



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad de Genómica Avanzada

Regulación de miR156 en la embriogénesis de *Arabidopsis thaliana* por el módulo CDK8 de Mediador

Tesis que presenta

BIOL. DANYA FABIOLA CASTRO ECHEVERRÍA

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

En la Especialidad de
Biología de Plantas

Director de Tesis: **DR. CHARLES STEWART GILLMOR III**

Irapuato, Guanajuato.

Febrero de 2017

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Regulación Genética y Epigenética del Desarrollo de la Semilla del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en la Unidad de Genómica Avanzada del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Charles Stewart Gillmor III.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A mi director, el Dr. Stewart Gillmor III, por aceptarme en su laboratorio, por todo el apoyo brindado y guiarme en el camino del conocimiento, que me hicieron crecer profesionalmente. Así como por su paciencia y disponibilidad en todo momento.

A mi comité tutorial, el Dr. Jean Philippe Vielle y el Dr. Stefan de Folter, por transmitirme su pasión a la ciencia, contribuir a mi formación profesional con sus comentarios y sugerencias que enriquecieron esta investigación.

Al Embryo-lab por sus comentarios. En especial a Marcelina García por enseñarme a realizar hibridaciones *in situ* y por las discusiones del proyecto. A Alma Armenta por realizar algunas construcciones y por las discusiones del proyecto. A Elvira Hernández y Manuel Buendía por las profundas discusiones y sugerencias en el proyecto.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) por permitirme llevar a cabo mi investigación en sus instalaciones y a todo su personal que hace que todo funcione de la mejor manera. En especial a Dora Anguiano y Diana Barbosa, por su atención y calidez humana con nosotros los estudiantes cada que requerimos de su ayuda para llevar a cabo nuestros trámites.

Especialmente, quiero agradecer a mi familia por ser mi cimiento, por la unidad y porque nuestro amor crece con las batallas. A mi mamá Bertha Alicia Echeverría Romero y mi papá Roberto Castro Moreno. A mis hermanos Jocelyn Anaid Castro Echeverría y Roberto Castro Echeverría. En especial a mi hermana Jocelyn, por ser mi mejor amiga, escucharme y aconsejarme. No podría haber tenido mejores hermanos y guerreros a mi lado, siempre estaré muy orgullosa de ustedes.

RESUMEN

La embriogénesis es el proceso mediante el cual se desarrolla un nuevo individuo a partir del cigoto. En plantas, la embriogénesis comienza con la fecundación de la célula huevo que dará origen al cigoto. En *Arabidopsis thaliana*, el cigoto sigue una serie de divisiones celulares hasta formarse el embrión maduro. La embriogénesis puede ser regulada a nivel postranscripcional por miRNAs. Entre las familias de miRNAs más conservadas se encuentra la familia de *MIR156*. miR156 es altamente expresado durante la embriogénesis y regula la maduración del embrión. miR156 actúa inhibiendo la expresión de los factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPLs), los cuales proporcionan características adultas a las plantas. En estadio vegetativo, miR156 es regulado por *GRAND CENTRAL (GCT/MED13)* y *CENTER CITY (CCT/MED12)*, dos subunidades del módulo CDK8 de Mediador que también controlan la temporalidad de la formación del patrón del embrión. En el presente trabajo se abordó la hipótesis en la cual *GCT* y *CCT* regulan los patrones de formación de la embriogénesis a través de miR156. La sobreexpresión de miR156 en embriones produce fenotipos similares a mutantes de *gct* y *cct*, sugiriendo que *GCT* y *CCT* regulan de manera negativa a miR156. miR156 se expresa a través de todos los estadios de la embriogénesis, y en todo el embrión y suspensor. También, se determinó la expresión de *MIR156* a nivel transcripcional mediante líneas con promotores de *MIR156* fusionados a GUS, que muestran un patrón de expresión igual que miR156. Por último, para probar si los fenotipos mutantes de *gct* eran debido a la sobreexpresión de miR156, se analizaron embriones de las líneas *mir156a;mir156c;gct* y *gct*. Los porcentajes de fenotipos mutantes en embriones se redujeron en la línea *mir156a;mir156c;gct* a comparación de la línea *gct* en todos los estadios de la embriogénesis. Debido a lo anterior, se concluyó que los fenotipos de embriones mutantes de *gct*, son consecuencia de la sobreexpresión de miR156.

ABSTRACT

Embryogenesis is the process by which a new organism is formed from a single cell, through fertilization of the egg by the sperm, to give rise to the zygote. In *Arabidopsis thaliana* early embryogenesis, the zygote follows an almost invariant series of cell divisions. Embryogenesis can be regulated at the post-transcriptional level by miRNAs. Among the most conserved miRNA families is the MIR156 family. miR156 is expressed throughout embryogenesis, regulating pattern formation and maturation. miR156 acts by inhibiting the expression of SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPLs) transcription factors, which provide adult characteristics to plants. During the vegetative stage, miR156 is regulated by *GRAND CENTRAL (GCT/MED13)* and *CENTER CITY (CCT/MED12)*, two subunits of the CDK8 module of Mediator which are also known to control the timing of pattern formation in embryogenesis. In my thesis, I tested the hypothesis that *GCT* and *CCT* regulate pattern formation in embryogenesis through miR156. Overexpression of *miR156* in embryos produces phenotypes similar to *gct* and *cct* embryos, suggesting that *GCT* and *CCT* normally function to downregulate miR156 during embryogenesis, as they do during vegetative development. miR156 is expressed in all stages of embryogenesis, throughout the embryo and suspensor. *MIR156* expression at transcriptional level was determined using *MIR156A* and *MIR156C* promoter::GUS fusions. These constructs drove GUS expression throughout the embryo and suspensor. Finally, to test whether the mutant phenotypes of *gct* were due to miR156 overexpression, embryo phenotypes in *gct* and *mir156a;mir156c;gct* lines were analyzed. At all stages of embryogenesis, the percentage of *gct* mutant phenotypes was reduced significantly in *gct;mir156a;mir156c* compared to *gct*. I conclude that the aberrant pattern formation in early *gct* embryos is primarily a consequence of miR156 overexpression.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Embriogénesis.....	8
1.2. MicroRNAs en Plantas.....	11
1.3. Estudios funcionales de miR156 y los factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL).....	14
1.4. Mediador en el desarrollo de plantas	15
1.5. GRAND CENTRAL y CENTER CITY en la embriogénesis	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. METODOLOGÍA.....	19
3.1. Condiciones de crecimiento de plantas	19
3.2. Genotipificación de líneas para análisis de embriones.....	19
3.2.1. Genotipificación de <i>GCT</i> y <i>CCT</i> mediante Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS).....	20
3.3. Histología y microscopía.....	22
3.4. Análisis histoquímico de GUS	22
3.5. Extracción de ADN con CTAB para hojas	22
3.6. Hibridación <i>in situ</i>	23
4. RESULTADOS	27
4.1. Caracterización del efecto de la reducción de miR156 en embriones	27
4.2. Caracterización del efecto de la sobreexpresión de miR156 en el estadio vegetativo	29
4.3. Caracterización del efecto de la sobreexpresión de miR156 en embriones	32
4.4. Determinación del nivel del miR156 en embriones <i>mir156a;mir156c</i> , <i>pUBQ3::MIR156C</i> y Col-0 silvestres	34
4.5. Análisis de embriones <i>MIR156A::GUS</i> y <i>MIR156C::GUS</i>	45
4.6. Determinación de la causa del fenotipo morfológico de <i>gct</i> y <i>cct</i>	47
4.6.1 Análisis de fenotipos mutantes en la línea <i>pUBQ10::mim156</i> , en fondos mutantes <i>gct</i> y <i>cct</i>	47
4.6.2 Análisis de fenotipos mutantes en la línea <i>mir156a;mir156c</i> , en el fondo mutante <i>gct</i>	48
4.7. Análisis de la quintuple mutante <i>spl2/9/11/13/15</i>	50

5. DISCUSIÓN	52
6. PERSPECTIVAS.....	57
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

INTRODUCCIÓN

1.1 Embriogénesis

La embriogénesis es el proceso de formación de un nuevo individuo a partir del cigoto. En *Arabidopsis thaliana*, esta comienza con la fecundación de la célula huevo por una de las células espermáticas proveniente del polen. La otra célula espermática se unirá a la célula central, dando origen al endospermo, sustancia de reserva de la semilla. El desarrollo del embrión inicia con la división del cigoto de forma asimétrica, generándose la célula apical y basal. La primera formará la mayor parte del embrión y la segunda dará origen al suspensor. Por medio del suspensor el embrión recibirá los nutrientes necesarios hasta el final de su desarrollo. La célula superior del suspensor formará la hipófisis que posteriormente dará lugar al meristemo apical de la raíz (ten Hove et al., 2015). El embrión pasará a través de una serie de divisiones celulares en diversas orientaciones produciéndose patrones o estadios que se han nombrado según la forma o número de células que adquiere el embrión (Seefried et al., 2014). Al final de la embriogénesis, el cuerpo básico de la planta queda establecido (Laux et al., 2004).

Los embriones de *Arabidopsis thaliana* son un buen modelo para el estudio de la embriogénesis en plantas, debido a que durante su desarrollo se generan patrones de morfogénesis fáciles de identificar, con un reducido número de células (Wendrich y Weijers, 2013). En la distribución espacial del embrión se pueden distinguir varios ejes. A través del eje apico-basal se localiza el meristemo apical del brote y el meristemo apical de la raíz. A través del eje radial se pueden localizar tejidos desde el centro a la periferia, como la provasculatura, el endodermis, el cortex y el protodermo. Los cotiledones poseen eje abaxial y adaxial. Estudios previos indican que el establecimiento de los ejes comienza de manera temprana con la repolarización de la célula huevo una vez convertida en cigoto por el gen *WRKY 2* (Ueda et al., 2011).

Las auxinas son moléculas de señalización que intervienen en procesos de desarrollo y crecimiento en plantas, y su desregulación tiene consecuencias muy severas. Las auxinas intervienen en procesos de desarrollo del embrión, óvulo, polen, gineceo, vasculatura y desarrollo de las estructuras reproductivas en el ápice del brote (Liao et al., 2015; Weijers y Wagner, 2016). En la embriogénesis intervienen en los planos de división e identidad celular. La auxina más abundante es el Ácido Indolacético (IAA), el cual es producido vía IPyA (ácidoindol-3-pirúvico) en dos reacciones enzimáticas mediante las enzimas TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1) y YUCCA (YUC) (Smit y Weijers, 2015).

La vía de regulación por auxinas tiene cuatro componentes básicos: los factores de transcripción AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), las proteínas de inhibición AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA), el complejo de ubiquitina ligasa SKP1-CUL1-F BOX (SCF^{TIR1/AFB}) y las hormonas auxinas. En concentraciones bajas de auxinas las proteínas Aux/IAA permanecen unidas a los ARFs, generándose la inhibición de acción de estos últimos en la regulación transcripcional. Cuando las concentraciones de auxinas se incrementan, se promueve la interacción de Aux/IAA y TIR1/AFB (el receptor de auxina), una parte del complejo ubiquitina ligasa SCF^{TIR1/AFB} y posteriormente comienza la ubiquitinación de Aux/IAA para ser degradado en el proteosoma 26S. Así los ARFs son liberados y pueden llevar a cabo sus funciones vía los elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) en los promotores de sus genes blancos. Los ARFs pueden inhibir o activar la transcripción de estos genes, y la señalización de auxinas esta mediada por la especificidad y selectividad entre sus componentes. En *Arabidopsis* hay 6 proteínas TIR1/AFB, 29 proteínas Aux/IAA y 23 proteínas ARF (Smit y Weijers, 2015; Weijers y Wagner, 2016).

Los genes *MONOPTEROS* (*MP/ARF5*) y *BODENLOS* (*BDL/IAA12*) están involucrados en la regulación de auxinas y se encuentran bien caracterizados. Primero se identificó a *MP* mediante un rastreo genético seleccionando plantas que no formaran raíz. Se identificaron 13 alelos, entre ellos existía una variación

entre un hipocótilo corto o la carencia de hipocótilo, raíz, meristemo apical de la raíz. Posteriormente se hizo un análisis de los embriones y se identificó que desde el estadio octante comienzan divisiones anormales del embrión perdiéndose la identidad de las tiras inferiores que dan origen al hipocótilo, la radícula y el meristemo apical de la raíz, por lo tanto, estas no pueden ser generadas (Berleth y Jürgens,1993). MP/ARF5 actúa como un regulador transcripcional de genes de respuesta a auxinas. En embriones globulares silvestres el RNA mensajero de *MP* es expresado en células subepidermales, en el estadio corazón su expresión se extiende a lo ancho, en la línea media de los cotiledones y en el eje apical-basal del embrión, en el estadio torpedo se expresa en la pro vasculatura de los tejidos, consistente con la formación de la vasculatura. *MP* es muy importante para establecer el tejido vascular de la planta y los patrones de formación basales del embrión, lo cual sugiere que ambos se rigen por señalizaciones que se dan en el eje apico-basal del embrión por auxinas mediante *MP* (Hardtke y Berleth, 1998).

Los embriones mutantes *bdl/iaa12* son muy similares a los fenotipos mutantes de *MP/ARF5*, así como también las plántulas mutantes son insensibles a un análogo de auxina, lo cual indica que está relacionado con la regulación mediada por auxinas (Hamann et al., 1999). *BDL/IAA12* actúa inhibiendo la acción de *MP/ARF5* en la regulación de genes de respuesta a auxina. Esto fue demostrado en base a la observación de la coexpresión espacio-temporal del mRNA de *BDL/IAA12* y *MP/ARF5* en estadios tempranos de la embriogénesis y mediante un sistema de dos híbridos en levadura. Se propuso un modelo en el cual *MP/ARF5* y *BDL/IAA12* interactúan cuando existen bajos niveles de auxinas pero, cuando los niveles se incrementan *MP* es liberado regulando genes de respuesta a auxinas (Hamann et al., 2002).

Cada vez se han comenzado a identificar más genes blancos de *MP/ARF5*. *MP* se encuentra activando a *NO TRANSMITTING TRACT* (se conoce que de manera directa para este gen) y a sus genes parálogos *WIP DOMAIN PROTEIN 4* y *WIP5*, los cuales poseen una función redundante. La mutante de estos tres genes (*nww*) semeja a los fenotipos mutantes de *MP*. La mutante *nww* presenta una división

anormal de la hipófisis en el estadio globular temprano y no se forma la célula con forma de lente, la cual en un embrión silvestre da lugar a el centro quiescente que es necesario para el mantener la integridad del meristemo de la raíz. *MP* se expresa en la hipófisis al igual que los genes *NWW* (Crawford et al., 2015).

1.2 microRNAs en Plantas

Los miRNAs son genes no codificantes de 21 a 24 nucleótidos y regulan a nivel postranscripcional la expresión de otros genes, degradando o inhibiendo la traducción del ARN mensajero (ARNm) de sus genes blanco. Los miRNAs en plantas son altamente complementarios a sus ARNm blanco (Rogers y Chen, 2013; Chen, 2005). Algunos miRNAs tienen como genes blanco a reguladores, transportadores y genes que participan en la síntesis de auxinas como se ha demostrado en mutantes de miRNAs específicos y en mutantes de la enzima DICER-LIKE1 (DCL1) que intervienen en la biogénesis de miRNAs en los cuales estos genes blanco se sobreexpresan (Chen, 2005; Seefried et al., 2014).

En la biogénesis de los miRNAs participan muchas proteínas que se encargan de realizar procesos como la transcripción, adición, cortes y el ensamblaje del ARN maduro estrella resultante para degradar a su ARN mensajero blanco o inhibir la traducción. La biogénesis de los miRNAs comienza con la transcripción del miRNA por la ARN polimerasa II, el transcrito que se genera es llamado ARN primario, posteriormente este será procesado por DCL1, HYPONASTIC LEAVES y SERRATE, generándose un pre-miRNA. Seguidamente, DCL1, que es una endonucleasa RNAsa III, realizará los cortes necesarios para generar el miRNA maduro, a continuación HUA-ENHANCER 1 se encargará de metilar el miRNA maduro generado con el fin de protegerlo de la degradación por otras enzimas. Al final de su biogénesis el miRNA maduro se une a la proteína ARGONAUTE 1 (AGO1) principalmente para formar el Complejo Proteína RNA, comúnmente denominado RISC, que será el que efectúe la acción de regulación de sus genes

blancos (Chen, 2009). Se sabe que en plantas el miRNA maduro puede encontrarse tanto en el citoplasma como el núcleo (Chen, 2005).

