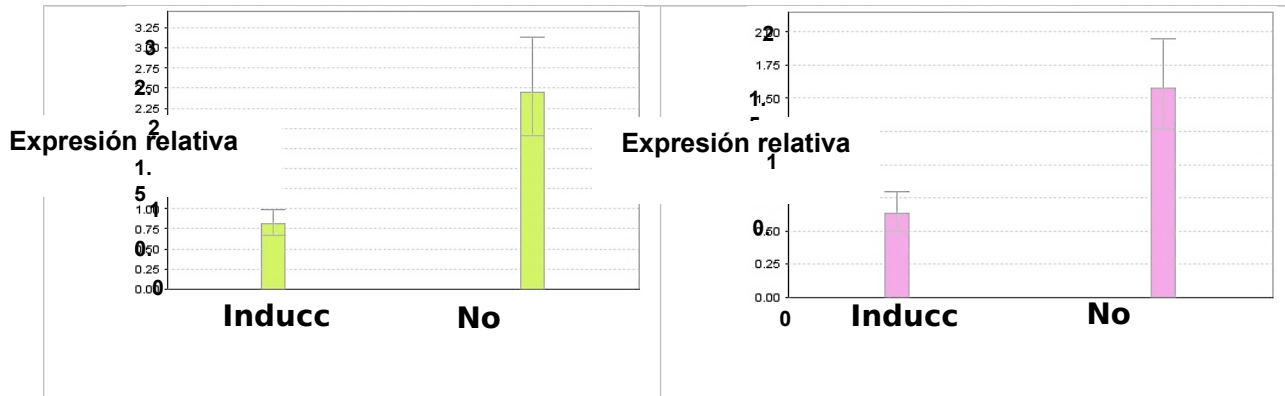


Fig. 26qRT-PCR análisis de dos genes de respuesta a SPT: *SPCH* y *EGL3*

Graficas de barras que representan los resultados del qRT-PCR de los genes *SPCH* y *EGL3*, bajo la inducción de *SPT*. (a-c) Resultados de la expresión relativa del gen *SPCH* bajo la inducción de *SPT* en las tres replicas biológicas analizadas. (d-f) Resultados de la expresión relativa del gen *EGL3* bajo la inducción de *SPT* en las tres replicas biológicas analizadas. Se utilizo el gen de *ACTINAS* para normalizar. Las barras de error indican la desviación estándar de las réplicas técnicas.

Por otra parte, se hizo el mismo experimento de qRT-PCR, pero ahora en las muestras de plantas cuales recibieron un pre-tratamiento con BAP. Interesantemente, en los datos transcriptómicos, con el pre-tratamiento con BAP, *SPCH* y *EGL3* respondieron positivamente a la inducción de *SPT* ya que en el transcriptoma en el corte de $FDR \leq 0.05$ no aparecen en las listas (ANEXO 5). El resultado del qRT-PCR demuestra el mismo comportamiento de los genes, se observa que en efecto la aplicación de un pre-tratamiento de BAP, modifica la regulación que tiene *SPT* sobre sus genes de respuesta, ya que ambos genes sin haber tenido un pre-tratamiento de BAP, son reprimidos por *SPT*, ahora cuando hay un pre-tratamiento de BAP hay una inducción de la expresión por *SPT* en ambos genes (Fig. 29). Estos resultados sugieren que el pre-tratamiento de BAP, tiene una influencia en la regulación de *SPT* sobre sus genes blanco.

<i>SPEECHLESS (SPCH)</i>	<i>ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3)</i>
---------------------------------	---

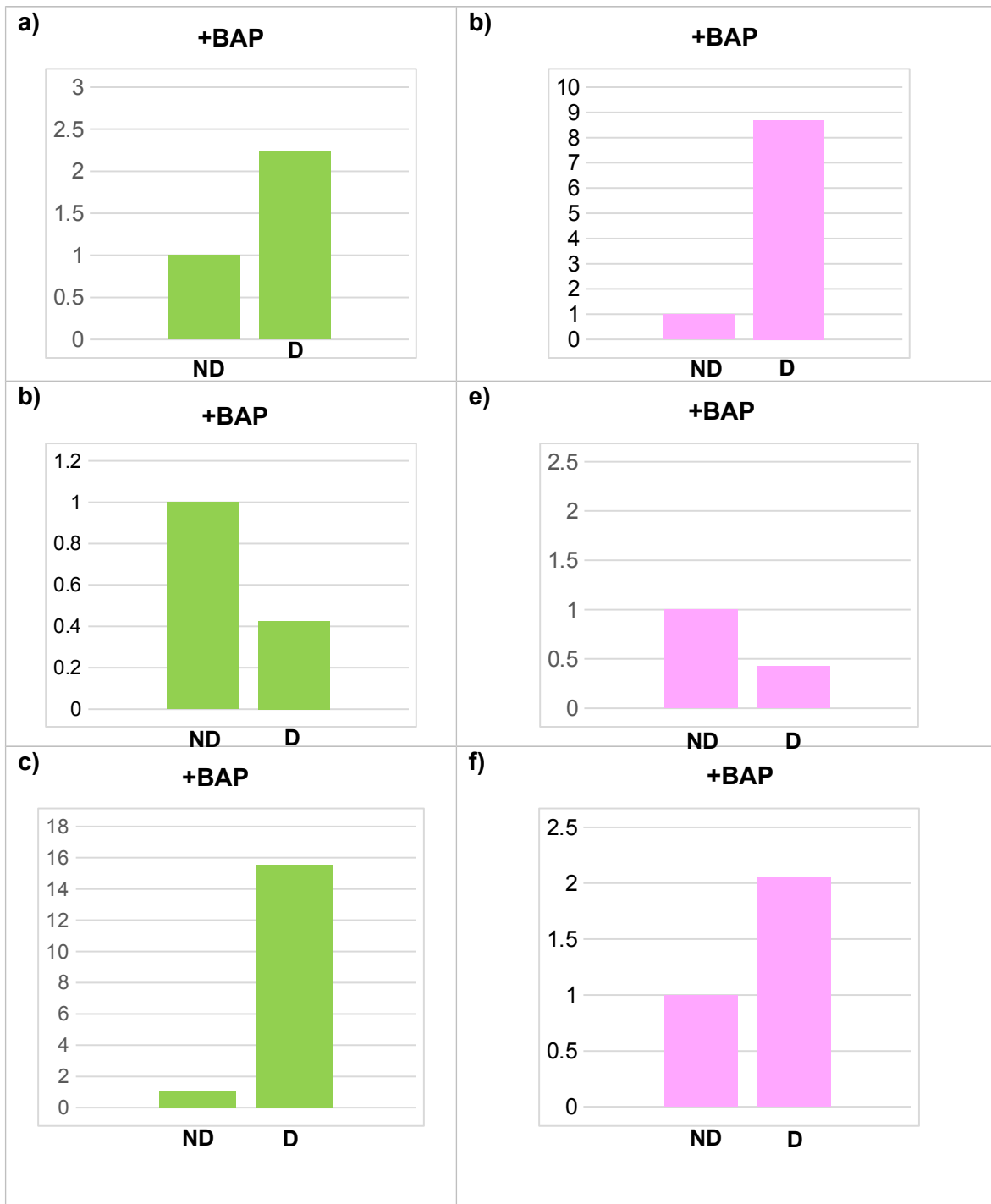


Fig. 27qRT-PCR análisis de dos genes de respuesta a SPT: *SPCH* y *EGL3* bajo un pre-tratamiento de BAP

Graficas de barras que representan los resultados del qRT-PCR de los genes *SPCH* y *EGL3*, teniendo un pre-tratamiento de BAP y bajo la inducción de SPT (D) con relación a la no inducción de SPT (ND). (a-c) Resultados de la expresión relativa del gen *SPCH* bajo la inducción de SPT con un pre-tratamiento de BAP en las tres replicas biológicas analizadas. (d-f) Resultados de la expresión relativa del gen *EGL3* bajo la inducción de SPT con un pre-tratamiento de BAP en las tres replicas biológicas analizadas. Se utilizo el gen de *ACTINAS* para normalizar. Las barras de error indican la desviación estándar de las réplicas técnicas.

DISCUSIÓN

Buena calidad de ARN y alineamiento

Respecto a la calidad del ARN y la secuenciación de las muestras, los resultados indican que ambos procedimientos se llevaron a cabo correctamente. Las lecturas de las 180 muestras fueron de muy buena calidad. Se reportó que del 95 al 98% de las lecturas alinearon a los transcritos de Arabidopsis, lo que propicio la continuación de los análisis.

Escape de la línea

Analizando el escape de la línea, se observó que es relativamente bajo y varía entre los tejidos. Sin embargo, cuando comparamos las listas de los genes blanco de SPT de nuestro análisis con los genes del escape de la línea, 10 de los 18 genes del escape de la línea en hoja y 32 de los 110 genes del escape de la línea en inflorescencia coinciden con los genes blanco de SPT en nuestro análisis de genes de respuesta a SPT (Fig.3). Entre los genes del escape en inflorescencia se encuentra el gen *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1 (PIL1)*, que se ha reportado como gen blanco de SPT (Reymond et al., 2012). Esto nos sugiere que dentro del escape que pudiese tener la línea en realidad son blancos de SPT. A pesar de que existe un escape de la línea, el análisis de los datos nos permitió identificar los genes de repuesta a SPT tanto en los tejidos de hoja e inflorescencia y bajo el pre-tratamiento de BAP.

SPT tiene plasticidad regulatoria tejido y condición-específica

En hoja se identificaron 3199 genes de respuesta a SPT, mientras que en inflorescencia son 264 genes de respuesta a SPT. A pesar de que se observó un mayor escape en inflorescencia respecto a hoja, este fenómeno no explica tan marcada la diferencia, lo cual sugiere que la capacidad regulatoria de SPT depende del tejido en el que participa. Además, solo 44 genes de respuesta a SPT coinciden entre los dos

tejidos analizados, lo que quiere decir que SPT tiene plasticidad regulatoria tejido-específica.

Cuando las plantas fueron pre-tratadas con BAP, el número de genes de respuesta a SPT disminuye en ambos tejidos. Este efecto es más drástico en hoja, ya que de 3199 genes de respuesta a SPT sin BAP, estos disminuyen a solo 264 genes con BAP, es decir, doce veces menos. En inflorescencia de 207 genes de respuesta sin BAP, estos disminuyen a 114 con BAP, es decir, casi la mitad. Para esta observación se sugieren tres posibles explicaciones.

- 1) Es posible que el pre-tratamiento con BAP afecte la expresión/función de genes/proteínas que participan en el remodelado de la cromatina, causando cambios estructurales en la conformación del ADN, modificando la accesibilidad del o los complejos transcripcionales que SPT es capaz de formar para llevar a cabo su actividad regulatoria. Existe evidencia que apoya esta idea. Por ejemplo, se ha reportado que el gen *BRAHAMA (BRM)*, que codifica para un homólogo de *SWI/SNF*, una ATPasa remodeladora de cromatina participa en la modulación de la respuesta a citocininas y giberelinas, modificando la conformación de la cromatina en las regiones promotoras de los genes de respuesta a estas hormonas (Efroni et al., 2013). Esto sugiere que el pre-tratamiento de BAP puede cambiar la conformación de la cromatina en las regiones promotoras de los genes de respuesta a SPT y que por ello, SPT ya no tenga accesibilidad al ADN, disminuyendo drásticamente su actividad.
- 2) Otra posibilidad es que el pre-tratamiento con BAP haya causado una disminución de la expresión de los genes que codifican para proteínas interactoras de SPT afectando la composición de los complejos proteína-proteína que forma SPT para poder regular la transcripción de sus genes blanco o que BAP afecte la estabilidad de dichos complejos. Un ejemplo de cambios de expresión inducidos por hormonas de algunos genes que interactúan con SPT son los genes *HECATE (HEC)*, pues se ha reportado que un tratamiento de auxinas afecta los niveles de expresión de estos genes (Schuster et al., 2015). También se ha reportado que la estabilidad de

la interacción proteína-proteína entre ETTIN (ETT) y INDEHISCENT (IND), que también interactúan físicamente con SPT, se afecta cuando hay tratamiento de auxinas en levadura y en la planta (Simonini et al., 2016). Lo anterior podría estar sucediendo de igual manera con SPT bajo el efecto de un pre-tratamiento de BAP.