La enzima encargada de generar el miRNA maduro es DCL, de los 4 genes presentes en Arabidopsis, *DCL1* es esencial para la biogénesis de la mayoría de los miRNAs, sólo unos pocos miRNAs que han evolucionado recientemente son producidos por DCL4 (Chen, 2005; Chen, 2009). Para analizar la función de los miRNAs, en la embriogénesis ha sido muy importante el estudio de varios alelos mutantes de *dcl1* con el fin de evitar la generación de miRNAs maduros. Los embriones mutantes *dcl1* con actividad nula frenan su desarrollo en el estadio globular, por lo cual, para analizar sus funciones se han estudiado alelos con diferentes niveles de actividad de *dcl1*. Se observaron varias clases de fenotipos mutantes cuando había una mayor dosis de *dcl1*, se afectaba la hipófisis, cuando se redujeron las dosis de *dcl1*, la zona de formación de meristemo de raíz, posteriormente, entre una menor dosis se generaban defectos en el embrión en zonas superiores como en el meristemo del brote y los cotiledones (Seefried et al., 2014). Se han tratado de identificar genes blanco de miRNAs que sean los causantes del fenotipo de *dcl1*, pero sólo se han encontrado genes que son responsables parcialmente del fenotipo (Nodine y Bartel, 2010, Seefried et al., 2014).

En embriones mutantes *dcl1*, también se han realizado estudios con marcadores de identidad celular ya caracterizados y se ha mostrado una desregulación de ellos en varios estadios de la embriogénesis. El linaje celular apical se pierde cuando se analiza mediante el marcador celular de *WUSCHEL RELATED HOMEBOX2 (WOX2)*. El linaje celular basal no se pierde en mutantes *dcl1* cuando se analiza mediante *WUSCHEL RELATED HOMEBOX 8 (WOX8)*. El eje radial se ve afectado como se pudo observar con los marcadores de *ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER 1 (ATML1)* y *PROTODERMAL FACTOR 1 (PDF1)* los cuales se expresan en el protodermo, en mutantes *dcl1* estos se expresan ectopicamente en el suspensor. Los marcadores del primordio vascular y tejido de crecimiento se pierden en mutantes *dcl1* mediante el análisis

con los marcadores *SHORT-ROOT (SHR)* y *SCARECROW (SCR)*, respectivamente. Por otra parte, también se ha observado como la acumulación de auxinas se ve afectada en mutantes de *dcl1* mediante análisis con *DR5rev::GFP*, ya que se pierde la acumulación de auxinas en la hipófisis en estadio globular (Seefried et al., 2014).

Además, se ha demostrado que los genes blanco de los miRNAs también intervienen en la maduración del embrión como se demostró en embriones mutantes de *dcl1*, en los cuales se pudo encontrar una acumulación temprana de clorofila, lípidos y proteínas. Posteriormente, los análisis genéticos demostraron que los genes de maduración son sobreexpresados, así como también se pudieron encontrar genes represores de la maduración bajoregulados (Willmann et al., 2011).

Hasta el momento son muy pocos los estudios funcionales de miRNAs realizados en la embriogénesis (Vashisht y Nodine, 2014). miR156 a través de *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 10 (SPL10)* y *SPL11* previene la expresión de genes de maduración y participa en la morfogénesis de células derivadas de la hipófisis en estadios tempranos de la embriogénesis (Nodine y Bartel, 2010). miR160 regula a *ARF17*, en plántulas resistentes a la degradación del mRNA de *ARF17* por miR160 se pudieron encontrar defectos en los cotiledones como números extra, defectos en los márgenes y células epidérmicas abaxiales alteradas, presumiblemente, debido a defectos en los patrones de formación del embrión (Mallory et al., 2005). miR164 establece la orientación y la separación en los primordios de los cotiledones a través de la regulación de *CUC-SHAPED COTYLEDON 1 (CUC1)* y *CUC2* (Mallory et al., 2004). miR166/165 regula a los factores de transcripción HD-ZIP III (clase III Homeodominio de cremallera de Leucina) los cuales están involucrados en el mantenimiento del meristemo y en la formación de órganos laterales (Williams et al., 2005; Zhu et al., 2011). miR394 actúa reprimiendo a *LEAF CURLING RESPONSIVENESS* en las capas subepidérmicas del meristemo del brote del embrión para el mantenimiento de las células madre (Knauer et al., 2013).

1.3 Estudios funcionales de miR156 y los factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)

MIR156 es una de las familias de miRNAs más conservadas y altamente expresada en plantas (Cuperus et al., 2011; Morea et al., 2016). Aún no se conocen bien todas las funciones de miR156 en la embriogénesis, pero se expresa altamente a través de ella, regula a los factores de transcripción SPL e interviene en la regulación de algunos genes de maduración de la semilla, como se mencionó anteriormente (Nodine y Bartel, 2010).

Una de las etapas del desarrollo en plantas es la fase vegetativa, en la cual sucede un cambio del estadio juvenil a adulto, para posteriormente entrar en la fase reproductiva, en esta se induce la floración. miR156 es necesario y suficiente para la expresión de la fase juvenil. Las plantas sobreexpresantes de miR156 florecen de manera más tardía a comparación de plantas silvestres y poseen características de hojas juveniles como un significativo número de hojas de tamaño pequeño sin tricomas abaxiales, láminas redondeadas y pecíolos largos (Wu y Poethig, 2006; Wu et al., 2009).

miR156 tiene como blanco a 10 de los 16 factores de transcripción *SPL* (*SPL2*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* y *SPL15*). Los *SPLs* tienen algunas funciones en común, y otras independientes. miR156 es responsable del cambio temporal de *SPL3* durante el cambio de fase vegetativa y reproductiva. *SPL3* posee estructuras y funciones muy similares a *SPL4* y *SPL5* y los tres intervienen en el cambio de fase vegetativo y reproductivo. *SPL3*, *SPL4* y *SPL5* inducen la floración y proporcionan algunas características adultas a las hojas como producción de tricomas abaxiales y pecíolos largos, sin embargo, no intervienen en la forma de la hoja. *SPL9* y *SPL10* proporcionan características adultas a las hojas como alargamiento, serración y producción de tricomas abaxiales. Aunque, las hojas de *SPL10* son más redondeadas y serradas en

comparación de *SPL9*. *SPL15* tiene una función redundante con *SPL9*, así como *SPL10* a *SPL11*. miR156 promueve la expresión de miR172, inductor de floración, mediante *SPL9* (Wu y Poethig, 2006; Wu et al., 2009; Xu et al., 2016).

1. 4 Mediador en el desarrollo de plantas

El Mediador es un complejo de subunidades conservado en todos los eucariotas que funciona como un puente entre los factores de transcripción de genes específicos y la RNA Pol II. El Mediador posee una gran flexibilidad conformacional y existen muchos mecanismos a través de los cuales funciona (Tsai et al., 2013). El Mediador está conformado por subunidades: la cabeza, la unidad media, la cola y el módulo CDK8. El módulo CDK8 está integrado por CDK8, Cyclin C, MED12 y MED13 (Allen y Taatjes, 2015). El módulo CDK8 constituye una subunidad muy importante funcionalmente ya que generalmente cuando se encuentra unido al Mediador regula negativamente la transcripción de genes específicos. Cuando el módulo CDK8 se une al mediador se genera un cambio entre el sitio de unión de la polimerasa II y el Mediador de manera que ya no es posible que estas interactúen (Elmlund et al., 2006; Tsai et al., 2013). MED12 regula el silenciamiento epigenético en genes de expresión neuronal, a través del reclutamiento de otras proteínas, elevando los niveles de dimetilación de la Histona 3 Lysina 9 (H3K9me²) (Ding et al., 2008). En ciertos casos, CDK8 también puede promover la transcripción. CDK8 interviene como un regulador positivo en el complejo de elongación de la RNA polimerasa en la iniciación de la transcripción de genes de respuesta sérica en humano, atrayendo a CDK7, P-TEFb y al factor BRD4 (Donner et al., 2010). CDK8 contribuye activando la transcripción con la fosfoacetilación de la H3 S10/K14, marca activa de la transcripción (Meyer et al., 2008)

El Mediador tiene un papel primordial en procesos del desarrollo (Buendía-Monreal y Gillmor, 2016). Los genes *GCT* (*MED13*) y *CCT* (*MED12*) forman parte

del módulo CDK8 de Mediador. *GCT* es homólogo de *MED13* y *CCT* es homólogo de *MED12* en humano. Las mutantes *gct* y *cct* en estadio vegetativo poseen fenotipos en los que se retrasan las características adultas de las plantas, como hojas redondeadas, hojas lisas y producción de tricomas en zonas abaxiales de la hoja ausentes, en lugar de hojas elongadas, serradas y con presencia de tricomas abaxiales en hoja, respectivamente. Estas características son similares a plantas sobreexpresantes de miR156 y se probó que en plantas en estadio vegetativo mutantes de *gct* y *cct*, el miR156 es sobreexpresado, así como que su incremento es fuertemente responsable del retraso en el desarrollo de las plantas. Por otra parte, *GCT* y *CCT* actúan reprimiendo genes específicos de semillas en plántulas jóvenes (Gillmor et al., 2010, Gillmor et al., 2014).

1.5 GRAND CENTRAL y CENTER CITY en la embriogénesis

GCT y *CCT* son esenciales para la formación del patrón del embrión y la temporalidad del desarrollo en la embriogénesis. Como se demostró mediante el marcador periferal-abaxial *KANADI2* con el cual se encontró un retraso en la formación de estas zonas. Las mutantes de *gct* y *cct* poseen patrones de división celular característicos, en el estadio 1-celular la primera división es transversal en cambio en embriones silvestres es longitudinal, como se ha visto en mutantes como *mp* y *bdl* que afectan la respuesta transcripcional a auxinas (Gillmor et al., 2010; Berleth y Jürgens, 1993; Hamann et al., 1999). En el estadio octante se pueden observar las células del embrión elongadas y en el estadio globular se forman células extras entre la hilera inferior del embrión y el suspensor. Posteriormente, en el estadio corazón se reducen los primordios de los cotiledones, así como también se da un alargamiento del meristemo apical del brote y una reducción del meristemo apical de la raíz. En el estadio corazón, la distribución de auxinas en mutantes *mab2/gct* se encuentra alterada (Ito et al., 2011). Como consecuencia, en el estadio de embrión maduro se tienen

cotiledones rudimentarios (Gillmor et al., 2010). Durante la embriogénesis se generan defectos en los cotiledones de plántulas *mab2/gct* y *cct*. Plántulas mutantes de *mab2/gct* son reminiscentes a dobles mutantes de *pin1;pid* y *mab2;pid*, genes involucrados en la regulación de auxinas (Gillmor et al., 2010; Ito et al., 2011).

GCT y *CCT* se expresan a través de la embriogénesis, comenzando su expresión en el estadio 1-celular y en el dermatógeno, respectivamente, hasta el estadio final de embriogénesis. Tanto en *GCT* y *CCT* la expresión se localiza en las células del embrión y la hipófisis en el estadio globular pero, en el estadio corazón la expresión comienza a reducirse y en el estadio de embrión maduro la expresión se encuentra en el tejido vascular y en el meristemo del brote y de la raíz (Gillmor et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estudiar la regulación de miR156 por *GCT* y *CCT* en la embriogénesis de *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar el efecto en la embriogénesis de la pérdida y ganancia de expresión de miR156.

Determinar si *GCT* y *CCT* regulan la expresión de miR156 en embriones.

Determinar si la sobreexpresión de miR156 en mutantes de *gct* y *cct* es la causa del fenotipo morfológico.

3. METODOLOGÍA

3.1. Condiciones de crecimiento de plantas

Las semillas se incubaron a 4°C durante 3 días y después se germinaron en el cuarto de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en el cuarto de crecimiento a 22°C (16h luz/ 8h de oscuridad). Algunas plantas fueron crecidas bajo condiciones de invernadero. Posteriormente para cada planta se verificó su genotipo como a continuación se muestra, para realizar el análisis de embriones.

3.2. Genotipificación de líneas para análisis de embriones

Todas las construcciones fueron introducidas en *Arabidopsis thaliana* Col-0.

La línea doble mutante *mir156a mir156c*, es derivada de la cruce de la línea mutante *mir156a* con una inserción SALK y *mir156c* posee una inserción Ds.

Tabla 1. Amplificación de línea *mir156a* SALK

<i>mir156a</i> (SALK)			
Alelo	Primer	Secuencia	Fragmento
Silvestre	FW 280	AAAGGCTAAAGGTCTCCTCCC	1163 nt
	RV 281	CGCGCTTCACTTAAAATTACG	
Mutante	FW 40	TGGTTCAGGTAGTGGGCCATCG	587-887 nt
	RV 281	CGCGCTTCACTTAAAATTACG	

Tabla 2. Amplificación de líneas *mir156c* con inserción Ds.

<i>mir156c</i> (Inserción Ds en <i>Ler</i>)			
Alelo	Primer	Secuencia	Fragmento
Silvestre	FW 282	ACAGTACTTGCAAGATCCATGAC	1278 nt
	RV 283	TACCACTCCCATCGTGAAAGACCA	
Mutante	RV 6	TCCGTTCCGTTTTTCGTTTTTTAC	1500-600 nt
	FW 280	ACAGTACTTTGCAAGATCCATGAC	

3.2.1. Genotipificación de *GCT* y *CCT* mediante Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS)

Primero se amplificaron los genes de *GCT* y *CCT*. Seguidamente, se realizaron cortes con enzimas de restricción en base a la técnica dCAPS en la cual se aprovecha la mutación de un sólo nucleótido en la secuencia.

Tabla 3. Amplificación de *GCT*.

<i>GCT</i>			
Alelo	Primer	Secuencia	Fragmento
wt	FW 172	ACTGGAGATGGCTTGTAAGCATCCG	200
	RV 173	TCGAAGAAATTCCCAATGCG	

Tabla 4. Amplificación de CCT.

<i>CCT</i>			
Alelo	Primer	Secuencia	Fragmento
wt	FW 170	AGTCCAGCATCAACAAGCC	125
	RV 171	ACTGTAGAAGACGCACCAGATA	

Tabla 5. Sitios de corte por enzimas para bases únicas en los alelos mutantes y silvestres de GCT y CCT.

Gen	Enzima	Secuencia	Notas
<i>CCT</i>	EcoRV	125 pb	<i>cct-1</i> 105 pb + 20 pb
			Silvestre no es cortado
<i>GCT</i>	MspI	200 pb	<i>gct-2</i> no es cortado
			silvestre 175 pb + 25 pb

La línea *pUBQ10::mim156a* fue donada por Scott Poethig, esta línea fue hecha en base al fundamento de la línea mimicry que actúa secuestrando al mRNA maduro mediante una secuencia complementaria con un loop entre los 10-11 nt (Franco-Zorrilla et al., 2007). Así como la cuádruple mutante *mir156a;mir156c;mir157a;mir157c*.

3.3. Histología y microscopia

Las semillas fueron clarificadas con una solución modificada de Hoyer que consiste de 7.5 g de goma arábica, 100 g de cloral hidrato, 5 mL de glicerol y 30 mL de agua, diluida en proporción 1:1 con la solución de dilución que consiste de 7.5 g goma arábica, 5 mL glicerol y 30 mL de agua.

Los embriones fueron clareados con Hoyer y montados en portaobjetos con la ayuda de pinzas. Los embriones fueron observados en un microscopio Leica DM6000 B Nomarski. Se analizaron embriones de todos los estadios de la embriogénesis, tratando de analizar en promedio 200 individuos por estadio.

3.4. Análisis histoquímico de GUS

Las silicuas provenientes de plantas *MIR156A::GUS* y *MIR156C::GUS*, fueron disectadas con pinzas para exponer los óvulos, posteriormente, se tomó la placenta con los óvulos y se incubaron en portaobjetos en el buffer permisivo GUS (0.2% Triton X-100, 2 mM ferrocianuro de potasio, 2 mM de ferricianuro de potasio, 2mM de X-Gluc en N,N dimetilformamida (DMF) en 50 mM de buffer de fosfato de sodio [pH 7.2]) durante toda la noche en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente, los embriones fueron clareados con 50% glicerol y observados en un microscopio Leica DM6000 B Nomarski.

3.5. Extracción de ADN con CTAB para hojas

Se maceró de 3 a 5 cm² de tejido de hoja en un tubo de 2mL en el equipo Mixer MillMM301 Retsch, se programó a una frecuencia de 25 por 30 sec, 2 veces.

Después se agregaron 0.1g de CTAB al Buffer CTAB (100 mM Tris [pH 7.5], 700 mM NaCl, 50 mM EDTA [pH 8.0]) a 65°C. Se agregaron 700 µL de buffer CTAB caliente a las muestras y se mezclaron con vortex, luego se colocaron en el thermo-mixer a 65°C, 350 rpm de 40 a 60 min. A continuación, se agregaron 450 µL de cloroformo:alcohol-isoamilico (24:1) por muestra, y se mezcló por inversión durante 5 min, después se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se transfirieron 600µL del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 600 µL de isopropanol frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de EtOH frío al 70%. Se centrifugó a 7500 rpm durante 6 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar los pellets. Para finalizar, los pellets fueron resuspendidos en 40 µL de agua miliQ.

3.6. Hibridación *in situ*

Se siguió el protocolo de García-Aguilar et al., 2005. Todo material utilizado se limpió con RNAsa y todos los stocks fueron diluidos en agua DEPC.

Primer día:

Las muestras de embriones de *Arabidopsis thaliana* se fijaron en solución fría de 4% paraformaldehído, 2% Tritón X-100 y se dejaron en incubación durante 2 h. Durante este tiempo se cubrieron portaobjetos cargados positivamente con Poly L. lisina y se dejaron secar. La poli L. lisina es muy importante para mantener adheridos los embriones al portaobjetos durante los lavados con calor. Las muestras se lavaron dos veces con 1X PBS 0.1% Tritón X-100 para permeabilizar mejor las semillas. Los embriones se fijaron en los portaobjetos, distribuyéndolos con la ayuda de una pinza por muestra. En un tubo de 0.6 mL, se preparó por muestra, una solución con 150 µl de 30% acrilamida y 150 µl de agua DEPC, cuando los embriones se terminaron de distribuir, evitando que nunca se sequen,

se agregaron 2 μl de APS y 1 μl de TEMED (en este orden), se tomaron 20 μl de la solución por muestra de embriones tempranos y 22 μl por muestra de embriones maduros. Se colocó un cubreobjetos y con las pinzas se eliminaron las burbujas de aire que pudieron haberse generado. Posteriormente, los portaobjetos fueron colocados en una cámara húmeda y se dejaron polimerizar toda la noche a temperatura ambiente.

Segundo día:

Se clareó el tejido en 0.2 M de HCl, para ello se retiró el cubreobjetos y se agregaron 200 μl por muestra, se volvió a colocar el cubreobjetos y se incubó durante 20 min en cámara húmeda a temperatura ambiente (es posible que la cantidad de 0.2 M de HCl haya variado con el fin de que las muestras quedaran bien cubiertas). Posteriormente, se retiraron los cubreobjetos y se lavaron las muestras consecutivamente con agua DEPC, 1X PBS y agua DEPC, en una jarra Coplin durante 5 min cada vez.

Las muestras se digirieron en 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K en su buffer proteinasa K (50 mM EDTA, 100 mM Tris [pH 8]) en una jarra Coplin durante 30 min a 55°C, fue muy importante ser muy exacto con el tiempo de este paso. Después, con el fin de parar la digestión, se lavó con agua DEPC, 1X PBS y glicina (2 mg/mL), en una jarra Coplin durante 2 min cada vez. Se incubó en 4% formaldehído (diluido en 1X PBS), en cámara húmeda durante 20 min a temperatura ambiente (post-fijación).

Posteriormente, se incubó en solución de hibridación (120 μl por muestra) en cámara húmeda durante 2 h a 55°C. Durante este momento se fue preparando la sonda. La sonda Locked Nucleic Acid (LNA) miR156 fue ordenada directamente a EXIQON. Se trabajó con una concentración de 2.5 pM de la sonda LNA miR156. A continuación, se presentan las cantidades necesarias para procesar una muestra: 1 μl de sonda (se incubó durante 5 min a 75°C), 9 μl de 50% formamida (se incubó durante 5 min a 75°C), 90 μl de buffer de hibridación (6X SSC, 3% SDS, 50% formamida, 0.1 mg/mL tRNA yeast) (se incubó a 55°C).

Se retiró el exceso de buffer de hibridación y se tiraron los cubreobjetos. Se agregaron 100 µl por muestra de la sonda y se incubaron en cámara húmeda durante toda la noche a 60°C. Se necesitaron entre 14 y 16 h para hibridar.

Tercer día:

Se retiró la solución con la sonda para ello, primero se retiró el exceso de los portaobjetos y después se retiraron los cubreobjetos. Se realizaron dos lavados con la solución 0.2 SSC más 0.1% SDS, cada vez se dejó en agitación gentil durante 10 min a 55°C en una jarra Coplin. Posteriormente, se lavó en 2X SSC en jarra Coplin en agitación gentil por 2 min a temperatura ambiente y se incubó en RNAsa (10 µg/mL) en 2 SSC durante 30 min a 37°C en jarra Coplin sin agitación. La digestión se detuvo lavando con 2X SSC durante 2 min a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces en 2X SSC más 0.1% SDS durante 10 min cada vez a 55°C con agitación gentil en jarra Coplin. Se lavó en 2X SSC en jarra Coplin durante 2 min a temperatura ambiente. Se lavó en 1X TBS en jarra Coplin durante 2 min a temperatura ambiente. Después, se incubó en 0.5% agente bloqueador (Roche) en 1X TBS (antes de agregar el agente bloqueador 0.5% (Roche) se calentó el 1X TBS sin que hirviera para que este se disolviera y se colocó en agitación) durante 2 h en agitación gentil. Posteriormente, se lavó en 1X TBS durante 2 min a temperatura ambiente en jarra Coplin.

Se incubó en anticuerpo anti-dioxigenin-conjugated diluido 1:1000 en 1% BSA en 1X TBS en cámara húmeda con agitación gentil durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó cuatro veces en 1X TBS más 0.5% BSA y 1% Tritón X-100 en jarra Coplin con agitación gentil durante 10 min cada vez a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó en buffer de detección (100 mM Tris [pH 9.5], 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1 Tween 20, 1 mM levamisol) con agitación gentil durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, se incubó en cámara húmeda durante toda la noche 0.34 mg/mL NBT más 0.175 mg/mL BCIP diluido en buffer de detección más levamisol.

Cuarto día:

Se detuvo la reacción de detección con buffer TE en jarra Coplin. Por último, las muestras se montaron en 20 μ l de glicerol al 50% y se observaron en un microscopio Leica DM6000 B Nomarski.

Soluciones:

Buffer de hibridación (6X SSC, 3% SDS, 50% formamida, 0.1 mg/mL tRNA yeast), 10X PBS (1.3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄, se aforó a 1L con agua destilada, autoclave), 10X TBS (4M NaCl, 1M Tris-HCl [pH 7.5], se aforó a 1L con agua destilada, autoclave), 20X SSC (3M NaCl, 0.3 M NaCitrato₂ H₂O, se aforó a 1L con agua destilada, autoclave), agua DEPC (200 μ L DEPC en 1 L de agua destilada), TE 8 (10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización del efecto de la reducción de miR156 en embriones

El *MIR156A* y *MIR156C* son los dos genes pertenecientes a la familia *MIR156* que se expresan en embrión, como se pudo identificar en el año 2014, en un transcriptoma realizado previamente a este estudio en embriones globulares silvestres y mutantes de *SERRATE* (Armenta, Lepe y Gillmor, datos no publicados). Para conocer el efecto de la reducción de miR156 en embriones se utilizaron distintas líneas como estrategia. Las líneas utilizadas en este análisis fueron la línea doble mutante *mir156a;mir156c* y la cuádruple mutante *mir156a;mir156c;mir157a;mir157c*. Esta cuádruple mutante fue utilizada debido a que miR157 al igual que miR156 tiene como blanco a los factores de transcripción SPL.

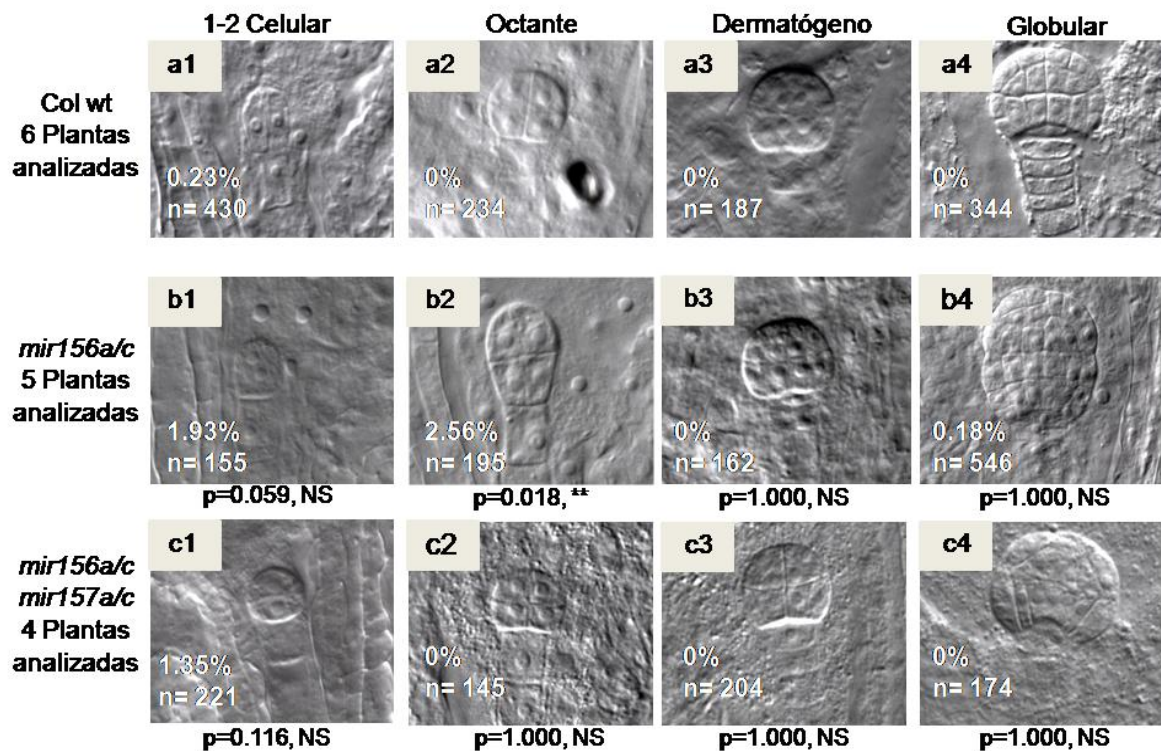


Figura 1. Embriones mutantes de *mir156a mir156c* generan un bajo efecto en la embriogénesis. En las imágenes se muestran los fenotipos de embriones anormales en los estadios que fueron localizados. Embriones silvestres (a), *mir156a mir156c* (b) y *mir156a mir156c mir157a mir157c* (c).**p<0.05; NS, diferencia no significativa entre los porcentajes de embriones anormales entre la línea mutante y silvestre. 27

No se observaron fenotipos en embriones de la línea *mir156a;mir156c* en la mayoría de los estadios (figura 1 b1, b3-4), excepto en la etapa octante, debido a que se observó un fenotipo con las células superiores e inferiores más elongadas que en embriones silvestres (Figura 1 b2). En la línea *mir156a;mir156c;mir157a;mir157c* no se observaron fenotipos (Figura 1 c1-c4). En ambas líneas el tiempo de desarrollo del embrión fue similar que en embriones silvestres.

Otra estrategia utilizada para conocer el efecto de la reducción de miR156 en embriones, como alternativa a las líneas mutantes, fue el análisis de embriones de la línea mimicry *pUBQ10::mim156* la cual actúa secuestrando al miR156 mediante una secuencia imperfectamente complementaria (Franco-Zorrilla et al., 2007). No se observaron fenotipos en embriones de la línea mimicry *pUBQ10::mim156*, el tiempo de desarrollo fue similar que en los embriones silvestres (Figura 2).

Con el análisis de las líneas mutantes y mimicry, pudimos observar que la reducción del nivel de miR156 en los embriones tiene un bajo efecto en el desarrollo del embrión. El miR156 resultó ser más necesario en el estadio octante aunque, el porcentaje de fenotipos obtenidos en este estadio es muy bajo y se conoce que la mutante *mir156a;mir156c* no es nula, como se encontró en los ensayos de hibridación *in situ* que serán descritos posteriormente. Respecto a la línea mimicry se desconoce si se encuentra reduciendo los niveles de miR156 en el embrión. El fenotipo de plantas *pUBQ10::mim156* en la etapa vegetativa y reproductiva indican que la construcción se encuentra reduciendo los niveles de miR156 en estas etapas.

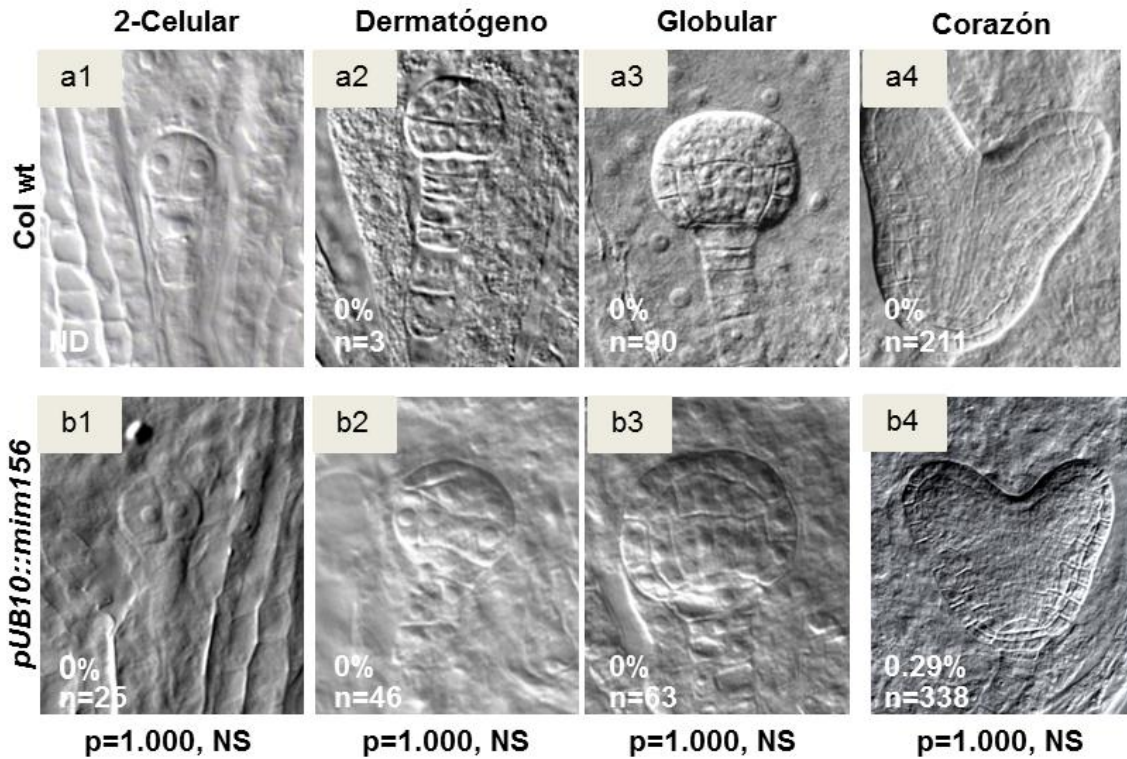


Figura 2. Embriones de la línea mimicry *pUBQ10::mim156*. Embriones silvestres (a) y de la línea *pUBQ10::mim156* (b). NS, diferencia no significativa entre los porcentajes de embriones mutantes entre la línea mimicry *pUBQ10::mim156* y silvestre.