- 3) Otra posible explicación es que el pre-tratamiento de BAP causa un cambio conformacional de la proteína de SPT afectando así su función.

Se descarta que el pre-tratamiento de BAP reprime la expresión de *SPT* ya que el número de transcritos no se ve afectado en nuestro análisis. Por otra parte, analizando los genes de respuesta que son comunes en las diferentes condiciones o tejidos (Fig. 8), se observó que la mayoría de los genes de respuesta son tejido-específico y condición-específica. Además, los genes en común entre los tratamientos tienden a ser pocos. Lo anterior refuerza la idea sobre la plasticidad de SPT.

Los genes de respuesta a BAP son diferentes en muestras bajo inducción de SPT

Para saber cuáles genes responden a BAP, se realizaron los contrastes de la línea sobre-expresante con pre-tratamiento de BAP contra la línea sobre-expresante sin pre-tratamiento de BAP sin inducción de SPT en hoja (35S::SPT_L_BAP_ND vs 35S::SPT__L_NH_ND) e inflorescencia (35S::SPT_I_BAP_ND vs 35S::SPT_I_NH_ND) y con la inducción de SPT en hoja (35S::SPT_L_BAP_D vs 35S::SPT_L_NH_D) e inflorescencia (35S::SPT_I_BAP_D vs 35S::SPT_I_NH_D). Bajo este supuesto, se espera que ambos contrastes fueran similares, ya que la única variable es el efecto de la aplicación del pre-tratamiento de BAP. Sin embargo, se observó una disminución de los genes de respuesta a BAP cuando se indujo SPT con dexametasona en ambos tejidos, de los cuales solo 3837 son comunes entre ambas condiciones. Los datos sugieren, que la respuesta a BAP es diferente cuando hay una inducción de SPT.

Aunque, estudios posteriores servirían para confirmar si el efecto es a causa de que la inducción de SPT afecta la respuesta de citocininas o el efecto que se observa es combinatorio, con esto último quiero decir, que puede ser que la inducción de SPT afecte esta respuesta y que a su vez el pre-tratamiento haya tenido un efecto sobre

SPT, por lo que resulta un efecto combinatorio ya que el pre-tratamiento fue antes de la inducción de SPT. Aunque por el contraste se elimine el efecto de la inducción, el efecto que haya tenido BAP sobre SPT estaría originando esta respuesta diferente a BAP.

La función que ejerce SPT en inflorescencia es amplia y desconocida.

El análisis de “enrichmentmap” con los genes de respuesta a SPT en inflorescencia identificó categorías como: respuesta a estímulos de luz, respuesta a radiación y respuesta a diferentes intensidades de luz, las cuales ya han sido descritas para SPT previamente. Por ejemplo, la mutante *spt* desarrolla un gineceo con defectos en la fusión de su parte apical (Alvarez & Smyth, 1999). En cambio, cuando la mutante *spt* es criada en condiciones de luz roja lejana (condiciones que simulan la sombra en plantas) su gineceo se desarrolla similar al silvestre (Foreman et al., 2011; Raymond et al., 2012). Otras categorías que aparecen en el análisis de “enrichmentmap” son: regulación de la germinación y respuesta a la estratificación de frío en semillas, procesos en los cuales también participa SPT (Penfield et al., 2005; Sidaway-Lee et al., 2010; Vaistij et al., 2013). Todos estos datos respaldan los datos obtenidos a través del análisis transcriptómico.

Un aspecto interesante que destacar, es que, aunque se ha reportado que SPT participa en diversos procesos biológicos, los cuales fueron identificados en el análisis de “enrichmentmap”, la gran parte de los procesos identificados en dicho análisis como: biosíntesis de compuestos orgánicos, estrés, metabolismo de un carbono, plegamiento de proteínas, asimilación de sulfato, etc., no han sido explorados hasta el momento.

La función de SPT es plástica ante un microambiente de citocininas en inflorescencia

Cuando hubo un pre-tratamiento de BAP, los genes de respuesta a SPT disminuyeron y la mayoría fueron distintos a cuando no hubo un pre-tratamiento de BAP, por lo que,

surgieron diferentes procesos biológicos asignados a SPT. Esto nos sugiere, que SPT tiene una plasticidad funcional en presencia de BAP.

Sin embargo, se observó que ciertos procesos biológicos asignados a SPT permanecen entre la condición sin pre-tratamiento de BAP y con un pre-tratamiento de BAP. Aunque el proceso biológico fuese el mismo, los genes de respuesta a SPT que se clasificaban en dicho proceso fueron diferentes. Estos datos indican que aunque gran parte de los procesos biológicos y genes blanco de SPT cambian, hay ciertos procesos biológicos asignados a SPT que se mantienen a pesar de cambiar el microambiente, como fue el pre-tratamiento de BAP en inflorescencia. Este mismo, ocurre en hoja, en el cual los genes blanco de SPT cambian bajo el pre-tratamiento de BAP, y por lo cual surgen nuevas funciones para SPT, sin embargo funciones biológicas de SPT, permanecen a pesar del pre-tratamiento de BAP. Lo que nos sugiere en ambos tejidos que hay una función que permanece de SPT aun cuando regula a genes diferentes, sustentando esta plasticidad funcional de SPT.

La función amplia de SPT en hoja

La función de SPT en hoja es la regulación de su tamaño. El crecimiento en la hoja puede darse por dos razones: la expansión y la proliferación celular. En el estudio de Ichihashi y col., se observó que en la mutante de *spt-11* las hojas eran más grandes que la silvestre, y se debía a que había un mayor número de células (Ichihashi et al., 2010). En este mismo estudio sugieren que SPT podría estar implicado en algún punto del ciclo celular y que esta función podría ser independiente de los reguladores positivo de la proliferación celular *ANGUSTIFOLIA3 (AN3)* y *GROWTH REGULATING FACTOR5 (AtGRF5)*, sabiendo que estos promueven la proliferación celular afectando el tamaño de la hoja. Sin embargo, nuestro estudio identificó a los genes *AN3*, *AtGRF5* y *AtGRF6* como genes de respuesta a SPT, sugiriendo que estos tres genes si pudieran estar implicados en el papel que tiene SPT en el desarrollo de la hoja.

Estas diferencias pueden deberse a que en el trabajo de Ichihashi y col., miden la expresión de los genes *AN3* y *AtGRF5* en una ventana de tiempo determinada, que

podría no ser el momento en el cual SPT regula a estos genes. En cambio, nuestro estudio es más dirigido ya que la expresión de estos genes se analiza después de la inducción de SPT, asegurando la identificación de sus genes de respuesta.

Posibles rutas de regulación por las que SPT regula el ciclo celular en hoja

Aun cuando se sabe que la función de SPT es importante en hoja (Ichihashi et al., 2010; Sidaway-Lee et al., 2010; Makkena & Lamb, 2013), el mecanismo mediante el cual SPT afecta el desarrollo de la hoja aún no es conocido. Sin embargo, nuestros datos sugieren que SPT podría estar participando en dicho proceso a través de la regulación negativa del ciclo celular, ésta idea se explorará más a detalle a continuación.

Uno de los genes de respuesta a SPT identificado en este trabajo es *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2/IAA3)*. *SHY2* es un gen de respuesta a auxinas de la familia AUX/IAA involucrado en la regulación del crecimiento de raíz, gravitropismo y formación de raíces laterales (Tian & Reed, 1999).

Además, estudios indican que en raíz las citocininas estimulan la diferenciación celular a expensas de la división celular inhibiendo la respuesta transcripcional de auxinas. Para esto, las citocininas inducen la expresión de *SHY2* que es un regulador negativo de la respuesta a auxinas (Dello et al., 2008; Schaller et al., 2014). De tal manera que SPT al regular al gen *SHY2* podría estar jugando un papel importante en la coordinación entre la división y diferenciación celular.

Otra posible ruta por la cual SPT podría regular el ciclo celular es a través de la regulación negativa de las *D-TYPE CYCLINS 3 (CYCD3)*. En *Arabidopsis* existen tres genes de este subgrupo de ciclinas nombrados *CYCD3;1*, *CYCD3;2* y *CYCD3;3*. Estos genes son necesarios para que la división celular en el cambium de la vasculatura se lleve a cabo correctamente, este proceso recibe el nombre de crecimiento secundario y afecta el tamaño de los órganos de la planta (Collins et al., 2015). En el análisis transcriptómico nosotros identificamos a los genes *CYCD3;1*, *CYCD3;2* y *CYCD3;3* y a uno de los seis genes de la familia de factores de transcripción E2F, al gen *E2F TRANSCRIPTION FACTOR 3 (E2F3)*, esta familia de FTs es necesaria para causar que

las células entren a la fase S del ciclo celular (Rossignol et al., 2001; Sozzani et al., 2006). Tanto las *CYCD3* y *E2F3* en nuestros datos son genes reprimidos de respuesta a SPT. De manera que SPT al regular negativamente a dichos genes estaría controlando el ciclo celular en las hojas de *Arabidopsis* contribuyendo al correcto desarrollo de este órgano (Fig. 30). Además, el patrón de expresión de las *CYCD3* coincide con el patrón de expresión de *SPT* en hoja, reforzando esta idea (Riou-Khamlichi et al., 1999; Groszmann et al., 2010; Collins et al., 2015).

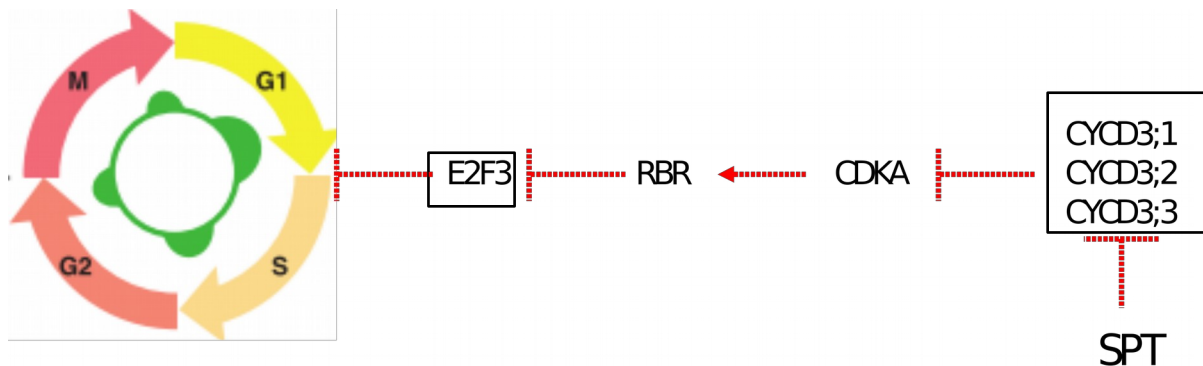


Fig. 28 Posible ruta de regulación del ciclo celular mediada por SPT

Esquema de una posible regulación negativa del ciclo celular por SPT a través de la inhibición de las *CYCD3;1*, *CYCD3;2* y *CYCD3;3*. EL esquema representa una de las rutas que reprimen la regulación de la transición de fase G1/S del ciclo celular en *Arabidopsis*. Los genes de respuesta a SPT: *CYCD3* y el *E2F3* coinciden en esta ruta de represión (marcados con cuadros negros). Por lo cual, sugiere que SPT actúa como regular negativo del ciclo celular, a través de esta ruta de las *CYCD3*. Modificación de una imagen tomada de Schaller et al., 2014.

SPT involucrado en rutas de señalización de auxinas y citocininas en hoja

Los datos sugieren que SPT regula la proliferación celular a través de la regulación negativa del ciclo celular. Para que una planta se desarrolle correctamente es necesario que haya un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular, es decir, no se pueden producir sólo células madre, sino que parte de estas células deben diferenciarse para producir los diferentes tipos de células que se necesitan para el correcto funcionamiento de un órgano en la planta. Así, SPT al regular negativamente el ciclo celular podría estar desempeñando el papel de coordinador entre la proliferación y la diferenciación celular.

Debido a que las hormonas citocininas y auxinas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación celular, SPT podría coordinar estos procesos a través, al menos en parte, de la regulación de la respuesta a estas hormonas a diferentes niveles.

Para que la respuesta a citocininas se lleve a cabo adecuadamente en espacio y tiempo, esta hormona tiene que ser distribuida en la planta. Se ha reportado que los genes de la familia *PURINE PERMEASES (PUPs)* (Zürcher et al., 2016) y algunos miembros de la familia *ATP-BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTER (ABCG)* llevan a cabo dicha tarea (Durán-Medina et al., 2017). Debido a que 8 de los 21 genes *PUP* y 2 de los 28 genes *ABCG*, de uno de los dos grupos que dividen este grupo de transportadores en los cuales miembros de este grupo se han identificado como transportadores de citocininas (Bürkle et al., 2003; Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014; Durán-Medina et al., 2017; Kang et al., 2017) fueron identificados como genes de respuesta a SPT, es probable que este FT regule la homeostasis de citocininas a través de la regulación positiva de su transporte.

Por otra parte, SPT parece regular de forma negativa 6 de los 10 genes ARR tipo A, los cuales son reguladores negativos de la respuesta a citocininas, sugiriendo que *SPT* podría estar regulando la respuesta a citocininas de manera positiva (Fig.31).

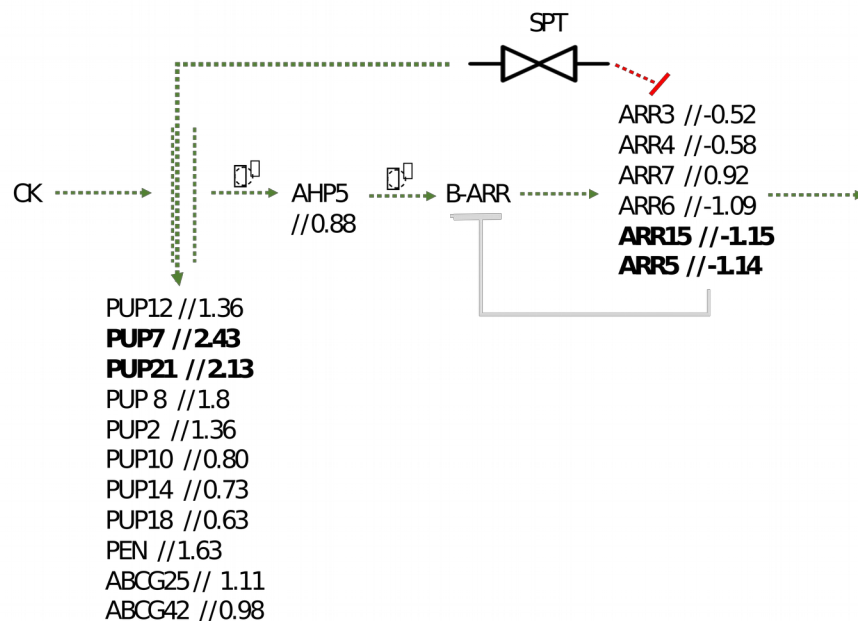


Fig. 29 Posible papel de SPT en la ruta de señalización de citocininas

Esquema de la posible regulación de SPT en la señalización de citocininas. Los números después de cada gen representan el foldchange de acuerdo con nuestros datos transcriptómicos. Se observa la inducción de genes de transporte PUP's, PEN y ABCG. Posteriormente la inducción de una histidin cinasa (AHP5) y la represión de genes de respuesta negativos de citocininas los genes ARR-tipo A. Las líneas punteadas verdes muestran la regulación positiva y las líneas punteadas rojas la represión de los genes por SPT.

Además de *SHY2*, diversos genes que participan en la señalización de auxinas fueron identificados como genes de respuesta a SPT. De manera general el transporte de auxinas parece estar regulado positivamente por SPT. En cambio, 8 de 29 genes de la familia *AUX/IAA*, 9 genes de la familia *SMALL AUXIN UPREGULATED RNA (SAUR)* y *YUCCA9* gen involucrado en la biosíntesis de auxinas (Ljung, 2013) son regulados de manera negativa (Fig. 32). Estos datos sugieren que SPT podría estar regulando la respuesta a auxinas a diferentes niveles.

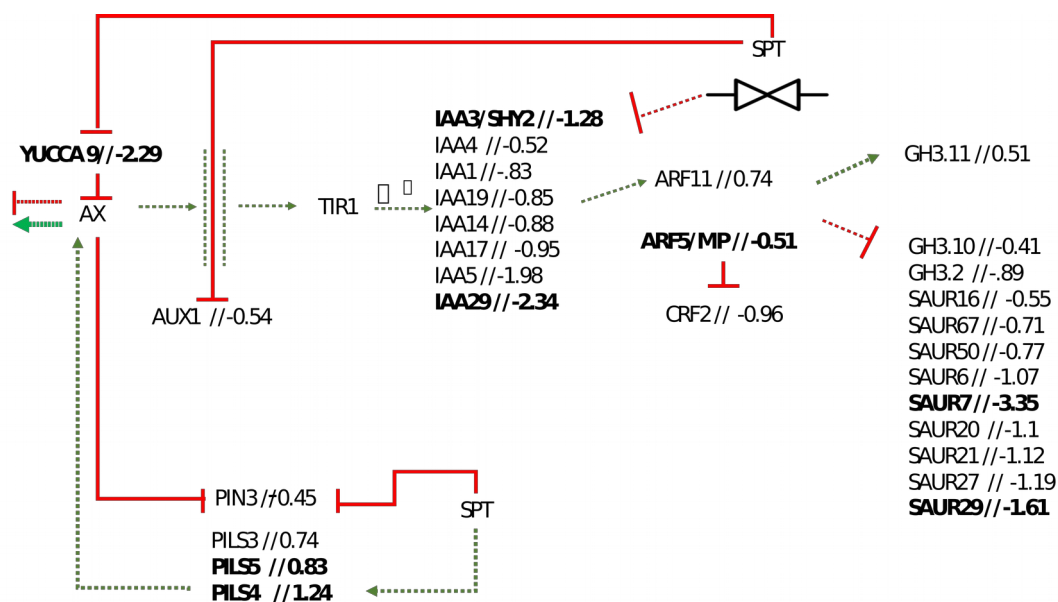


Fig. 30 Posible papel de SPT en la ruta de señalización de auxinas.

Esquema de la posible ruta de regulación de señalización de las auxinas por SPT. Los números posteriores a cada nombre del gen representa el foldchange de cada gen. Se observa la inducción de los genes *PILS*'s y la represión del gen *PIN3*, así como la represión del transportador de membrana *AUX1*. Posteriormente, la represión de genes de respuesta *IAA*, *SAUR* y *GH3*. Las líneas punteadas verdes señalan la inducción de los genes de respuesta SPT y las líneas punteadas en rojo, la represión de genes de respuesta a SPT en la señalización de auxinas.

SPT está involucrado en el desarrollo de tricomas

Los tricomas son células epidérmicas especializadas localizadas en las partes aéreas de las plantas, sirven a la planta como reservorio de fitoquímicos, de protección contra la luz UV y contra ataques por herbívoros. Los tricomas se originan a partir de células protodérmicas durante el desarrollo del primordio de hoja. Las células protodérmicas destinadas a ser tricomas cesan la división y entran a un ciclo de endoreplicación, en el cual, la replicación de ADN continúa en la ausencia de división nuclear y celular (Pattanaik et al., 2014).

Entre los genes de respuesta a SPT se encuentran los miembros del complejo encargado de la formación de los tricomas. Dicho complejo está formado por tres clases de interactores que son: el factor de transcripción de la familia R2R3-MYB, GLABRA1 (GL1), los factores de transcripción de la familia bHLH, GLABRA3 (GL3) y ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3), los cuales son intercambiables y una proteína WD40 TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1). El mecanismo de regulación propuesto es que el complejo TTG1-GL3/EGL3-GL1 activa de forma directa tanto a FTs activadores de tricomas GLABRA2 y TRANSPARENT TESTA GLABRA2 (GL2 y TTG2) como a FTs represores de tricomas de la familia MYB CAPRICE y ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1 (ETC1) (CPC y ETC1). Las células donde se lleva a cabo dicha activación forman tricomas, mientras que CPC y ETC1 se mueven hacia las células vecinas donde compiten con GL1 por la unión a EGL3, formando un complejo inactivo TTG1-EGL3-CPC/ETC1 y por consecuencia estas células no forman tricomas (Zhao et al., 2008).

La mutante de *g/1* no produce tricomas en las hojas, mientras que la mutante *g/3* presenta una reducción de tricomas en las hojas (Payne et al., 2000). La mutante *eg/3* por sí sola no presenta un fenotipo evidente, pero aumenta el fenotipo de *g/3* cuando se realiza la doble mutante *g/3eg/3* (Zhang et al., 2003). Además, la mutante *ttg1* presenta menos tricomas y con pequeñas deformaciones (Maes et al., 2008).

Debido a que SPT afecta negativamente los genes encargados de la formación de tricomas (*GL1*, *GL3* y *EGL3*), se espera que la mutante *spt* produzca más tricomas respecto a la silvestre, pues SPT no podría ejercer su posible papel represor sobre

estos genes. El análisis fenotípico sobre el conteo de tricomas de la mutante *spt* mostró que dicha mutante produce más tricomas que la silvestre, sugiriendo que SPT podría estar regulando la formación de tricomas a través de la regulación transcripcional negativa de los genes *GL1*, *GL3* y *EGL3* (Fig. 22).

SPT involucrado en el desarrollo de estomas

Uno de los genes de respuesta de SPT, es el gen *SPEECHLESS* (*SPCH*) que codifica para un factor de transcripción de la familia *BASIC HELIX-LOOP-HELIX* (*bHLH*), cuya función es crucial para la diferenciación de las células protodérmicas a células madre meristemoides y su subsecuente división y diferenciación en estomas. El rol de *SPCH* es generar células hijas con potencial pluripotente. Los niveles de *SPCH* y su actividad es regulada a través de la ruta de péptidos señal que actúan en una cascada de cinasas *MITOGEN-ACTIVATED KINASE* (*MPK*) (Zoulias et al., 2018). La correcta regulación del gen *SPCH* es crucial para el desarrollo de estomas, ya que la mutante *spch* no es capaz de formar estomas (MacAlister et al., 2007).