4.2 Caracterización del efecto de la sobreexpresión de miR156 en el estadio vegetativo

Para conocer el efecto de la sobreexpresión de miR156, se utilizaron líneas sobreexpresantes de *MIR156*. Para el análisis de líneas sobreexpresantes, se probaron varios promotores que se conoce se expresan en el embrión a diferentes niveles (Figura 3). Primero, se analizaron líneas sobreexpresantes del *MIR156A* con el promotor UBQ10, por ser éste el más fuertemente expresado, como resultado se obtuvieron plantas muy afectadas en el fenotipo vegetativo que

mostraron un retraso en el tiempo de floración, mayor número de hojas juveniles, pérdida de la dominancia apical y una marcada semi-esterilidad, siendo esto último no muy adecuado para nuestro análisis. Por ello, en el laboratorio se realizaron nuevas líneas sobreexpresantes por Alma Armenta, para el *MIR156A* y *MIR156C* considerando al promotor UBQ3 el cual es más débil en embriones en comparación de UBQ10.

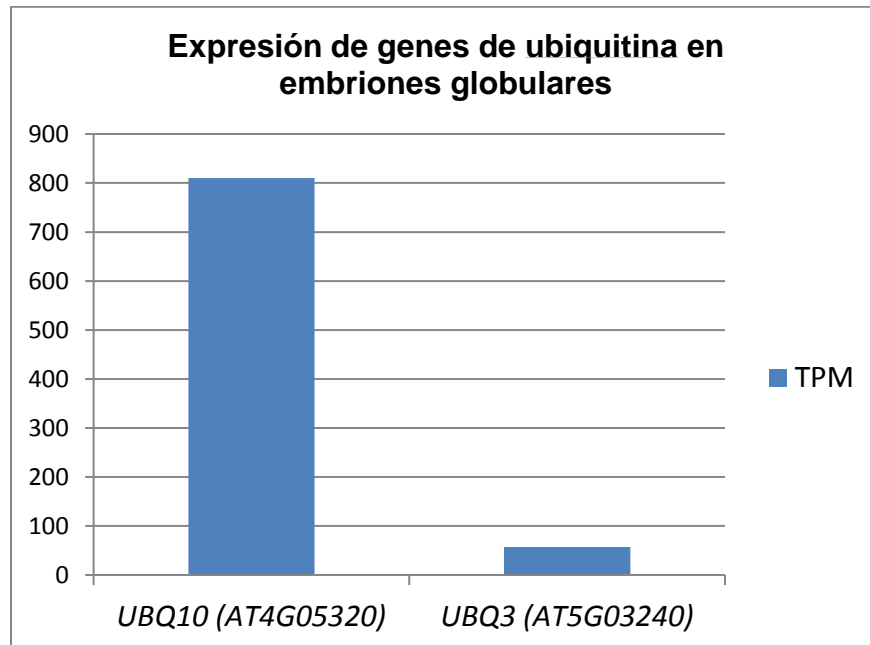


Figura 3. Expresión de genes de ubiquitina en embriones globulares (Raju D. del National Research Council Canada, datos no publicados).

Las líneas independientes de plantas sobreexpresantes de *MIR156A* y *MIR156C* bajo el promotor UBQ3 resultaron estar menos afectadas en comparación a las líneas independientes de plantas sobreexpresantes *pUBQ10::MIR156A*. Las líneas independientes de plantas *pUBQ3::MIR156A* no mostraron fenotipo en estadio vegetativo así como en embriones (Figura 4b), pueden ser varias las causas por las cuales no se observa un fenotipo en éstas plantas, entre ellas que el promotor *pUBQ3* sea muy débil para generar la sobreexpresión del *miR156*, que la construcción tenga algún defecto o que las condiciones ambientales influyan en el procesamiento del ARN maduro. Las líneas independientes *pUBQ3::MIR156C*

mostraron un fenotipo menos afectado que las líneas *pUBQ10::MIR156A*, al igual que en estas se puede observar un retraso en la floración en plantas, mayor número de hojas juveniles, pérdida de la dominancia apical pero, la semi-esterilidad se redujo en comparación a las plantas *pUBQ10::MIR156A* y se observaron raíces muy cortas (Figura 4a). Como se esperaba, las plantas sobreexpresantes de miR156 tienen un retraso en la floración al igual que las plantas mutantes *gct* y *cct* (Gillmor et al., 2014).

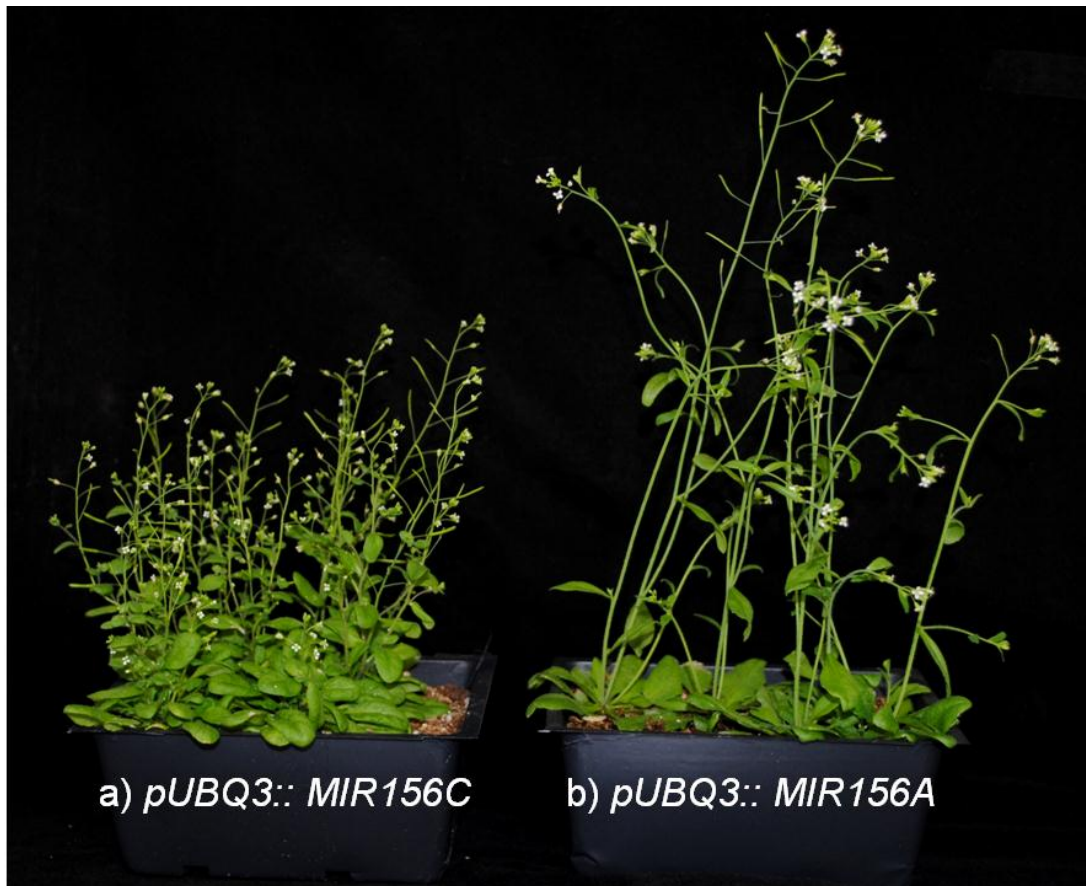


Figura 4. Plantas de la línea *pUBQ3::MIR156A* y *pUBQ3::MIR156C* en estadio vegetativo. Las plantas T1 de la línea *pUBQ3::MIR156C* tienen un fenotipo característico con un retraso en la floración, mayor número de hojas juveniles, pérdida de la dominancia apical, raíces cortas y silicuas pequeñas (a) en cambio, la línea *pUBQ3::MIR156A* no mostró fenotipo (b).

4.3 Caracterización del efecto de la sobreexpresión de miR156 en embriones

Debido a los resultados anteriormente mostrados, las líneas sobreexpresantes *pUBQ3::MIR156C* fueron elegidas para la caracterización de los fenotipos sobreexpresantes de miR156 en la embriogénesis. Las plantas *pUBQ3::MIR156C* tuvieron una menor semi-esterilidad en comparación de las plantas *pUBQ10::MIR156A*, técnicamente esto nos proporcionó la facilidad de obtener un mayor número de embriones sin disectar un gran número de silicuas. Posteriormente, confirmamos la sobreexpresión de miR156 en embriones mediante ensayos de hibridación *in situ*. Ya que el estadio vegetativo tiene fenotipo, en un futuro, sería conveniente realizar el análisis de embriones provenientes de cruza de plantas silvestres con polen de plantas *pUBQ3::MIR156C* para descartar efectos pleiotrópicos en los embriones sobreexpresantes de miR156.

En 14 líneas independientes de plantas *pUBQ3::MIR156C* analizadas, la sobreexpresión de miR156 en embriones generó varios fenotipos a través de los estadios. En cada etapa de la embriogénesis se pueden considerar fenotipos que son representativos de los defectos causados por la sobreexpresión de miR156. En el estadio octante se pudo observar como fenotipo representativo la primera división del embrión transversal al eje longitudinal, en embriones silvestres la división es paralela al eje longitudinal (Figura 5 d1), en el estadio dermatógeno se comenzaron a formar las hileras extra celulares, que no se generan en embriones silvestres, entre la hilera inferior del embrión y el suspensor (Figura 5 d2), en el estadio globular se puede observar un fenotipo derivado de las hileras extra celulares, que se originaron en el estadio anterior, estas hileras extra celulares se conservan y sus divisiones generan un aumento del número celular a comparación del estadio anterior (Figura 5 d3), en el estadio corazón tardío se pueden observar cotiledones más anchos y cortos en comparación de los cotiledones silvestres, así como la carencia del meristemo apical que se encuentra en embriones silvestres (Figura 5 d4). Los fenotipos anteriormente descritos, son similares a los reportados

en embriones mutantes de *gct* y *cct* a través de la embriogénesis (Gillmor et al., 2010), lo que sugiere que estos son generados por la sobreexpresión de miR156.

Se analizó una segunda generación de embriones sobreexpresantes de *MIR156C* provenientes de 9 plantas hemicigotas. Nuevamente, se observaron fenotipos de embriones similares a mutantes de *gct* y *cct* a través de los estadios de embriogénesis. Para cada estadio se pueden considerar fenotipos que son representativos. En el estadio octante se observó un alargamiento de las células inferiores y superiores del embrión en comparación de embriones silvestres (Figura 5 e1), en el estadio dermatógeno se observaron hileras extras celulares, que no se presentan en embriones silvestres, entre la hilera inferior del embrión y la hipófisis (Figura 5 e2), en el estadio globular se conservaron las hileras extra celulares del estadio anterior con un mayor número celular (Figura 5 e3), en el estadio corazón tardío se observaron cotiledones más cortos en comparación de cotiledones silvestres (Figura 5 e4).

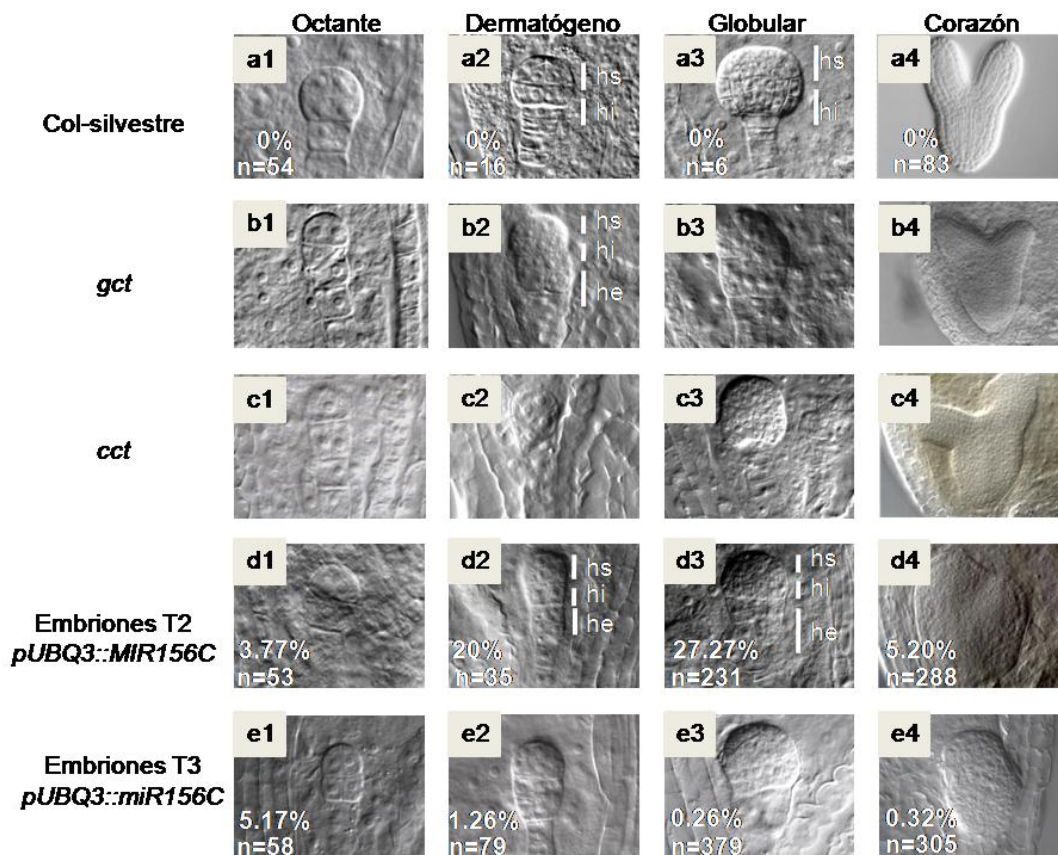


Figura 5. Los defectos causados por la sobreexpresión de *MIR156C* son similares a los fenotipos mutantes de *gct* y *cct*. En los embriones silvestres se muestra la hilera superior de células (hs), y la hilera inferior de células (hi) (a), en los fenotipos de embriones *gct*, se puede observar la generación de hileras extra celulares (he) (b), al igual que en los fenotipos de embriones *cct* (c) y los fenotipos generados por la sobreexpresión de miR156: embriones T2 *pUBQ3::MIR156C* provenientes de 14 plantas hemicigotas (d). Embriones T3 *pUBQ3::MIR156C* provenientes de 9 familias de plantas hemicigotas (e).

En esta nueva generación de embriones se observó una considerable reducción del porcentaje de fenotipos mutantes generados por la sobreexpresión de miR156, será necesario realizar estudios posteriores para determinar la causa de esta reducción en el porcentaje de fenotipos anormales. Algunas posibilidades que pueden explicar esta reducción de fenotipos anormales entre las generaciones es la variación en el ambiente de invernadero en el que crecieron las plantas. Otra posibilidad, es que el transgén esté siendo silenciado mediante el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi).

4.4 Determinación del nivel del miR156 en embriones *mir156a;mir156c*, *pUBQ3::MIR156C* y Col-0 silvestre.

En el estadio vegetativo la línea *mir156a;mir156c* florece de manera temprana en cambio, la línea sobreexpresante *pUBQ3::MIR156C* florece de manera tardía a comparación de las plantas Col silvestres (Figura 6).



Figura 6. Plantas en estadio vegetativo de la línea *mir156a/c* (en medio), *pUBQ3::MIR156C* (derecha) y Col silvestre (izquierda), utilizadas para el análisis de hibridación *in situ* en embriones.