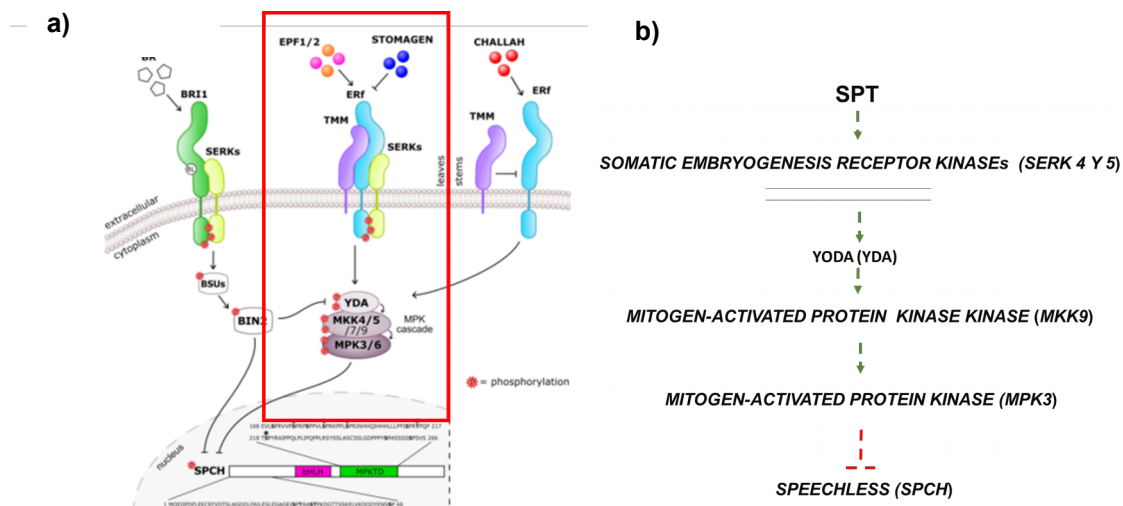


Fig. 31 Posible ruta de señalización de SPT en la represión de *SPCH*

a) Esquema de regulación de *SPCH* para el desarrollo de estomas. Imagen tomada de Zoulias et al., 2018. El cuadro rojo marca la posible ruta de regulación de SPT para la represión de *SPCH*. b) Esquema hipotético de la regulación de SPT sobre *SPCH*.

El conteo de estomas que se realizó en las diferentes mutantes de *spt* mostró que la mutante *spt-12* (Col) presenta un mayor número de estomas, tanto en la parte adaxial y abaxial del cotiledón (Fig. 24), mientras que la mutante *spt-2* (Ler) presenta menor número de estomas sólo en la parte adaxial del cotiledón con respecto a la silvestre (Fig. 25). Estos datos sugieren que SPT podría participar en el desarrollo de estomas regulando la transcripción del gen *SPCH* ya sea de forma directa o de forma indirecta a través de la regulación positiva de genes que participan en la regulación negativa de *SPCH* como son *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASEs* (*SERK4* Y *SERK5*), *YODA* (*YDA*), *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE* (*MKK9*) y *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE* (*MPK3*) (Fig. 33).

Por otra parte, los datos obtenidos en los diferentes ecotipos Col-0 y Ler, parecen ser contradictorios. Sin embargo, se ha reportado que el gen *SPT* regula la germinación de una manera ecotipo-dependiente (Vaistij et al., 2013). Además, debido a que los datos transcriptómicos provienen del ecotipo Col-0, es de esperarse que si *SPT* afecta negativamente al gen *SPCH*, en la mutante *spt* en el ecotipo Col-0 presente un mayor número de estomas en las hojas.

SPT está involucrado en la acumulación de antocianinas inducida por sacarosa

Algunos de los genes de respuesta a SPT, como *EGL3*, *TTG1* y *AN3*, además de estar involucrados en la formación de tricomas y en la proliferación celular respectivamente, también participan en la ruta de biosíntesis de antocianinas (Payne et al.; Gonzalez et al., 2008; Patra et al., 2013; Li et al., 2014b; Meng & Liu, 2015; Bulgakov et al., 2017; Zhang & Schrader, 2017). Además, FTs importantes en la regulación de biosíntesis de antocianinas como *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT2* (*PAP2*) (Gonzalez et al., 2008; Nemie-Feyissa et al., 2015) y *MYB114* (Li et al., 2014a), se identificaron como genes de respuesta a SPT.

Por lo anterior, se realizó un ensayo de acumulación de antocianinas inducida por sacarosa, el cual mostró que las mutantes *spt* en ambos ecotipos (Col y Ler) acumulan menos antocianinas, mientras que las sobre-expresantes acumulan más antocianinas

respecto a la silvestre (Fig. 27). Estos resultados sugieren que SPT es necesario para que la sacarosa induzca la acumulación de antocianinas en Arabidopsis. Resulta interesante analizar en un futuro, si la sacarosa es capaz de inducir la expresión de *SPT*.

Además, se ha reportado que los genes *DELLAs* también son necesarios para la correcta acumulación de antocianinas inducida por sacarosa, ya que la cuádruple mutante *dellas* presenta una clara disminución en la acumulación de antocianinas en plántulas en medio enriquecido con sacarosa respecto a la silvestre (Li et al., 2014b). Debido a que *SPT* y los *DELLAS* participan conjuntamente en el desarrollo de los cotiledones (Josse et al., 2011), resulta interesante explorar en el futuro si estos genes también participan de manera conjunta en el proceso de acumulación de antocianinas inducida por sacarosa.

***SPCH* y *EGL3* son genes de respuesta reprimidos por SPT**

Por último, con el fin de confirmar los niveles de expresión de algunos genes de respuesta a SPT, se seleccionaron los genes *SPCH* y *EGL3* para un análisis de expresión mediante qRT-PCR. Los datos generados a partir de las muestras que no fueron pre-tratadas con BAP mostraron en dos de las tres replicas biológicas la represión de estos genes por SPT (Fig. 28). Estos datos apoyan la idea de que *SPT* afecta negativamente la expresión de los genes *SPCH* y *EGL3*. En cambio, cuando el análisis se realizó en las muestras pre-tratadas con BAP se observó que SPT afecta positivamente la expresión de dichos genes, es decir, el pre-tratamiento con BAP cambia la respuesta de estos genes a SPT. Se ha reportado que la aplicación exógena de BAP aumenta el número de tricomas en diferentes partes de la planta. Además, BAP afecta positivamente el nivel de expresión de los genes *GL1* y *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS 2 (GIS2)*, ambos involucrados en la formación de tricomas (Gan et al., 2007; Matías-Hernández et al., 2016). Por lo que el cambio de regulación de los genes *SPCH* y *EGL3* mediado por SPT cuando las muestras son pre-tratadas con BAP puede deberse a que dicho pre-tratamiento afecta positivamente la expresión

de estos genes, de tal manera que cuando SPT es inducido su efecto se ve enmascarado.

CONCLUSIÓN

Los resultados transcriptómicos sugieren que SPT tiene plasticidad regulatoria, la cual es tejido-específico y condición específica.

El análisis de mapas de enriquecimiento muestra que los genes de respuesta a SPT tanto en hoja e inflorescencia participan en diversas funciones biológicas, sugiriendo que SPT podría estar participando en programas de desarrollo adicionales a los explorados hasta el momento.

El pre-tratamiento de citocininas (BAP) modifica la regulación de los genes de respuesta a SPT.

Los análisis fenotípicos indican que SPT participa en el desarrollo de estomas y tricomas en *Arabidopsis*.

El gen *SPT* es necesario para que la acumulación de antocianinas inducida por sacarosa se lleve a cabo de manera correcta, lo que sugiere que es un regulador positivo de esta respuesta.

Los datos de qRT-PCR indican que *SPCH* y *EGL3* son genes de respuesta afectados negativamente por SPT. Además, la regulación de SPT sobre estos genes es modificada por un pre-tratamiento de BAP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alvarez-Buylla ER, Benítez M, Corvera-Poiré A, Chaos Cador Á, de Folter S, Gamboa de Buen A, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Pérez-Ruiz R V., et al** (2010) Flower Development. *Arab B* **8**: e0127
2. **Alvarez J, Smyth DR** (1999) CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* **126**: 2377–86
3. **Alvarez JP, Goldshmidt A, Efroni I, Bowman JL, Eshed Y** (2009) The NGATHA Distal Organ Development Genes Are Essential for Style Specification in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* **21**: 1373–1393
4. **Arratia J, Aguirre J** (2013) **Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes.** *TIP* **16**: 98–108
5. **Bainbridge K, Guyomarc'h S, Bayer E, Swarup R, Bennett M, Mandel T, Kuhlemeier C** (2008) Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* **22**: 810–23
6. **Barp E a, Soares GLG, Gosmann G, Machado a M, Vecchi C, Moreira GRP** (2006) Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L.(Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. *Braz J Biol* **66**: 853–862
7. **Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L** (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* **34**: 525–527
8. **Bulgakov VP, Avramenko T V, Tsitsiashvili GS** (2017) Critical analysis of protein signaling networks involved in the regulation of plant secondary metabolism: focus on anthocyanins. *Crit Rev Biotechnol* **37**: 685–700
9. **Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of

- the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *Plant J* **34**: 13–26
10. **Cai X-T, Xu P, Zhao P-X, Liu R, Yu L-H, Xiang C-B** (2014) Arabidopsis ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation. *Nat Commun* **5**: 5833
 11. **Chen C, Twito S, Miller G** (2014) New cross talk between ROS, ABA and auxin controlling seed maturation and germination unraveled in APX6 deficient Arabidopsis seeds. *Plant Signal Behav* **9**: e976489
 12. **Collins C, Maruthi NM, Jahn CE** (2015) CYCD3 D-type cyclins regulate cambial cell proliferation and secondary growth in Arabidopsis. *J Exp Bot* **66**: 4595–606
 13. **Das PK, Shin DH, Choi S-B, Park Y-I** (2012) Sugar-hormone cross-talk in anthocyanin biosynthesis. *Mol Cells* **34**: 501–507
 14. **Durán-Medina Y, Serwatowska J, Reyes-Olalde JI, de Folter S, Marsch-Martínez N** (2017) The AP2/ERF Transcription Factor DRNL Modulates Gynoecium Development and Affects Its Response to Cytokinin. *Front Plant Sci* **8**: 1841
 15. **Efroni I, Han S-K, Kim HJ, Wu M-F, Steiner E, Birnbaum KD, Hong JC, Eshed Y, Wagner D** (2013) Regulation of Leaf Maturation by Chromatin-Mediated Modulation of Cytokinin Responses. *Dev Cell* **24**: 438–445
 16. **Foreman J, White JN, Graham IA, Halliday KJ, Josse E marie** (2011) Shedding light on flower development: Phytochrome B regulates gynoecium formation in association with the transcription factor SPATULA. *Plant Signal Behav* **6**: 471–476
 17. **Gardiner J, Donner TJ, Scarpella E** (2011) Simultaneous Activation of SHR and ATHB8 Expression Defines Switch to Preprocambial Cell State in Arabidopsis Leaf Development. 261–270
 18. **Girin T, Paicu T, Stephenson P, Fuentes S, Korner E, O'Brien M, Sorefan K, Wood TA, Balanza V, Ferrandiz C, et al** (2011) INDEHISCENT and SPATULA Interact to Specify Carpel and Valve Margin Tissue and Thus Promote Seed Dispersal in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 3641–3653
 19. **Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM** (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. *Plant J* **53**: 814–827
 20. **Gremski K, Ditta G, Yanofsky MF** (2007) The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. *Development* **134**: 3593–

21. **Groszmann M, Bylstra Y, Lampugnani ER, Smyth DR** (2010) Regulation of tissue-specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in Arabidopsis. *J Exp Bot* **61**: 1495–1508
22. **Groszmann M, Paicu T, Alvarez JP, Swain SM, Smyth DR** (2011) SPATULA and ALCATRAZ, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for Arabidopsis gynoecium and fruit development. *Plant J* **68**: 816–829
23. **Groszmann M, Paicu T, Smyth DR** (2008) Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in Arabidopsis. *Plant J* **55**: 40–52
24. **Heisler MG, Atkinson a, Bylstra YH, Walsh R, Smyth DR** (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development* **128**: 1089–1098
25. **Ichihashi Y, Horiguchi G, Gleissberg S, Tsukaya H** (2010) The bHLH transcription factor SPATULA controls final leaf size in arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **51**: 252–261
26. **Ilk N, Ding J, Ihnatowicz A, Koornneef M, Reymond M** (2015) Natural variation for anthocyanin accumulation under high-light and low-temperature stress is attributable to the *ENHANCER OF AG-4 2* (*HUA2*) locus in combination with *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1* (*PAP1*) and *PAP2*. *New Phytol* **206**: 422–435
27. **Jiang Y, Wu K, Lin F, Qu Y, Liu X, Zhang Q** (2014) Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Planta* **239**: 565–575
28. **Josse E-M, Gan Y, Bou-Torrent J, Stewart KL, Gilday AD, Jeffree CE, Vaistij FE, Martínez-García JF, Nagy F, Graham IA, et al** (2011) A DELLA in Disguise: SPATULA Restrains the Growth of the Developing *Arabidopsis* Seedling. *Plant Cell* **23**: 1337–1351
29. **Kalve S, De Vos D, Beemster GTS** (2014) Leaf development: a cellular perspective. *Front Plant Sci* **5**: 362
30. **Kang J, Lee Y, Sakakibara H, Martinoia E** (2017) Cytokinin Transporters: GO and STOP in Signaling. *Trends Plant Sci* **22**: 455–461
31. **Keuskamp DH, Pollmann S, Voeselek LACJ, Peeters AJM, Pierik R** (2010) Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and

- fitness during competition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 22740–4
32. **Kieber JJ, Schaller GE** (2014) Cytokinins. *Arab B* **12**: e0168
 33. **Ko D, Kang J, Kiba T, Park J, Kojima M, Do J, Kim KY, Kwon M, Endler A, Song W-Y, et al** (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 7150–5
 34. **Köllmer I, Schmülling T** (2011) Ectopic expression of different cytokinin-regulated transcription factor genes of Arabidopsis thaliana alters plant growth and development. **168**: 1320–1327
 35. **Lee J-H, Jung J-H, Park C-M** (2017) Light Inhibits COP1-Mediated Degradation of ICE Transcription Factors to Induce Stomatal Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **29**: 2817–2830
 36. **Li T, Jia K-P, Lian H-L, Yang X, Li L, Yang H-Q** (2014a) Jasmonic acid enhancement of anthocyanin accumulation is dependent on phytochrome A signaling pathway under far-red light in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **454**: 78–83
 37. **Li Y, Van den Ende W, Rolland F** (2014b) Sucrose Induction of Anthocyanin Biosynthesis Is Mediated by DELLA. *Mol Plant* **7**: 570–572
 38. **Liljegren SJ, Roeder AHK, Kempin SA, Gremski K, Østergaard L, Guimil S, Reyes DK, Yanofsky MF** (2004) Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* **116**: 843–53
 39. **Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943–50
 40. **MacAlister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC** (2007) Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* **445**: 537–540
 41. **Maes L, Inzé D, Goossens A** (2008) Functional specialization of the TRANSPARENT TESTA GLABRA1 network allows differential hormonal control of laminal and marginal trichome initiation in Arabidopsis rosette leaves. *Plant Physiol* **148**: 1453–64
 42. **Makkena S, Lamb RS** (2013) The bHLH transcription factor SPATULA is a key regulator of organ size in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* **8**: e24140
 43. **de Marcos A, Houbaert A, Triviño M, Delgado D, Martín-Trillo M, Russinova E, Fenoll C, Mena M** (2017) A Mutation in the bHLH Domain of the SPCH Transcription Factor Uncovers a BR-Dependent Mechanism for Stomatal Development. *Plant Physiol* **174**: 823–842

44. **Marcos D, Berleth T** (2014) Dynamic auxin transport patterns preceding vein formation revealed by live-imaging of Arabidopsis leaf primordia. **5**: 1–15
45. **Marsch-Martínez N, de Folter S** (2016) Hormonal control of the development of the gynoecium. *Curr Opin Plant Biol* **29**: 104–114
46. **Marsch-Martínez N, Ramos-Cruz D, Irepan Reyes-Olalde J, Lozano-Sotomayor P, Zúñiga-Mayo VM, de Folter S** (2012a) The role of cytokinin during Arabidopsis gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant J* **72**: 222–234
47. **Marsch-Martínez N, Reyes-Olalde JI, Ramos-Cruz D, Lozano-Sotomayor P, Zúñiga-Mayo VM, de Folter S** (2012b) **Hormones talking**. *Plant Signal Behav* **7**: 1698–1701
48. **Matías-Hernández L, Aguilar-Jaramillo AE, Cigliano RA, Sanseverino W, Pelaz S** (2016) Flowering and trichome development share hormonal and transcription factor regulation. *J Exp Bot* **67**: 1209–1219
49. **Meng L-S, Liu A** (2015) Light signaling induces anthocyanin biosynthesis via AN3 mediated COP1 expression. *Plant Signal Behav* **10**: e1001223
50. **Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A, Bader GD** (2010) Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One* **5**: e13984
51. **Morohashi K, Zhao M, Yang M, Read B, Lloyd A, Lamb R, Grotewold E** (2007) Participation of the Arabidopsis bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events. *Plant Physiol* **145**: 736–46
52. **Moubayidin L, Ostergaard L** (2014) Dynamic control of auxin distribution imposes a bilateral-to-radial symmetry switch during gynoecium development. *Curr Biol* **24**: 2743–8
53. **Mu K, Siegel D, Jahnke FR, Gerrer K, Wend S, Decker EL, Reski R** (2014) *Molecular BioSystems*. 1679–1688
54. **Müller CJ, Larsson E, Spíchal L, Sundberg E** (2017) Cytokinin-Auxin Crosstalk in the Gynoecial Primordium Ensures Correct Domain Patterning. *Plant Physiol* **175**: 1144–1157
55. **Nemhauser JL, Feldman LJ, Zambryski PC** (2000) Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. **3888**: 3877–3888
56. **Nemie-Feyissa D, Heidari B, Blaise M, Lillo C** (2015) Analysis of interactions between heterologously produced bHLH and MYB proteins that regulate anthocyanin biosynthesis: Quantitative interaction kinetics by Microscale

- Thermophoresis. *Phytochemistry* **111**: 21–26
57. **Opitz N, Marcon C, Paschold A, Malik WA, Lithio A, Brandt R, Piepho H-P, Nettleton D, Hochholdinger F** (2016) Extensive tissue-specific transcriptomic plasticity in maize primary roots upon water deficit. *J Exp Bot* **67**: 1095–1107
 58. **Patra B, Pattanaik S, Yuan L** (2013) Ubiquitin protein ligase 3 mediates the proteasomal degradation of GLABROUS 3 and ENHANCER OF GLABROUS 3, regulators of trichome development and flavonoid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* **74**: 435–447
 59. **Pattanaik S, Patra B, Singh SK, Yuan L** (2014) An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, Arabidopsis. *Front Plant Sci* **5**: 259
 60. **Payne CT, Zhang F, Lloyd AM** (2000) GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* **156**: 1349–62
 61. **Payne CT, Zhang F, Lloyd AM** GL3 Encodes a bHLH Protein That Regulates Trichome Development in Arabidopsis Through Interaction With GL1 and TTG1.
 62. **Penfield S, Josse EM, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA** (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol* **15**: 1998–2006
 63. **Pillitteri LJ, Sloan DB, Bogenschutz NL, Torii KU** (2007) Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* **445**: 501–505
 64. **Raines T, Shanks C, Cheng C-Y, McPherson D, Argueso CT, Kim HJ, Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Solano R, Vaňková R, et al** (2016) The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in Arabidopsis. *Plant J* **85**: 134–147
 65. **Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1991) *Biología de las plantas***. Reverté
 66. **Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C** (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**: 507–18
 67. **Reinhardt D, Pesce E-R, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C** (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255–260
 68. **Reyes-Olalde JI, Zuñiga-Mayo VM, Chávez Montes RA, Marsch-Martínez N, de Folter S** (2013) Inside the gynoecium: At the carpel margin. *Trends Plant Sci* **18**: 644–655
 69. **Reyes-Olalde JI, Zúñiga-Mayo VM, Marsch-Martínez N, de Folter S** (2017a)

- Synergistic relationship between auxin and cytokinin in the ovary and the participation of the transcription factor SPATULA. *Plant Signal Behav* **12**: e1376158
70. **Reyes-Olalde JI, Zúñiga-Mayo VM, Serwatowska J, Chavez Montes RA, Lozano-Sotomayor P, Herrera-Ubaldo H, Gonzalez-Aguilera KL, Ballester P, Ripoll JJ, Ezquer I, et al** (2017b) The bHLH transcription factor SPATULA enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoecium. *PLoS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1006726
71. **Reymond MC, Brunoud G, Chauvet A, Martinez-Garcia JF, Martin-Magniette M-L, Moneger F, Scutt CP** (2012) A Light-Regulated Genetic Module Was Recruited to Carpel Development in Arabidopsis following a Structural Change to SPATULA. *Plant Cell* **24**: 2812–2825
72. **Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, Murray JA** (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541–4
73. **Rossignol P, Stevens R, Perennes C, Jasinski S, Cella R, Tremousaygue D, Bergounioux C** (2001) AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genomics* **266**: 995–1003
74. **Schaller GE, Street IH, Kieber JJ** (2014) ScienceDirect Cytokinin and the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **21**: 7–15
75. **Schuster C, Gailloch C, Lohmann JU** (2015) *Arabidopsis* *HECATE* genes function in phytohormone control during gynoecium development. *Development* **142**: 3343–3350
76. **Schuster C, Gailloch C, Medzihradzky A, Busch W, Daum G, Krebs M, Kehle A, Lohmann JU** (2014) A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Dev Cell* **28**: 438–49
77. **Schwechheimer C** (2008) Understanding gibberellic acid signaling—are we there yet? *Curr Opin Plant Biol* **11**: 9–15
78. **Sessions A, Nemhauser JL, McColl A, Roe JL, Feldmann KA, Zambryski PC** (1997) ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**: 4481–91