Para conocer el nivel de expresión y la localización del ARN maduro del miR156 a través de la embriogénesis se analizaron embriones silvestres mediante ensayos de hibridación *in situ*. Así como también, mediante esta técnica, se analizaron embriones de las líneas *mir156a;mir156c* y *pUBQ3::MIR156C*, para corroborar la reducción y sobreexpresión del miR156 en los embriones, respectivamente.

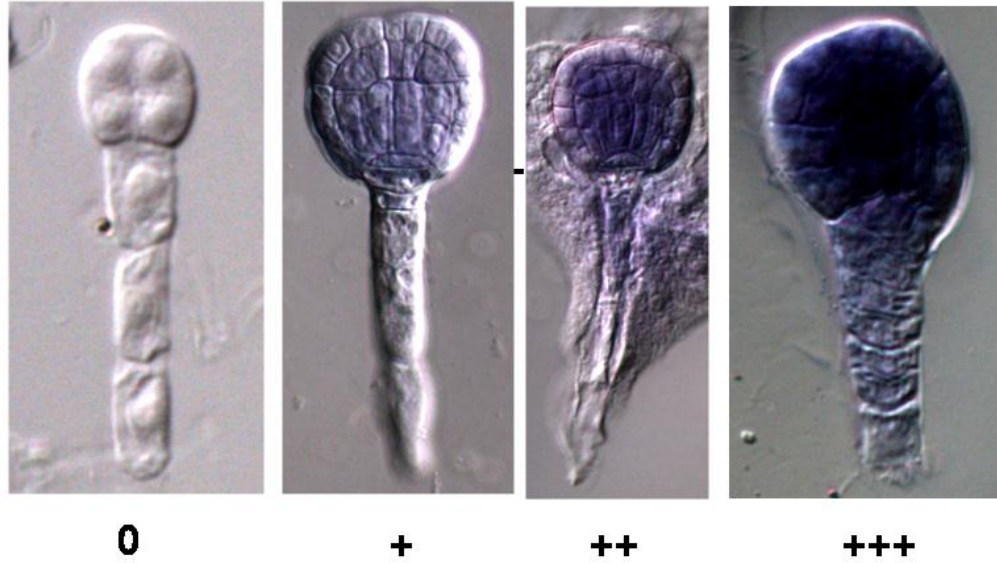
En el análisis de la hibridación *in situ* se realizó una clasificación para los embriones de acuerdo al nivel de expresión del miR156 y se establecieron diversas categorías arbitrarias, siendo éstas: expresión nula (0), poca expresión (+), expresión media (++) y expresión fuerte (+++) (Figura 7). Posteriormente, se

realizó un conteo de embriones asignándoles una categoría según el nivel del miR156 detectado en cada estadio de la embriogénesis (Figura 8).

La hibridación *in situ* no ha sido considerada como una técnica cuantitativa, sin embargo, por la naturaleza de las líneas *mir156a;mir156c*, *pUBQ3::MIR156C* y silvestre es posible detectar tendencias, más no los niveles exactos de expresión, en cada una de ellas y comparar entre ellas por estadio. La línea silvestre puede ser considerada como un control para detectar la tendencia del nivel de expresión normal en los estadios de la embriogénesis.

El ensayo de hibridación *in situ* fue realizado bajo las mismas condiciones, esto implica que también se utilizó la misma concentración de sonda (2.5 pM) en las líneas *mir156a;mir156c*, *pUBQ3::MIR156C* y silvestre, esta concentración fue elegida porque nos proporcionó una señal clara. Posiblemente, la permeabilidad del embrión puede variar por estadio ya que va aumentando el número celular y se va formando el tejido, aun así, se está comparando el mismo estadio entre las tres líneas de embriones. Respecto, a la concentración de sonda, esta influye en la intensidad de la señal. Una baja concentración de sonda puede ocasionar una baja señal por no alcanzar a hibridar en todos los ARNs mensajeros homólogos. Una alta concentración de sonda no debería afectar tanto porque solamente se debe unir la necesaria a sus ARNs homólogos y la demás puede ser removida con la RNAsa y los lavados.

Los embriones de cada línea mostraron tendencias en el nivel de expresión del miR156 en cada estadio y serán presentados a continuación.



Nivel de expresión de miR156

Figura 7. Clasificación de los niveles de expresión de miR156 en hibridaciones *in situ*.

		1/2 Celular	Octante	Globular	Corazón	Cotiledón doblado	Embrión maduro
0	wt	15	4	0	0	0	0
	mir156a/c	22	18	0	0	0	0
	OE1	2	1	0	0	0	0
	OE2	3	0	2	0	0	0
	OE3	1	1	0	0	0	0
+	wt	13	12	8	1	0	0
	mir156a/c	0	1	4	13	0	0
	OE1	4	3	4	3	0	2
	OE2	1	7	11	9	0	0
	OE3	0	1	6	6	0	0
++	wt	2	0	7	10	19	17
	mir156a/c	0	0	4	10	0	0
	OE1	2	6	6	10	4	6
	OE2	2	2	26	6	0	0
	OE3	0	2	2	5	0	0
+++	wt	0	0	4	2	1	1
	mir156a/c	0	0	0	0	0	0
	OE1	0	0	5	13	0	6
	OE2	0	0	26	10	0	0
	OE3	0	0	2	10	3	1

Figura 8. Niveles de expresión de miR156 en embriones a través de los estadios de embriogénesis en la línea *pUBQ3::MIR156C 1* (OE1), *pUBQ3::MIR156C 2* (OE2), *pUBQ3::MIR156C 3* (OE3), *mir156a/c* y Col silvestre (wt).

En el estadio 1/2 celular, para la línea silvestre se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a expresión media, la tendencia del nivel de expresión fue nula en los embriones silvestres para este estadio (Figura 9 a). En la línea *mir156a;mir156c* se observaron embriones solamente con el nivel de expresión de miR156 nula (Figura 9 b). En la línea *pUBQ3::MIR156C 1* (OE1) se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a expresión media, la tendencia del nivel de expresión de miR156 fue poca en los embriones OE1 para este estadio (Figura 9c). En la línea *pUBQ3::MIR156C 2* (OE2) se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a expresión media, la tendencia del nivel de expresión fue nula en los embriones OE2 para este estadio. En la línea *pUBQ3::MIR156C 3* (OE3) solamente se observó un embrión para este estadio, el cual mostró un nivel de expresión nulo del miR156 (Figura 8). En este estadio, se puede observar que las líneas sobreexpresantes si están aumentando los niveles del miR156 en embriones.

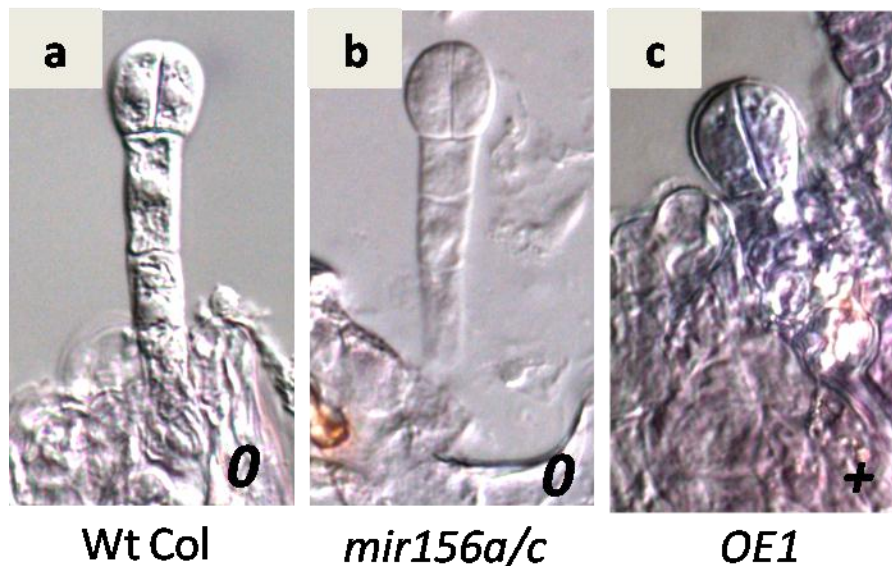


Figura 9. Tendencia del nivel de miR156 por hibridación *in situ* en embriones *mir156a/c*, *pUBQ3::MIR156C* (OE1) y Col silvestre (Wt Col) en el estadio 1/2 celular.

En el estadio octante, para la línea silvestre se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a poca, la tendencia del nivel de expresión fue poca en los embriones silvestres para este estadio (Figura 10 a). En la línea *mir156a;mir156c*, se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a poca, la tendencia del nivel de expresión fue nula en los embriones *mir156a;mir156c* para este estadio (Figura 10 b). En la línea OE1 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a expresión media, la tendencia del nivel de expresión de miR156 fue media en los embriones OE1 para este estadio. En la línea OE2 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a media expresión, la tendencia del nivel de expresión fue poca en los embriones OE2 para este estadio (Figura 10 c). En la línea OE3 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a media, la tendencia del nivel de expresión fue media en los embriones OE3 para este estadio (Figura 8). En este estadio se puede observar que en la línea *mir156a;mir156c* se redujeron los niveles de miR156. En cambio, no se observó una diferencia significativa entre la línea Col silvestre y OE2.

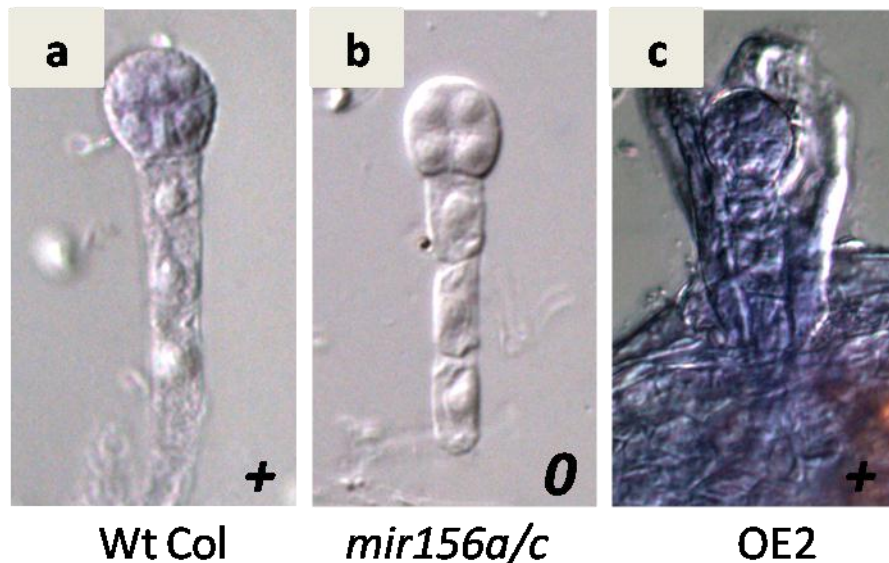


Figura 10. Tendencia del nivel de miR156 por hibridación *in situ* en embriones *mir156a/c*, *pUBQ3::MIR156C* (OE2) y Col silvestre (Wt Col) en el estadio octante.

En el estadio globular, para la línea silvestre se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue poca en los embriones silvestres para este estadio (Figura 11 a). En la línea *mir156a;mir156c*, se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a media, la tendencia del nivel de expresión fue de poca y media en los embriones *mir156a;mir156c* para este estadio (Figura 11 b1-2). En la línea OE1 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a expresión fuerte, la tendencia del nivel de expresión de miR156 fue media en los embriones OE1 para este estadio. En la línea OE2 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de nula a fuerte, las tendencias del nivel de expresión fueron media y fuerte en los embriones OE2 para este estadio (Figura 11 c1-2). En la línea OE3 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue poca en los embriones OE3 para este estadio (Figura 8). En este estadio se pudo identificar que la línea *mir156a;mir156c* no es nula, pues los embriones aún presentan expresión del miR156. También se puede observar que las líneas sobreexpresantes si están aumentando los niveles del miR156 en embriones.

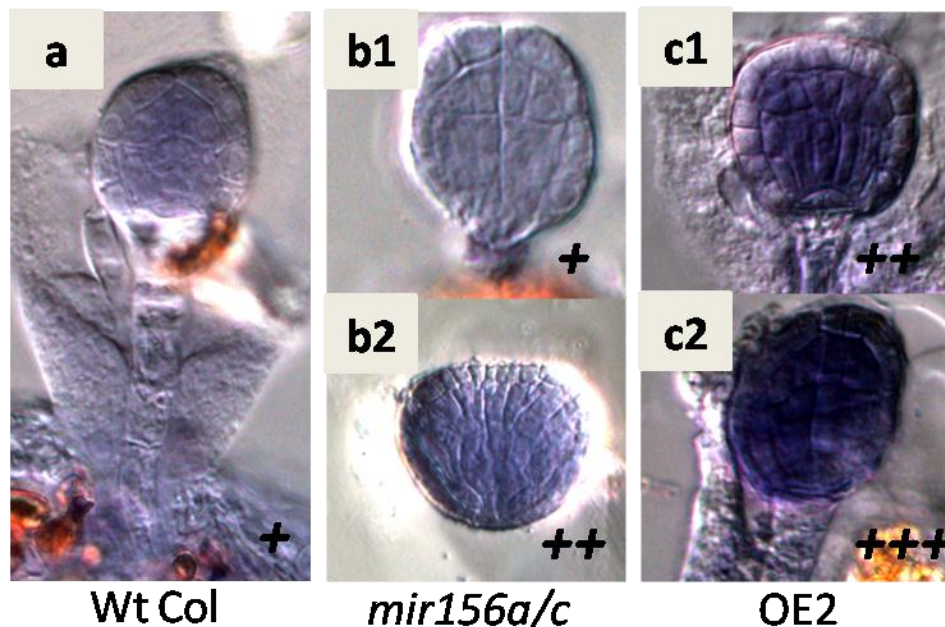


Figura 11. Tendencia del nivel de miR156 por hibridación *in situ* en embriones *mir156a/c*, *pUBQ3::MIR156C* (OE2) y Col silvestre (Wt Col) en el estadio globular.

En el estadio corazón, para la línea silvestre se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue media en los embriones silvestres para este estadio (Figura 12 a). En la línea *mir156a;mir156c*, se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a media, la tendencia del nivel de expresión fue de poca en los embriones *mir156a;mir156c* para este estadio (Figura 12 b). En la línea OE1 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a expresión fuerte, la tendencia del nivel de expresión de miR156 fue fuerte en los embriones OE1 para este estadio (Figura 12 c). En la línea OE2 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue fuerte en los embriones OE2 para este estadio. En la línea OE3 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de poca a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue fuerte en los embriones OE3 para este estadio (Figura 8). En este estadio se confirmó que la línea *mir156a;mir156c* no es nula pero, si se encuentra reduciendo los niveles del miR156. También se puede observar que las líneas sobreexpresantes si están aumentando los niveles del miR156 en embriones.

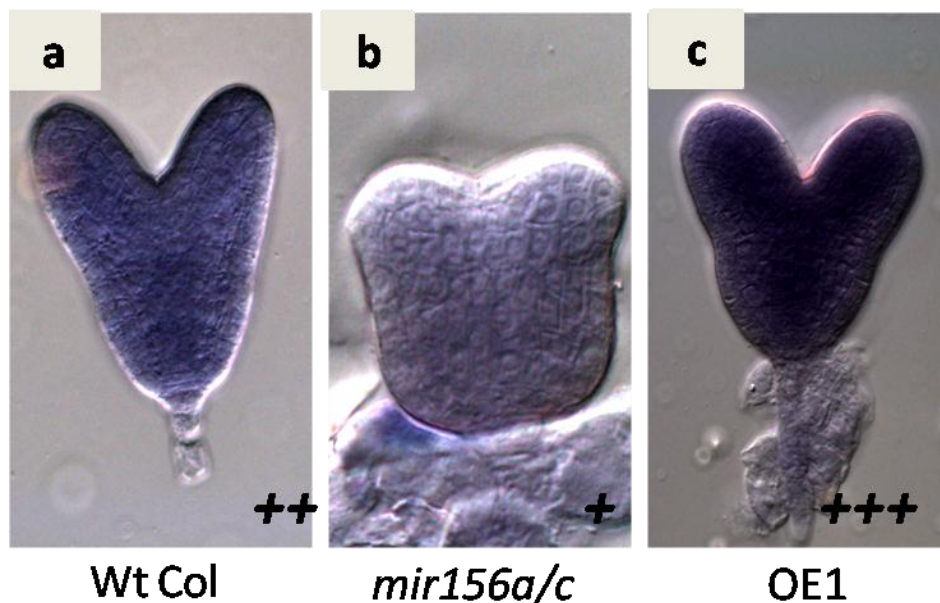


Figura 12. Tendencia del nivel de miR156 por hibridación *in situ* en embriones *mir156a/c*, *pUBQ3::MIR156C* (OE1) y Col silvestre (Wt Col) en el estadio corazón.