79. **Sessions RA, Zambryski PC, McCall A, Roe JL, Feldmann KA, Zambryski PC** (1995) Arabidopsis gynoecium structure in the wild and in ettin mutants. *Development* **121**: 1519–32
80. **Sidaway-Lee K, Josse EM, Brown A, Gan Y, Halliday KJ, Graham IA, Penfield S** (2010) SPATULA links daytime temperature and plant growth rate. *Curr Biol* **20**: 1493–1497
81. **Simonini S, Deb J, Moubayidin L, Stephenson P, Valluru M, Freire-Rios A, Sorefan K, Weijers D, Friml J, Østergaard L** (2016) A noncanonical auxin-sensing mechanism is required for organ morphogenesis in arabidopsis. *Genes Dev* **30**: 2286–2296
82. **Smaczniak C, Li N, Boeren S, America T, Dongen W Van, Goerdalay SS, Vries S De, Angenent GC, Kaufmann K** (2012) Proteomics-based identification of low-abundance signaling and regulatory protein complexes in native plant tissues. doi: 10.1038/nprot.2012.129
83. **Sozzani R, Maggio C, Varotto S, Canova S, Bergounioux C, Albani D, Cella R** (2006) Interplay between Arabidopsis Activating Factors E2Fb and E2Fa in Cell Cycle Progression and Development. *Plant Physiol* **140**: 1355 LP-1366
84. **Ståldal V, Sohlberg JJ, Eklund DM, Ljung K, Sundberg E** (2008) Auxin can act independently of *CRC*, *LUG*, *SEU*, *SPT* and *STY1* in style development but not apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *New Phytol* **180**: 798–808
85. **Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2006) Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in Arabidopsis. *J Exp Bot* **57**: 2259–2266
86. **Tian Q, Reed JW** (1999) Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**: 711–21
87. **Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH** (2003) The Arabidopsis Basic / Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *Plant Cell* **15**: 1749–1770
88. **Torii KU** (2015) Stomatal differentiation: the beginning and the end. *Curr Opin Plant Biol* **28**: 16–22
89. **Torii KU, Kanaoka MM, Pillitteri LJ, Bogenschutz NL** (2007) Stomatal development: three steps for cell-type differentiation. *Plant Signal Behav* **2**: 311–3
90. **Tsukaya H** (2013) Leaf Development. *Arab B* **11**: e0163
91. **Vaistij FE, Gan Y, Penfield S, Gilday AD, Dave A, He Z, Josse E-M, Choi G, Halliday KJ, Graham IA** (2013) Differential control of seed primary dormancy in

- Arabidopsis ecotypes by the transcription factor SPATULA. Proc Natl Acad Sci **110**: 10866–10871
92. **Winkel-Shirley B, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S** (2001) Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. PLANT Physiol **126**: 485–493
93. **Wu H, Mori A, Jiang X, Wang Y, Yang M** (2006) The INDEHISCENT protein regulates unequal cell divisions in Arabidopsis fruit. Planta **224**: 971–979
94. **Yang M, Sack FD** (1995) The too many mouths and four lips Mutations Affect Stomatal Production in Arabidopsis. Plant Cell **7**: 2227–2239
95. **Zhang B, Schrader A** (2017) TRANSPARENT TESTA GLABRA 1-Dependent Regulation of Flavonoid Biosynthesis. Plants **6**: 65
96. **Zhang K, Novak O, Wei Z, Gou M, Zhang X, Yu Y, Yang H, Cai Y, Strnad M, Liu C-J** (2014) Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. Nat Commun **5**: 3274
97. **Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A** (2008) The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. Development **135**: 1991–9
98. **Zoulias N, Harrison EL, Casson SA, Gray JE** (2018) Molecular control of stomatal development. Biochem J **475**: 441–454
99. **Zúñiga-Mayo VM, Marsch-Martínez N, 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
100. **Zürcher E, Liu J, di Donato M, Geisler M, Müller B** (2016) Plant development regulated by cytokinin sinks. Science (80-) **353**: 1027–1030

ANEXOS

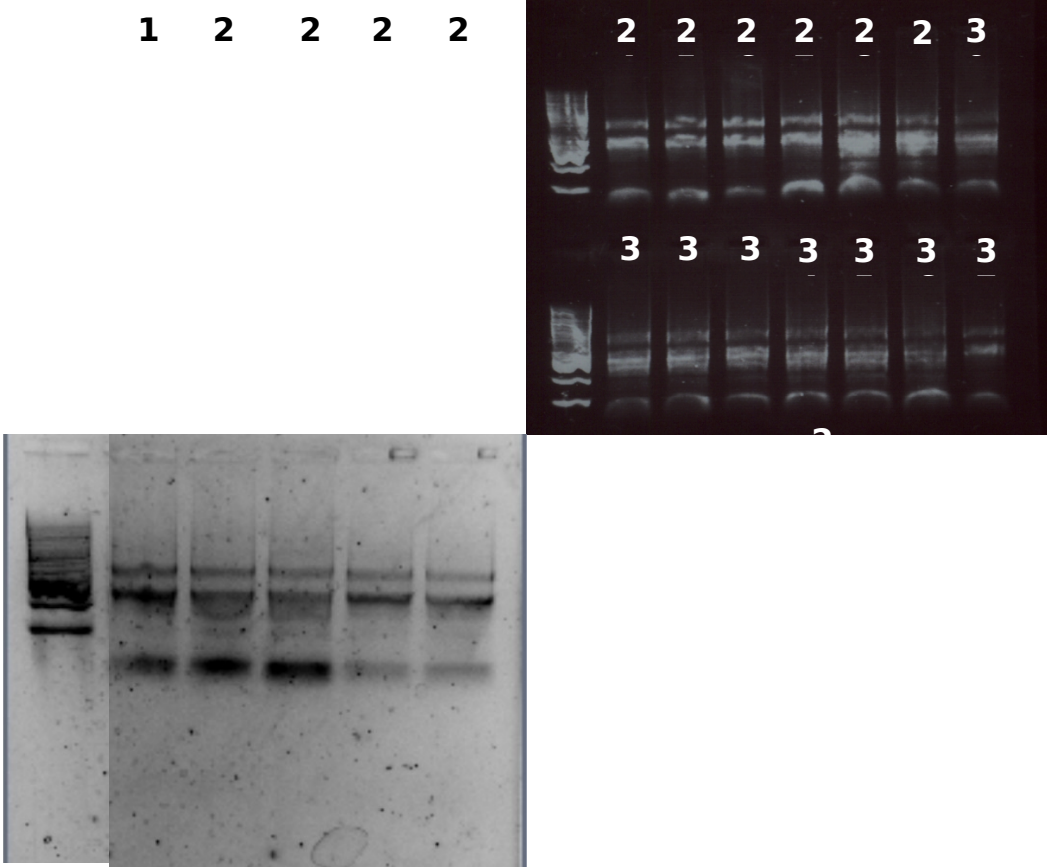
ANEXO1

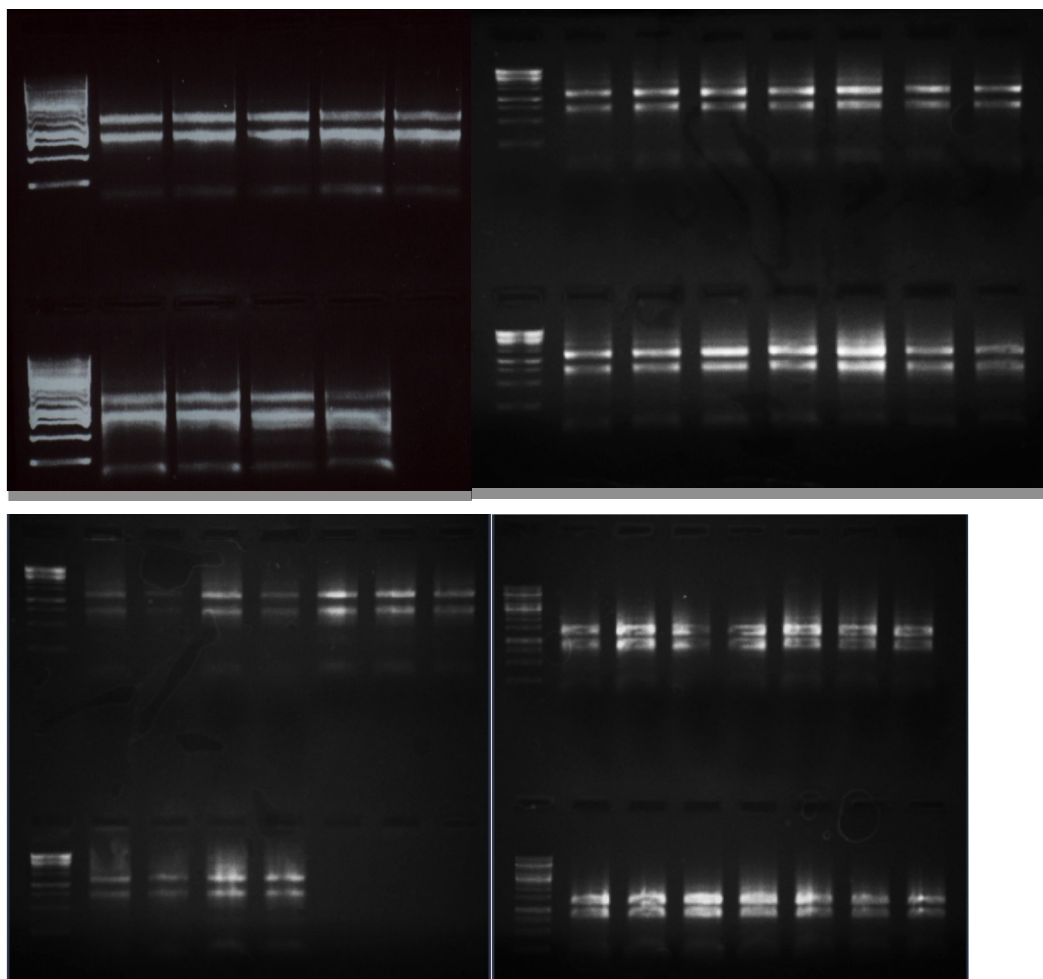
Resultados de nanodrop muestras de SPT y Col-0

Tubo ID	MuestralD	Conc. (ng/ul)	Abs. 260/280	Abs. 260/230	Conc. (ug RNA)
19	COL_I_CK_ND_R1	293	2.18	2.36	14.65
20	COL_I_CK_ND_R2	191.5	2.21	1.75	9.575
21	COL_I_CK_ND_R3	374.2	2.13	2.4	18.86
22	COL_I_AX_ND_R1	362.4	2.16	2.17	18.12
23	COL_I_AX_ND_R2	155.4	2.19	2.04	7.77
24	COL_I_AX_ND_R3	239.2	2.14	1.83	11.96
25	COL_I_MK_ND_R1	358.1	2.19	1.92	17.905
26	COL_I_MK_ND_R2	222.8	2.17	2.22	11.14
27	COL_I_MK_ND_R3	303.3	2.15	2.37	18.17
28	COL_L_CK_ND_R1	446.3	2.15	1.87	22.315
29	COL_L_CK_ND_R2	687.6	2.23	2.19	34.38
30	COL_L_CK_ND_R3	750.4	2.19	2.33	37.52
31	COL_L_AX_ND_R1	641	2.16	2.46	32.05
32	COL_L_AX_ND_R2	901.6	2.22	2.4	45.08
33	COL_L_AX_ND_R3	591.4	2.2	2.34	29.57
34	COL_L_MK_ND_R1	902.7	2.18	2.32	45.135
35	COL_L_MK_ND_R2	559	2.16	2.43	27.95
36	COL_L_MK_ND_R3	457.8	2.12	2.3	22.89
37	SPT_I_MK_D_R1	488.3	2.14	2.38	21.92
38	SPT_I_MK_D_R2	542.7	2.23	2.13	27.13
39	SPT_I_MK_D_R3	652.4	2.2	1.77	32.62
40	SPT_I_CK_D_R1	379.2	2.16	1.73	18.96
41	SPT_I_CK_D_R2	362.1	2.14	2.46	18.1
42	SPT_I_CK_D_R3	466.7	2.14	1.73	23.33
43	SPT_I_AX_D_R1	560.4	2.19	2.19	28.02
44	SPT_I_AX_D_R2	561.7	2.21	2.25	28.08
45	SPT_I_AX_D_R3	349.6	2.17	1.87	17.48
46	SPT_I_MK_ND_R1	594.6	2.21	1.93	27.23

47	SPT_I_MK_ND_R2	530.1	2.23	1.79	26.5
48	SPT_I_MK_ND_R3	405.5	1.83	2.08	20.27
49	SPT_I_CK_ND_R1	307.9	2.13	2.1	15.39
50	SPT_I_CK_ND_R2	360.2	2.14	2.3	18.01
51	SPT_I_CK_ND_R3	350.6	2.16	1.81	17.53
52	SPT_I_AX_ND_R1	428.2	2.14	2.32	21.41
53	SPT_I_AX_ND_R2	438.3	2.12	2.5	21.91
54	SPT_I_AX_ND_R3	390.2	2.15	2.02	19.51
55	SPT_L_MK_D_R1	605.1	2.19	2.15	30.25
56	SPT_L_MK_D_R2	390.2	2.13	1.66	19.51
57	SPT_L_MK_D_R3	330.3	2.16	2.48	16.51
58	SPT_L_CK_D_R1	520	2.2	1.92	26
59	SPT_L_CK_D_R2	247.7	2.18	1.4	12.38
60	SPT_L_CK_D_R3	450	2.12	1.8	22.5
61	SPT_L_AX_D_R1	354.4	2.12	2.36	17.72
62	SPT_L_AX_D_R2	230.9	2.16	1.46	11.54
63	SPT_L_AX_D_R3	278.4	2.18	2.46	13.92
64	SPT_L_MK_ND_R1	413.5	2.13	2.38	20.67
65	SPT_L_MK_ND_R2	391.4	2.14	1.6	19.57
66	SPT_L_MK_ND_R3	376.9	2.14	2.08	18.84
67	SPT_L_CK_ND_R1	563.4	2.2	2.38	20.67
68	SPT_L_CK_ND_R2	224.2	2.17	1.88	11.21
69	SPT_L_CK_ND_R3	369.6	2.13	2.36	18.48
70	SPT_L_AX_ND_R1	461.1	2.14	2.01	23.05
71	SPT_L_AX_ND_R2	421.5	2.14	1.56	21.07
72	SPT_L_AX_ND_R3	376.2	2.13	2.5	18.81

Electroforesis de ARN de muestras de SPT y Col-0





ANEXO 2

Alineamiento con *kallisto* de muestras de SPT y Col-0

Muestra	Total de pares de lecturas	Pares de lecturas alineadas	Porcentaje
COL_I_AX_ND_R1	8,816,665	8,381,072	95.1
COL_I_AX_ND_R2	6,868,691	5,770,155	84.0
COL_I_AX_ND_R3	7,149,661	6,551,453	91.6
COL_I_CK_ND_R1	2,538,653	2,385,821	94.0
COL_I_CK_ND_R2	8,715,263	8,450,829	97.0
COL_I_CK_ND_R3	8,504,056	8,262,887	97.2
COL_I_MK_ND_R2	5,511,439	5,287,930	95.9
COL_I_MK_ND_R3	5,188,725	5,003,259	96.4
COL_L_AX_ND_R2	4,837,082	4,094,339	84.6

COL_L_AX_ND_R3	5,348,605	5,208,468	97.4
COL_L_CK_ND_R1	4,651,856	4,335,384	93.2
COL_L_CK_ND_R2	4,555,773	4,197,145	92.1
COL_L_CK_ND_R3	5,366,461	5,252,911	97.9
COL_L_MK_ND_R1	4,321,109	4,077,118	94.4
COL_L_MK_ND_R2	5,062,492	4,924,179	97.3
COL_L_MK_ND_R3	5,770,494	5,549,249	96.2

Muestra	Total de pares de lecturas	Pares de lecturas alineadas	Procentaje
SPT_I_AX_D_R1	6,094,622	5,870,228	96.3
SPT_I_AX_D_R2	5,305,196	5,045,213	95.1
SPT_I_AX_D_R3	4,475,906	4,317,200	96.5
SPT_I_AX_ND_R1	7,781,699	7,457,744	95.8
SPT_I_AX_ND_R2	6,861,112	6,624,507	96.6
SPT_I_AX_ND_R3	7,811,349	7,539,977	96.5
SPT_I_CK_D_R1	6,863,648	6,605,475	96.2
SPT_I_CK_D_R2	5,992,709	5,788,001	96.6
SPT_I_CK_D_R3	5,281,395	4,977,585	94.2
SPT_I_CK_ND_R1	5,492,436	5,203,087	94.7
SPT_I_CK_ND_R2	6,556,676	6,332,905	96.6
SPT_I_CK_ND_R3	8,170,631	7,912,458	96.8
SPT_I_MK_D_R1	5,398,580	5,181,626	96.0
SPT_I_MK_D_R2	5,307,511	4,982,992	93.9
SPT_I_MK_D_R3	6,063,576	5,892,205	97.2
SPT_I_MK_ND_R1	5,931,275	5,723,039	96.5
SPT_I_MK_ND_R2	6,289,034	6,030,848	95.9
SPT_I_MK_ND_R3	5,989,070	5,833,856	97.4
SPT_L_AX_D_R1	6,642,344	6,478,160	97.5
SPT_L_AX_D_R2	5,535,525	5,345,792	96.6
SPT_L_AX_D_R3	5,435,794	5,280,286	97.1
SPT_L_AX_ND_R1	5,570,143	5,342,096	95.9
SPT_L_AX_ND_R2	5,172,086	4,970,919	96.1
SPT_L_AX_ND_R3	5,672,368	5,531,300	97.5
SPT_L_CK_D_R1	5,535,139	5,034,163	90.9
SPT_L_CK_D_R2	6,548,215	6,315,519	96.4
SPT_L_CK_D_R3	5,795,751	5,461,749	94.2
SPT_L_CK_ND_R1	5,924,932	5,632,903	95.1
SPT_L_CK_ND_R2	5,595,399	5,429,204	97.0
SPT_L_CK_ND_R3	5,037,828	4,884,387	97.0
SPT_L_MK_D_R1	6,568,300	6,269,695	95.5
SPT_L_MK_D_R2	7,276,132	7,054,849	97.0
SPT_L_MK_D_R3	6,355,241	6,206,400	97.7

SPT_L_MK_ND_R1	6,199,681	6,003,246	96.8
SPT_L_MK_ND_R2	5,157,976	4,966,073	96.3
SPT_L_MK_ND_R3	5,896,521	5,642,087	95.7

ANEXO 3

TINCION GUS

Solución tampón para preparar 15 mL.

Reactivos	Sin X-Gluc	Buffer+X-Gluc
Buffer de fosfato de Sodio al 0.1M pH:7	7.5 mL	7.5 mL
EDTA 0.25M	600 μ L	600 μ L
Tritón al 10% (v/v)	150 μ L	150 μ L
Agua	4.5mL	4.5mL
X-Gluc	-	750 μ L
Ferri	750 μ L	750 μ L
Ferro	750 μ L	750 μ L

*X-Gluc: Diluir 20 mg de X-Gluc en 1 mL de DMSO (Preparar el día de uso)

*FAE: Mezclar Etanol absoluto 50%, Formaldehido 5%, Ácido acético al 10%.

ANEXO 4

Secuencia de Oligos de los genes blanco de SPT: *SPCH* y *EGL3* para qRT-PCR

	gen	foward	reverse
AT1G63650	EGL3	CGACCGAACATATTAAG AGGAC	GGAGTGTATTTATCGTCACTT AAGG
AT5G53210	SPCH	CATCTCCTTCAGTTAGTA GTAACC	CTCAATTCCAATCTTGATGGT G

Gen ACTINAS para normalizar.

Gen	Forward	Reverse
------------	----------------	----------------

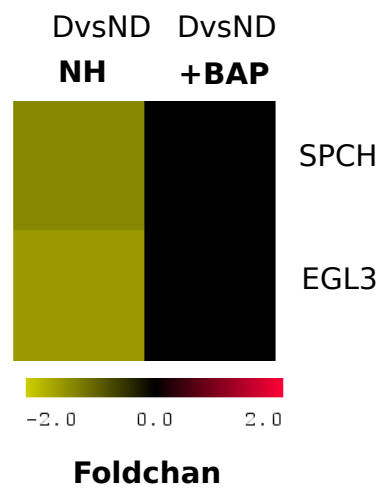
ACTINAS

AATCACAGCACTTGCACC

ATTCCTGGACCTGCCTC

ANEXO 5

Heatmap de los genes de respuesta de SPT: *SPCH* y *EGL3*



NH: tratamiento control “no hormona”

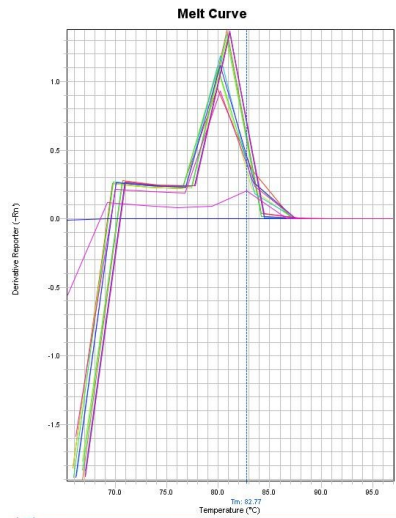
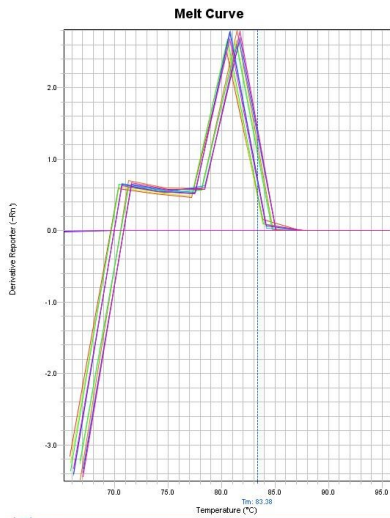
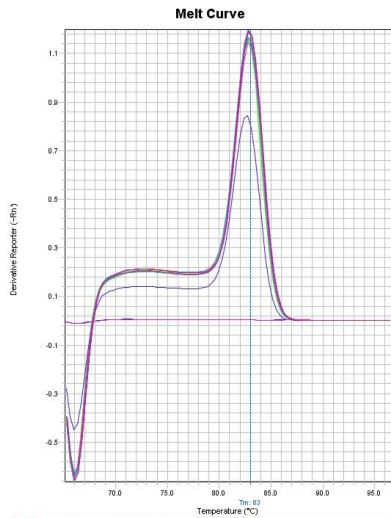
+BAP: pre-tratamiento con citocininas (BAP)

ANEXO 6

Melt Curve obtenidas del experimento de qRT-PCR

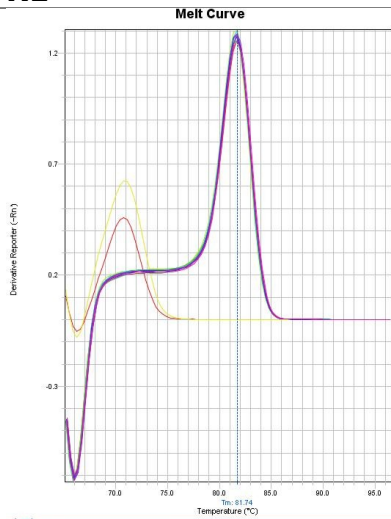
Muestras de inducción de SPT y no inducción de SPT, así como aquellas que fueron pre-tratas con BAP y no inducidas.