En el estadio cotiledón doblado, para la línea silvestre se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de media a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue media en los embriones silvestres para este estadio (Figura 13 a). En la línea *mir156a;mir156c*, no se observaron embriones en este estadio. En la línea OE1 solamente se observaron embriones con nivel de expresión de miR156 medio (Figura 13 b). En la línea OE2 no se observaron embriones en este estadio. En la línea OE3 solamente se observaron embriones con nivel de expresión de miR156 fuerte (Figura 8). En este estadio se obtuvieron pocos embriones para el análisis pero, se puede observar la expresión del miR156 en todo el embrión de las líneas Col silvestre y OE1.

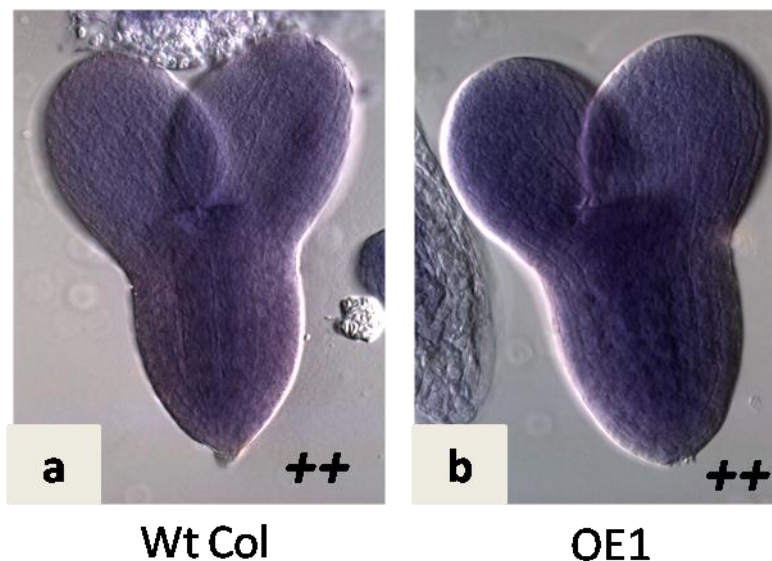


Figura 13. Tendencia del nivel de miR156 por hibridación *in situ* en embriones *mir156a/c*, *pUBQ3::MIR156C* (OE1) y Col silvestre (Wt Col) en el estadio cotiledón doblado.

En el estadio embrión maduro para la línea silvestre se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va de media a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue media en los embriones silvestres para este estadio (Figura 14 a). En la línea *mir156a;mir156c*, no se observaron embriones en este estadio. En la línea OE1 se observaron embriones en el rango de expresión de miR156 que va

de poca a fuerte, la tendencia del nivel de expresión fue media y fuerte en los embriones OE1 para este estadio (Figura 14 b1-2). En la línea OE2 no se observaron embriones en este estadio. En la línea OE3 solamente se observó un embrión con nivel de expresión de miR156 fuerte (Figura 8). En este estadio se obtuvieron pocos embriones para el análisis pero, se puede observar la expresión del miR156 en todo el embrión de las líneas Col silvestre y OE1.

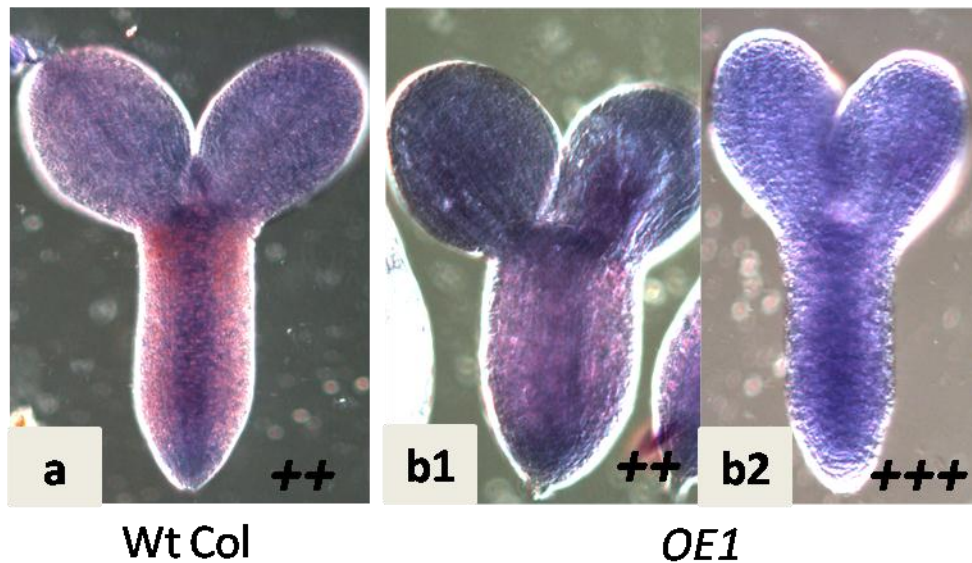


Figura 14. Tendencia del nivel de miR156 por hibridación *in situ* en embriones *mir156a/c*, *pUBQ3::MIR156C* (OE1) y Col silvestre (Wt Col) en el estadio de embrión maduro.

Aunque se haya utilizado la misma metodología en las líneas *mir156a;mir156c*, *pUBQ3::MIR156C* y Col-0 silvestre, existen variaciones en los niveles de expresión de miR156 por línea por estadio. Esto puede deberse ha que existen pequeñas diferencias individuales entre embriones, en la composición de la cubierta de la semilla o hasta en la misma expresión del miR156. Aun así, en base a los resultados anteriormente mostrados fue posible observar claras tendencias del nivel de expresión por línea y estadio.

Con los resultados anteriormente presentados, se puede concluir que miR156 se expresa a través de toda la embriogénesis tanto en células del embrión como en el suspensor. El nivel de expresión de miR156 aumenta conforme el embrión madura. La línea *mir156a;mir156c* no es una mutante nula, pues presenta expresión reducida del miR156 y las líneas sobreexpresantes *pUBQ3::MIR156C* aumentan el nivel de expresión de miR156 en embriones.

4.5 Análisis de embriones *MIR156A::GUS* y *MIR156C::GUS*

Para analizar la expresión a nivel transcripcional de *MIR156A* y *MIR156C*, se analizaron líneas con los promotores de *MIR156A* y *MIR156C* unidos al gen reportero *GUS* (Yang et al., 2013). La expresión de *MIR156A::GUS* y *MIR156C::GUS* se encontró en todo el embrión y el suspensor a través de los estadios de embriogénesis. En la figura 15, se muestra la expresión de *MIR156A* y los porcentajes de embriones teñidos por cada estadio. En la figura 16, se muestra la expresión de *MIR156C* y los porcentajes de embriones teñidos por cada estadio. Se observó mucha variabilidad en la expresión de *GUS* y embriones que no tiñeron, esto puede deberse a la técnica o que también hay variaciones de expresión por individuo.

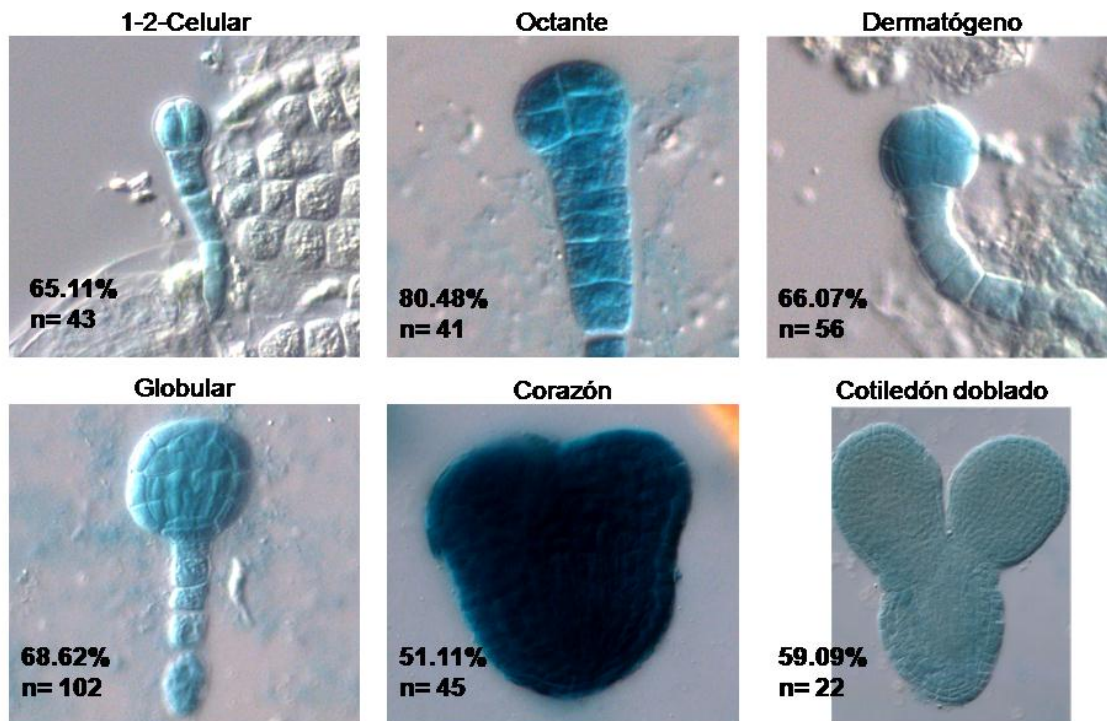


Figura. 15. Análisis histoquímico de *MIR156A::GUS* en embriones muestra la expresión de GUS en todo el embrión y suspensor a través de todas las etapas de embriogénesis. Los porcentajes mostrados son el número de embriones que tiñeron en base al número analizado.

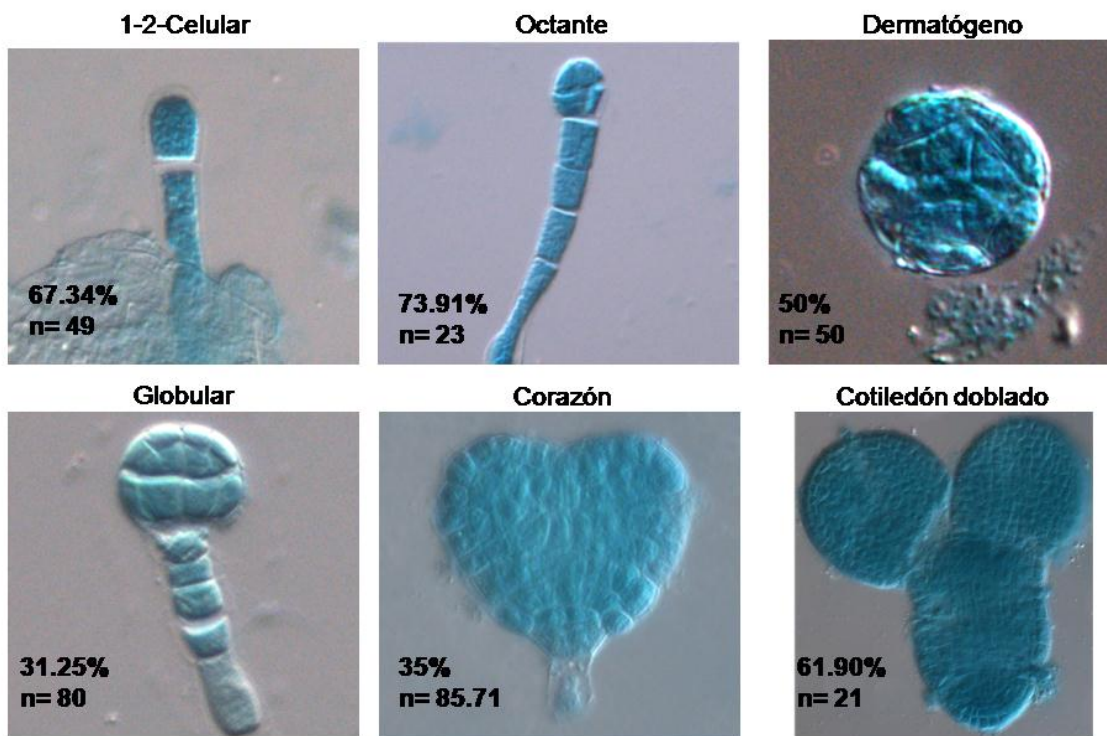


Figura. 16. Análisis histoquímico de *MIR156C::GUS* en embriones muestra la expresión de GUS en todo el embrión y suspensor a través de todas las etapas de embriogénesis. Los porcentajes mostrados son el número de embriones que tiñeron en base al número analizado.

4.6 Determinación de la causa del fenotipo morfológico de *gct* y *cct*

Para conocer si el fenotipo mutante de *gct* y *cct* es debido a la sobreexpresión de miR156. Se realizaron análisis mediante la reducción de miR156 en fondos mutantes *gct* y *cct*.

4.6.1 Análisis de fenotipos mutantes en la línea *pUBQ10::mim156*, en fondos mutantes *gct* y *cct*.

En embriones globulares, se hicieron análisis comparando el porcentaje de fenotipos mutantes de *gct* con la línea *gct;pUBQ10::mim156* y *cct* con la línea *cct;pUBQ10::mim156* (Figura 17). Se observó que los fenotipos mutantes *gct* y *cct*, no se revierten a silvestres con el uso de la línea *pUBQ10::mim156*. Ciertamente, no se ha comprobado que la línea *pUBQ10::mim156*, este reduciendo los niveles de miR156 en el embrión.

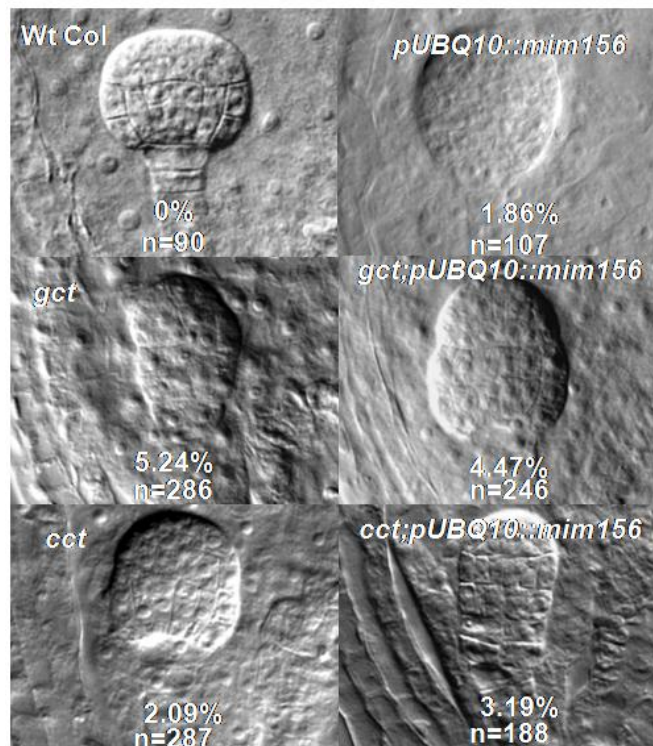


Figura 17. Análisis de embriones de la línea *pUBQ10::mim156*, en fondos mutantes *gct* y *cct*. Los fenotipos mostrados son representativos de fenotipos mutantes, excepto para la línea silvestre. Los porcentajes mostrados son el número de fenotipos de embriones mutantes en base al número analizado por línea.

4.6.2 Análisis de fenotipos mutantes en la línea *mir156a;mir156c*, en el fondo mutante *gct*

Se utilizó una segunda estrategia para probar si la sobreexpresión de miR156, era la causa del fenotipo en mutantes *gct*, analizando fenotipos mutantes de *mir156a;mir156c*, en el fondo *gct*. Se compararon los porcentajes de fenotipos mutantes *gct* con los porcentajes de fenotipos detectados en triples mutantes *gct;mir156a;mir156c*. Se pudo observar que los porcentajes de fenotipos mutantes se redujeron en las triples mutantes a comparación de la mutante sencilla en todos los estadios de embriogénesis, probando así que los fenotipos de mutantes de *gct* son derivados de la sobreexpresión de miR156 (Tabla 6-9). Como se mostró en resultados previos, las líneas dobles mutantes *mir156a;mir156c* reducen los niveles de miR156 en embriones.

Tabla 6. La reducción de la expresión de miR156 a través de *mir156a;mir156c* en el fondo mutante *gct* rescata los fenotipos mutantes en los estadios 1-4 celular.

	1-4 Celular			
	Mutante	Normal	% de Mutantes	p-value
Col-silvestre	1	106	0.90%	
<i>gct-2</i>	10	163	5.80%	0,00015
<i>gct-2;mir156a;mir156c</i>	0	238	0%	
<i>mir156a;mir156c</i>	0	244	0%	

Tabla 7. La reducción de la expresión de miR156 a través de *mir156a;mir156c* en el fondo mutante *gct* rescata los fenotipos mutantes en los estadios Octante-Dermatógeno.

	Octante-Dermatógeno			
	Mutante	Normal	% de Mutantes	p-value
Col-silvestre	0	38	0.00%	
<i>gct-2</i>	19	240	7.30%	0,0015
<i>gct-2;mir156a;mir156c</i>	0	107	0%	
<i>mir156a;mir156c</i>	0	106	0%	

Tabla 8. La reducción de la expresión de miR156 a través de *mir156a;mir156c* en el fondo mutante *gct* rescata los fenotipos mutantes en el estadio globular.

	Globular			
	Mutante	Normal	% de Mutantes	p-value
Col-silvestre	0	134	0.00%	
<i>gct-2</i>	25	544	4.40%	0,00004
<i>gct-2;mir156a;mir156c</i>	2	443	0.5%	
<i>mir156a;mir156c</i>	0	233	0%	

Tabla 9. La reducción de la expresión de miR156 a través de *mir156a;mir156c* en el fondo mutante *gct* rescata los fenotipos mutantes en el estadio corazón.

	Corazón			
	Mutante	Normal	% de Mutantes	p-value
Col-silvestre	0	53	0.00%	
<i>gct-2</i>	42	160	20.80%	0,000002
<i>gct-2;mir156a;mir156c</i>	12	212	5%	
<i>mir156a;mir156c</i>	0	95	0%	

En la línea silvestre y doble mutante *mir156a;mir156c*, no se encontraron embriones con fenotipo (Figura 18 a-b), en las líneas *gct* y *gct;mir156a;mir156c*, se contabilizaron fenotipos característicos de las mutantes *gct*. En el estadio 2-celular, la división transversal en lugar de longitudinal (Figura 18 c1, d1); en el estadio octante y dermatógeno, la formación de hileras extra celulares entre el embrión y el suspensor (Figura 18 c2, d2); en el estadio globular, la formación de hileras extra celulares, así como el alargamiento del embrión (Figura 18 c3, d3) y en el estadio corazón, se observaron divisiones celulares extras entre el embrión y el suspensor, una zona de mayor anchura del eje radial-periferal, así como la fusión de los cotiledones (Figura 18 c4, d4).

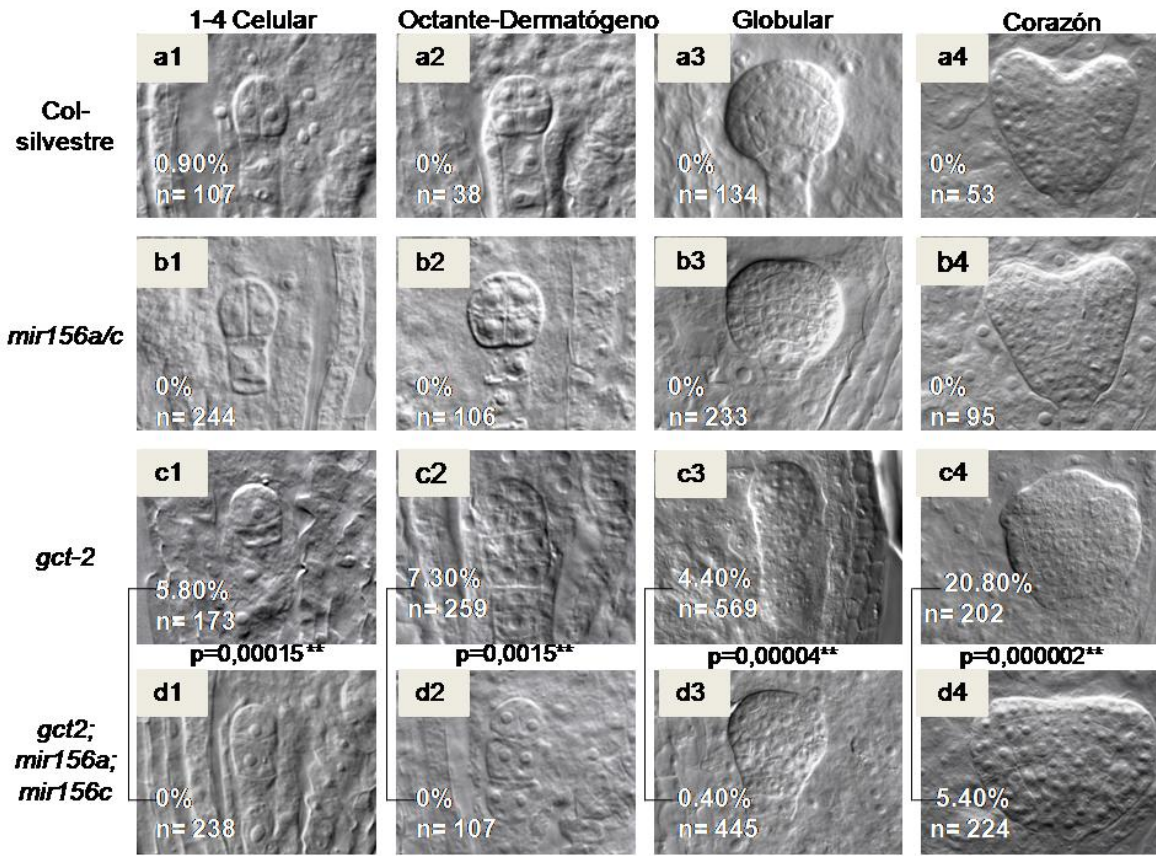


Figura 18. La reducción de la expresión de miR156 a través de *mir156a;mir156c* en el fondo mutante *gct* rescata los fenotipos mutantes en todas las etapas de la embriogénesis. Se realizó una prueba exacta de Fisher, se encontraron diferencias significativas (**) entre los fenotipos mutantes, de las líneas *gct-2* y *gct-2;mir156a;mir156c*.

4.7 Análisis de la quintuple mutante *spl2/9/11/13/15*

miR156 tiene como genes blanco a los factores de transcripción SPL para saber si los embriones sobreexpresantes de *MIR156* tienen un fenotipo similar a embriones mutantes de *SPLs* se analizaron embriones homocigotos de la línea quintuple mutante *spl2/9/11/13/15*. Se pudieron observar embriones similares a las mutantes de *gct* y *cct*, así como sobreexpresantes de miR156, a comparación de estas líneas la quintuple mutante mostró un porcentaje mínimo de fenotipos mutantes (Figura 19) .

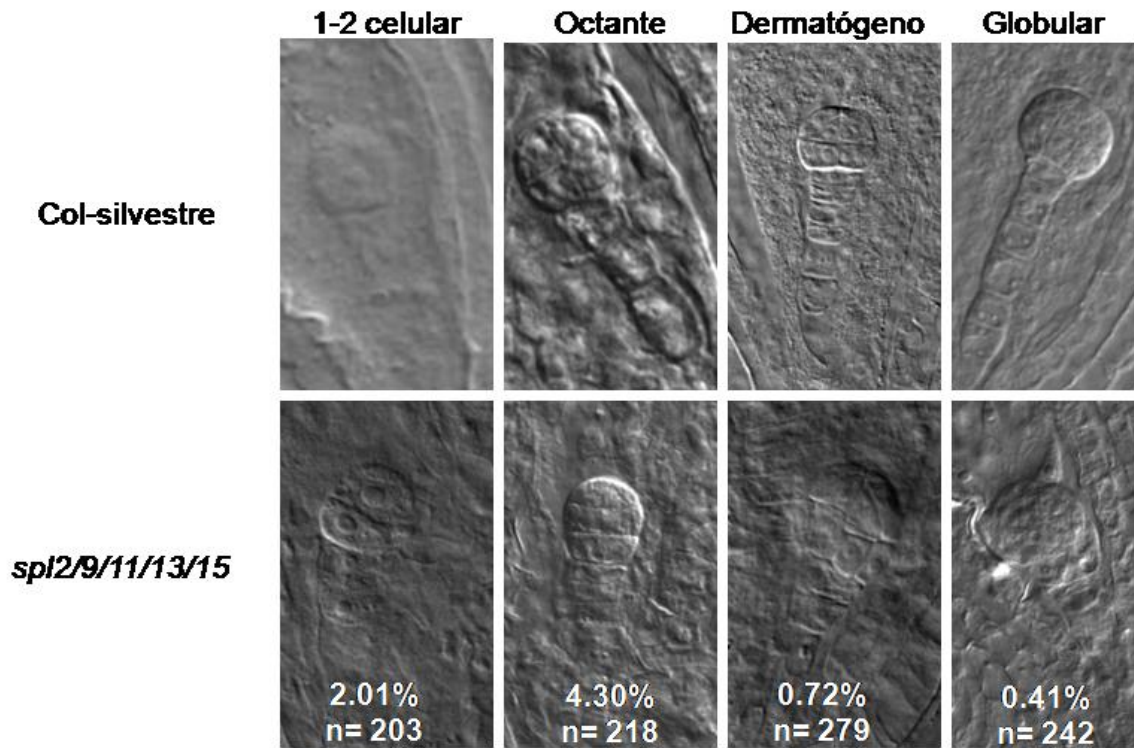


Figura 19. La quíntuple mutante *spl2/9/11/13/15* semeja los fenotipos de embriones mutantes *gct* y *cct*.

5. DISCUSIÓN

Actualmente, se conocen muchos reguladores transcripcionales de la morfogénesis del embrión, sin embargo, se conoce poco a nivel postranscripcional. En el caso de los miRNAs, solo se han hecho estudios funcionales con unas pocas de las 100 familias de miRNAs presentes en *Arabidopsis* (Chen, 2009). Es importante conocer la regulación que ejercen los miRNAs porque ellos se encuentran regulando a diferentes familias de genes.

En efecto, como se identificó por Gillmor y colaboradores en el 2010, los fenotipos tempranos de *gct* y *cct* son similares a fenotipos de genes mutantes de regulación de auxinas como lo son *BDL* y *MP*. En el estadio 1-celular, la primera división del embrión es transversal en lugar de longitudinal y en el estadio octante se forman 4 hileras con 4 células cada una, en lugar de 2 hileras con 4 células cada una en el embrión (Berleth y Jürgens, 1993; Hamann et al., 1999). Se desconoce si la desregulación de auxinas es consecuencia de que los genes de transporte, regulación y biogénesis de auxinas son blancos directos, indirectos o ambos de *GCT* ó *CCT*.

En el año 2010, Nodine y Bartel mostraron fenotipos mutantes de líneas resistentes de los genes *SPL10* y *SPL11* así como también, comprobaron mediante ensayo de complementación que eran estos genes los causantes de estos fenotipos. Lo cual no concuerda con nuestros resultados pues tanto la línea doble mutante *mir156a;mir156c* y cuádruple mutante *mir156a;mir156c;mir157a;mir157c* no mostraron fenotipos mutantes. En estas líneas mutantes, por tener los niveles reducidos de miR156 y miR157 los genes *SPL* deberían encontrarse sobreexpresados. Es decir, los niveles de expresión de miR156 y miR157 de las líneas *mir156a;mir156c* y *mir156a;mir156c;mir157a;mir157c* no generan diferencias en la expresión de los *SPLs* que se reflejen en el desarrollo del embrión. Para elucidar cómo es la regulación entre miR156/miR157 y los factores de transcripción *SPLs*, es necesario la creación de mutantes con actividad nula de miR156/miR157. En el 2011, Willmann y colaboradores basados en datos de Goldberg-Harada muestran

que *SPL10* y *SPL11*, no cambian significativamente en la embriogénesis y que *SPL5* tiene un incremento significativo, lo cual puede sugerir que otros *SPLs* pueden tener más importancia funcionalmente.

Al igual que en las líneas mutantes, en la línea mimicry *pUBQ10::mim156*, no se observaron fenotipos anormales en embriones. La reducción en la expresión de miR156 en embriones en esta línea no ha sido demostrada. En estadio vegetativo, la línea *pUBQ10::mim156* no presenta el estadio vegetativo juvenil en comparación de las plantas silvestres, lo cual indica que el constructo está funcionando en este estadio. Sin embargo, puede ser que en la línea transgénica que obtuvimos de Scott Poethig, el promotor pUBQ10 no se esté expresando en el embrión, debido a una particularidad del evento transgénico que se dio en esta línea transgénica (sólo obtuvimos una sola línea *pUBQ10::mim156* de Scott Poethig). Una opción podría ser que la secuencia de nucleótidos necesaria en el promotor para la expresión en el embrión se haya perdido en esa línea. También, es posible que la expresión del promotor no sea tan fuerte como para alcanzar a secuestrar todo o gran parte del miR156.

En estadio vegetativo, las líneas sobreexpresantes de *MIR156A* y *MIR156C* bajo el promotor pUBQ3, mostraron fenotipos diferentes, lo cual no se esperaba debido a que *MIR156A* y *MIR156C* tienen el mismo miRNA maduro. Una posible explicación puede ser el procesamiento que tienen ambos miRNAs, ya que como muestra un estudio muy reciente del *MIR156A*, la estructura secundaria del RNA primario, así como la temperatura tienen un efecto en la cantidad del procesamiento del miRNA maduro (Kim et al., 2016). Las estructuras secundarias de los miRNAs primarios de *MIR156A* y *MIR156C* son diferentes (Reinhart et al., 2002)

Durante el análisis de los embriones sobreexpresantes *MIR156C* se observaron porcentajes de fenotipos muy altos o con mayor severidad en la generación T2 en comparación de la generación T3, en la cual los porcentajes de fenotipos mutantes fueron mínimos. Algunas posibilidades que pueden explicar esta reducción de fenotipos anormales entre las generaciones es la variación en el ambiente de

invernadero en el que crecieron las plantas, para determinar si esta es la causa se deben evaluar las generaciones T2 y T3 de embriones provenientes de plantas crecidas en las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad. Otra posibilidad es que el transgén esté siendo silenciado mediante el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi) y para probar esto se pueden analizar varias generaciones con el constructo *pUBQ3::MIR156C* en el fondo mutante de *RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6)*. *RDR6* se requiere para el silenciamiento postranscripcional (Dalmay et al., 2000; Elmayan et al., 1998), entonces en el fondo *rdr6* se puede evitar el silenciamiento de un transgén.