<i>ACTINAS</i>		
R1	R2	R3

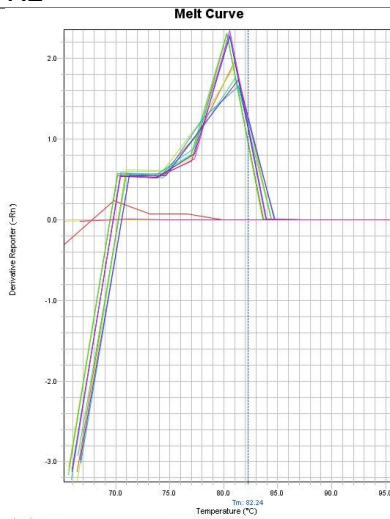


SPCH

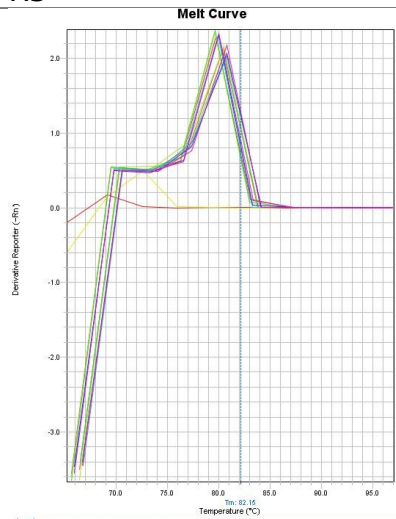
R1



R2



R3

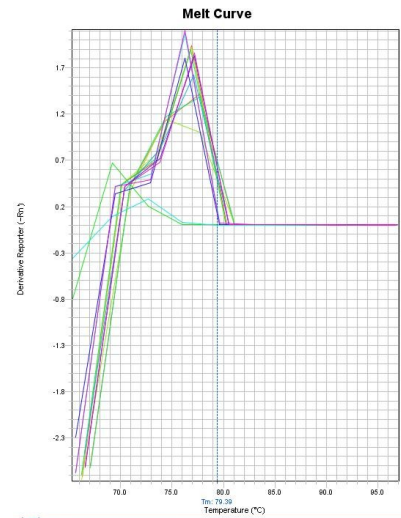
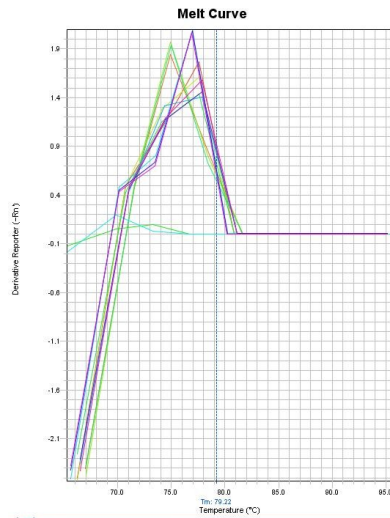
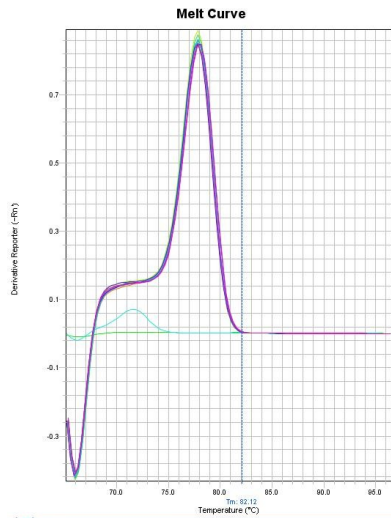


EGL3

R1

R2

R3

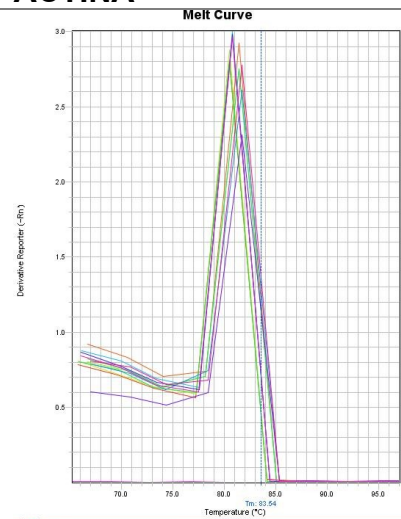
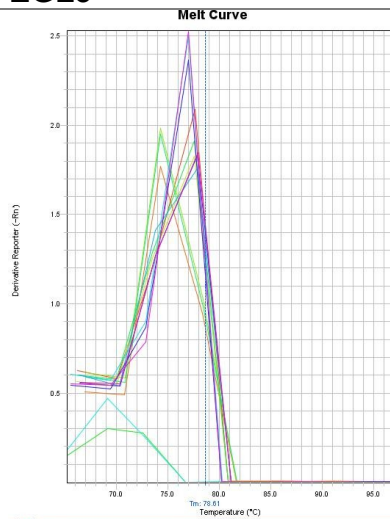
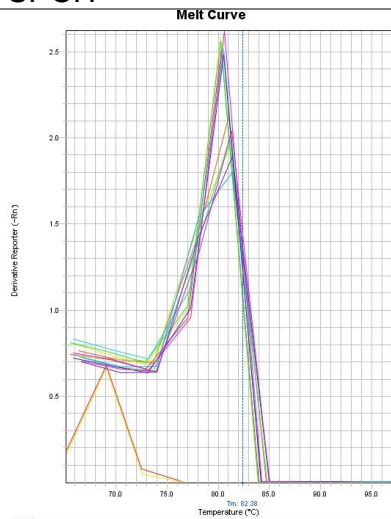


Muestras que fueron pre-tratadas con BAP e inducidas, replicas R1,R2 y R3

SPCH

EGL3

ACTINA



ANEXO 6

Genes de respuesta de SPT involucrados en diferenciación y ciclo celular.

Símbolo	Función involucrada	Otros nombres	Familia	log FC
FLOT1	CICLO CELULAR	FLOT1	---	3.53
ASY1	CICLO CELUALR	ATASY1 // ASY1	SWI/SNF-SWI3	2.86
MPK11	estomas	MPK11 // ATMPK11	---	2.84
TCH3	tricomas	TCH3 // ATCAL4 // CML12	---	2.07
CPK6	estomas	CPK6 // ATCPK6 // ATCDPK3	---	1.99
MLO3	tricomas	ATMLO3 // MLO3	---	1.82
EDA39	estomatal	AtIQM1 // EDA39 // IQM1	---	1.81
WAK2	diferenciación	WAK2	---	1.77
NAP	estomas	NAP // ATNAP // ANAC029	NAC	1.77
MPK3	estomas	ATMPK3 // MPK3 // ATMAPK3	---	1.76
LHT1	diferenciaciónmesófilo	LHT1	---	1.70
MEK1	estomas	MEK1 // NMAPKK // ATMEK1 // MKK1	---	1.56
ML5	ciclo celular	AML5 // ML5	---	1.39
SERK4	estomas	ATSERK4 // BKK1 // BAK7 // SERK4	---	1.34
ML2	meiosis	ML2 // AML2	---	1.34
SKP2B	division cel.	ATSKP2;2 // SKP2B	---	1.31
SYP121	stomatal	SYR1 // SYP121 // AT-SYR1 // ATSYR121 // ATSYR1 // PEN1	---	1.28
EULS3	estomas	ArathEULS3 // EULS3	---	1.24
ATAF2	tricomas	ATAF2 // anac081	NAC	1.22
CML42	tricomas	CML42	---	1.07
PLL4	Forma de hoja	PLL4	---	1.06
PLL5	Forma de hoja	PLL5	---	1.04
MLO2	vascular	ATMLO2 // MLO2 // PMR2	---	0.98
CYCB1;5	CICLINA	CYCB1;5 // CYC3	---	0.94
AT4G01610	diferenciación	AtcathB3	---	0.94
PIL2	luz	PIL2 // PIF6	bHLH	0.94
AT2G47880	diferenciacionvasculatura	CEPD2	---	0.94
HB6	diferenciacion	HB6 // ATHB6	HB	0.94
MKK9	estomas	ATMKK9 // MKK9	---	0.93

MPK5	estomas	MPK5 // ATMPK5	---	0.93
VICTR	estomas	VICTR	---	0.92
ABI1	estomas	AtABI1 // ABI1	---	0.86
MPK1	estomas	MPK1 // ATMPK1	---	0.85
CRK	tricomas	CRK // ARPC5	---	0.83
RHF1A	meiosis	RHF1A	---	0.82
MPK15	estomas	ATMPK15 // MPK15	---	0.74
MPK2	estomas	ATMPK2 // MPK2	---	0.73
CYP711A1	vascular	MAX1 // CYP711A1	---	0.67
AT1G02305	diferenciación	AtcathB2	---	0.61
GRP7	estomas	RBGA3 // GRP7 // ATGRP7 // GR-RBP7 // CCR2	---	0.57
SERK5	estomas	SERK5 // ATSERK5 // BAK8	---	0.53
AT1G25480	estomas	---	---	0.50
PLDALPHA 1	estomatas	PLDALPHA1 // PLD	---	0.46
MKK2	estomas	MKK2 // ATMKK2 // MK1	---	0.42
AT3G26890	meiosis	---	---	0.42
TTG1	diferenciacióntricomas	URM23 // TTG // TTG1 // ATTTG1	---	0.40
MPB2C	estomas	MPB2C	---	0.37
TCP4	diferenciación	MEE35 // TCP4	TCP	-0.38
ACL5	vasculatura	ACL5	---	-0.40
GRF1	proliferación	AtGRF1 // GRF1	GRF	-0.44
iPGAM1	estomatal	iPGAM1	---	-0.44
GTL1	tricomas	GTL1 // ATGTL1 // AT-GTL1	Trihelix	-0.46
AGL24	diferenciación	E	MADS	-0.48
HB-8	diferenciación	HB-8 // ATHB8 // ATHB-8	HB	-0.50
CVP2	vasculatura	CVP2	---	-0.50
SHR	division	SHR // SGR7	GRAS	-0.55
CLE41	diferenciación	CLE41	---	-0.56
CDF1	estomas	CDF1	C2C2-Dof	-0.58
TBL37	tricomas	TBL37	---	-0.58
NOV	auxinas/vasculatura	EMB2597 // NOV	---	-0.59
AT1G22270	division cel	---	---	-0.59
P5CR	vascular	EMB2772 // AT- P5R // P5CR // AT- P5C1	---	-0.60

PGY2	vascular	PGY2	---	-0.62
ESP	meiosis	AESP // RSW4 // ESP	---	-0.63
ZFP4	tricomas	ZFP4	C2H2	-0.65
CYCH;1	ciclocel/ck	CYCH;1	---	-0.65
AT2G40430	division cel	SMO4	---	-0.67
ATMYC1	tricomas	ATMYC1 // myc1	bHLH	-0.68
HB31	diferenciacion	FTM2 // HB31 // ZHD4 // AtHB31	zf-HD	-0.71
PGY1	vascular	PGY1	---	-0.75
CYCP4;1	Ciclo celular	CYCP4;1	---	-0.80
RPL5B	Ciclo celular	OLI7 // RPL5B	---	-0.81
CYCA2;3	Ciclo celular	CYCA2;3	---	-0.81
ATL5	vasculatura	PGY3 // ATL5 // RPL5A // OLI5	---	-0.83
MKK6	estomas	ANQ1 // ATMKK6 // MKK6	---	-0.84
HD2B	diferenciación	ATHD2B // HDT2 // HD2B // HDT02 // HD2 // HDA4 // ATHD2	---	-0.87
AT2G40360	división cel	AtPEP1 // AtPEIP1 // BOP1	---	-0.93
ABCB14	vascular	ATABCB14 // ABCB14 // PGP14 // MDR12	---	-0.96
AGP31	vascular	AGP31	---	-0.96
HB22	diferenciación	MEE68 // ATHB22 // ZHD2 // HB22	zf-HD	-1.13
WOX1	diferenciación	WOX1	HB	-1.46