Los promotores de *MIR156A* y *MIR156C* promueven la transcripción de GUS en todo el embrión y suspensor en la embriogénesis, así como también, la localización del miRNA maduro de miR156. En concordancia con Tretter et al.(2008), en donde se muestra que en comparación con otros miRNAs pequeños, los miRNAs no se mueven de célula a célula. Es necesario saber, en dónde se están expresando a nivel traduccional los genes blanco de miR156 para saber en dónde se encuentran actuando. Es más útil conocer la expresión traduccional de los genes blanco, debido a que la expresión transcripcional o la expresión del ARN, no es determinante para la cantidad de traducción del gen. Este análisis se puede realizar mediante líneas traduccionales fusionadas a un gen reportero. También, hay que considerar que los miRNAs pueden actuar reduciendo los niveles de expresión de sus genes blanco o reprimiéndolos totalmente, lo que conlleva que esas cantidades pueden reflejar efectos determinantes en el desarrollo. Para conocer cómo es esta regulación en las células o tejidos de miR156 en los *SPLs* se pueden analizar líneas traduccionales fusionadas a un gen reportero resistentes a miR156, mediante la mutación del sitio blanco del miRNA.

Los porcentajes de fenotipos mutantes en plantas sobreexpresantes de *MIR156C* fueron muy altos en comparación de la quintuple mutante *spl2/9/11/13/15*, esto puede ser debido a que la línea sobreexpresante está reprimiendo a todos los *SPL* del embrión. En cambio, en la quintuple mutante, pueden existir otros genes *SPLs* que lleven a cabo la función de los genes mutados. Por ello, podría ser necesaria

la creación de una línea mutante de los genes *SPLs* que tienen las funciones más importantes en el embrión. Otra posibilidad es que el fenotipo de mutantes *spl2/9/11/13/15* puede ser tan severo que son letales, y sólo los embriones con baja penetrancia del fenotipo sobrevivan, y entonces por eso no se observan fenotipos en la quintuple mutante.

Para conocer bien la función de miR156 en la embriogénesis, sería conveniente conocer cuáles son las funciones que los *SPLs* están cumpliendo en el embrión, cuáles *SPLs* tienen una función más importante y cuáles otras funciones redundantes o nulas.

En resultados previos de García-Flores y García-Aguilar (no publicados), se probó la sobreexpresión de miR156 en embriones mutantes *gct* y *cct* en comparación de embriones silvestres. Esto sugiere que *GCT* y *CCT* regulan negativamente al miR156. Estos resultados previos están en concordancia con nuestros resultados de restauración del fenotipo en triples mutantes de *gct;mir156a;mir156c* (Figura complementaria 1).

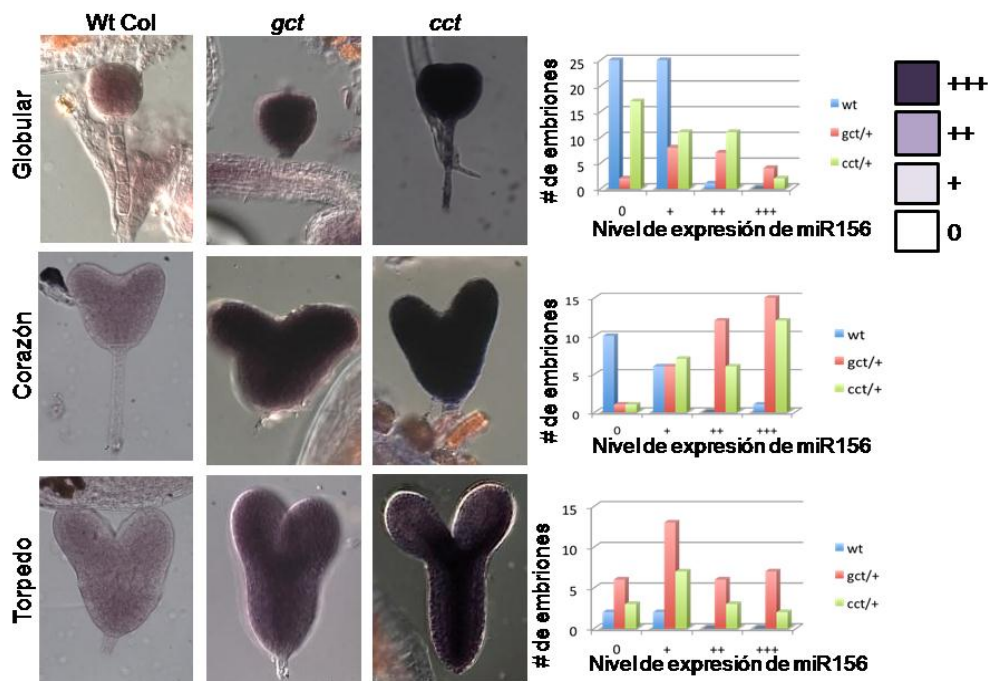


Figura complementaria. 1. Embriones mutantes de *gct* y *cct* muestran una expresión más alta de miR156 en comparación de los embriones silvestres en la etapa globular, corazón y torpedo. Las gráficas muestran el nivel de expresión de miR156 por número de embriones *gct*, *cct* y silvestres en cada estadio (García-Floresy García-Aguilar, datos no publicados).

Para determinar si la pérdida de regulación de miR156 en mutantes de *gct* era la causa del fenotipo mutante, se siguieron dos estrategias con el fin de reducir la expresión de miR156 en embriones con el fondo mutante *gct*. Cuando se trató de reducir los niveles de miR156 con la línea *pUBQ10::mim156* en embriones globulares *gct*, no se encontró diferencia significativa entre *gct;pUBQ10::mim156* y *gct*. La segunda estrategia consistió en reducir los niveles de miR156 con la línea doble mutante *mir156a;mir156c* en embriones con el fondo mutante *gct*. En este trabajo se demostró que la línea *mir156;mir156c*, reduce los niveles de expresión de miR156 en embriogénesis, como ya se había reportado en el estadio vegetativo (Yang et al., 2013). Nuestros resultados mostraron diferencias significativas entre los porcentajes de fenotipos mutantes de las líneas *gct;mir156a;mir156c* y *gct*. Eso sugiere que la sobreexpresión de miR156 en los embriones *gct* es responsable de los fenotipos mutantes de *gct*, y que *gct*, *cct* y miR156, actúan en una misma vía durante la formación y tiempos de desarrollo del embrión. Ciertamente, es necesario conocer si *GCT* y *CCT* actúan regulando directamente al miR156. También, cabe la posibilidad de que miR156 sea un regulador indirecto de la expresión de *GCT* y *CCT*, dado que ambos están implicados como determinantes en procesos fisiológicos del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. *GCT*, *CCT* y miR156, se encuentran implicados en la transición del embrión a plántula y en el cambio de fase vegetativa, subiendo y bajando los niveles de expresión de manera antagónica.

6. PERSPECTIVAS

-Conocer el efecto de la actividad nula del miR156 en embriones mediante la creación de una mutante nula de *mir156a;mir156c*. Se pretenden conocer los efectos de la pérdida total del miR156 en embriones para conocer más detalladamente su función.

-Analizar varias generaciones de línea sobreexpresante *pUBQ3::MIR156C* en el fondo mutante *rdr6*, con plantas crecidas bajo las mismas condiciones. Esto con la finalidad de saber si existe un mecanismo de RNA de interferencia que se encuentre afectando al transgén.

-Realizar un análisis más riguroso acerca de los niveles de miR156 mediante PCR cuantitativo y un sensor de miR156 en las líneas *mir156a;mir156c*, *pUBQ3::MIR156C* y silvestre. El sensor del miR156, estaría integrado por el promotor UBQ10 para que pueda ser expresado en embriones, una proteína roja fluorescente unida a un sitio de localización nuclear dsRed-N7, un sitio target del *mir156* 3'UTR SPL3 y una cola de poli A para proporcionarle estabilidad al ARN mensajero. El sensor de miR156 estaría en los fondos de las líneas a analizar.

-Analizar los niveles de miR156 mediante PCR cuantitativo o el sensor de miR156 en los embriones de la línea *pUBQ10::mim156* usando como control embriones silvestres.

-Analizar si hay sobreexpresión de *MIR156A* y *MIR156C* en fondos mutantes de *gct* y *cct* mediante líneas reporteras fusionadas a *GUS*.

-Analizar si la acumulación de auxinas se restaura en triples mutantes de *gct;mir156a;mir156c* y *cct;mir156a;mir156c*. Puede ser analizado mediante un marcador de auxinas como *DR5rev::GFP* u otro más sensible.

-Conocer la función de los factores de transcripción SPL expresados durante la embriogénesis. Con el fin de conocer la función que miR156 ejerce a través de la regulación de sus genes blanco. Considerando que los genes *SPL* pueden tener funciones redundantes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, B. L., & Taatjes, D. J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(3), 155–166. <https://doi.org/10.1038/nrm3951>
- Berleth, T., & Jürgens, G. (1993). The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryos. *Development*, 118(2), 575–587. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90246-E](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90246-E)
- Buendía-Monreal, M., & Gillmor, C. S. (2016). Mediator: A key regulator of plant development. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.009>
- Chen, X. (2005). microRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579(26), 5923–5931. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.071>
- Chen, X. (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 21–44. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113417>
- Crawford, B., Sewell, J., Golembeski, G., Roshan, C., Long, J., & Yanofsky, M. (2015). Genetic control of distal stem cell fate within root and embryonic meristems. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6222), 655–59. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0196>
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Journal*, 23(2), 431–442. <http://doi.org/10.1105/tpc.110.082784>
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101(5), 543–553. [https://doi.org/S0092-8674\(00\)80864-8](https://doi.org/S0092-8674(00)80864-8) [pii]
- Ding, N., Zhou, H., Esteve, P. O., Chin, H. G., Kim, S., Xu, X., Joseph S. M., Friez M. J., Schwartz C. E., Pradhan, S., & Boyer, T. G. (2008). Mediator Links Epigenetic Silencing of Neuronal Gene Expression with X-Linked Mental Retardation. *Molecular Cell*, 31(3), 347–359. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.023>

- Donner, A. J., Ebmeier, C. C., Taatjes, D. J., & Espinosa, J. M. (2010). CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), 194–201. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1752>
- Elmayan, T., Balzergue, S., Béon, F., Bourdon, V., Daubremet, J., Guénet, Y., Mourrain, P., Palauqui, J. C., Vernhettes, S., Vialle, T., Wostrikoff, K., & Vaucheret, H. (1998). Arabidopsis mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* 10, 1747–1758. doi:10.1105/tpc.10.10.1747
- Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelson, C. O., Koeck, P. J. B., Holmberg, S., Hebert, H., & Gustafsson, C. M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43), 15788–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607483103>
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J. A., & Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 39(8), 1033–1037. <http://doi.org/10.1038/ng2079>
- García-Aguilar, M., Dorantes-Acosta, A., Pérez-España, V., & Vielle-Calzada, J. P. (2005). Whole-mount in situ mRNA localization in developing ovules and seeds of Arabidopsis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23(3), 279–289. <http://doi.org/10.1007/BF02772758>
- Gillmor, C. S., Park, M. Y., Smith, M. R., Pepitone, R., Kerstetter, R. a, & Poethig, R. S. (2010). The MED12-MED13 module of Mediator regulates the timing of embryo patterning in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, 137, 113–122. <https://doi.org/10.1242/dev.043174>
- Gillmor, C. S., Silva-Ortega, C. O., Willmann, M. R., Buendía-Monreal, M., & Poethig, R. S. (2014). The Arabidopsis Mediator CDK8 module genes CCT (MED12) and GCT (MED13) are global regulators of developmental phase transitions. *Development (Cambridge, England)*, 141(23), 4580–9. <http://doi.org/10.1242/dev.111229>
- Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M., & Jürgens, G. (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting

MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes & Development*, 16(13), 1610–1615. <https://doi.org/10.1101/gad.229402>

Hamann, T., Mayer, U., & Jürgens, G. (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the Arabidopsis embryo. *Development (Cambridge, England)*, 126(7), 1387–1395.

Hardtke, C. S., & Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO Journal*, 17(5), 1405–1411. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1405>

Ito, J., Sono, T., Tasaka, M., & Furutani, M. (2011). MACCHI-BOU 2 is required for early embryo patterning and cotyledon organogenesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 52(3), 539–552. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr013>

Kim, W., Kim, H. E., Jun, A. R., Jung, M. G., Jin, S., Lee, J. H., & Ahn, J. H. (2016). Structural determinants of miR156a precursor processing in temperature-responsive flowering in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67(15), 4659–4670. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw248>

Knauer, S., Holt, A. L., Rubio-Somoza, I., Tucker, E. J., Hinze, A., Pisch, M., Javelle, M., Timmermans, M. C., Tucker, M. R., & Laux, T. (2013). A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem. *Dev. Cell* 24, 125-132. *Developmental Cell*, 24(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.009>

Laux, T., Würschum, T., & Breuninger, H. (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *The Plant Cell*, 16 Suppl, S190–S202. <https://doi.org/10.1105/tpc.016014>

Liao, C.-Y., Smet, W., Brunoud, G., Yoshida, S., Vernoux, T., & Weijers, D. (2015). Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nature Methods*, 12(3), 207–10. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3279>

Mallory, A. C., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2005). MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell*, 17(5), 1360-1375. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031716>

- Mallory, A. C., Dugas, D. V., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Current Biology*, *14*(12), 1035–1046. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.022>
- Meyer, K. D., Donner, A. J., Knuesel, M. T., York, A. G., Espinosa, J. M., & Taatjes, D. J. (2008). Cooperative activity of cdk8 and GCN5L within Mediator directs tandem phosphoacetylation of histone H3. *The EMBO Journal*, *27*(10), 1447–57. <http://doi.org/10.1038/emboj.2008.78>
- Morea, E. G. O., da Silva, E. M., e Silva, G. F. F., Valente, G. T., Barrera Rojas, C. H., Vincentz, M., & Nogueira, F. T. S. (2016). Functional and evolutionary analyses of the miR156 and miR529 families in land plants. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0716-5>
- Nodine, M. D., & Bartel, D. P. (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes and Development*, *24*(23), 2678–2692. <https://doi.org/10.1101/gad.1986710>
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes and Development*, *16*(13), 1616–1626. <https://doi.org/10.1101/gad.1004402>
- Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, *25*(7), 2383–99. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>
- Seefried, W. F., Willmann, M. R. R., Clausen, R. L., & Jenik, P. D. (2014). Global regulation of embryonic patterning in Arabidopsis by microRNAs. *Plant Physiology*, *165*(June), 670–687. <https://doi.org/10.1104/pp.114.240846>
- Smit, M. E., & Weijers, D. (2015). The role of auxin signaling in early embryo pattern formation. *Current Opinion in Plant Biology*, *28*, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.001>
- ten Hove, C. A., Lu, K.-J., & Weijers, D. (2015). Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Development (Cambridge, England)*, *142*(3), 420–430. <http://doi.org/10.1242/dev.111500>

- Tretter, E. M., Alvarez, J. P., Eshed, Y., & Bowman, J. L. (2008). Activity range of Arabidopsis small RNAs derived from different biogenesis pathways. *Plant Physiology*, *147*(1), 58–62. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117119>
- Tsai, K.-L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Conaway, R. C., Conaway, J. W., & Asturias, F. J. (2013). A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(5), 611–619. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2549>
- Ueda, M., Zhang, Z., & Laux, T. (2011). Transcriptional Activation of Arabidopsis Axis Patterning Genes WOX8/9 Links Zygote Polarity to Embryo Development. *Developmental Cell*, *20*(2), 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.009>
- Vashisht, D., & Nodine, M. D. (2014). MicroRNA functions in plant embryos. *Biochem Soc Trans*, *42*(2), 352–7. <http://doi.org/10.1042/BST20130252>
- Weijers, D., & Wagner, D. (2016). Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annual Review of Plant Biology*, *67*(1), 539–574. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112122>
- Wendrich, J. R., & Weijers, D. (2013). The Arabidopsis embryo as a miniature morphogenesis model. *New Phytologist*, *199*(1), 14–25. <http://doi.org/10.1111/nph.12267>
- Williams, L., Grigg, S. P., Xie, M., Christensen, S., & Fletcher, J. C. (2005). Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development (Cambridge, England)*, *132*(16), 3657–3668. <https://doi.org/10.1242/dev.01942>
- Willmann, M. R., Mehalick, A. J., Packer, R. L., & Jenik, P. D. (2011). MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *155*(4), 1871–1884. <http://doi.org/10.1104/pp.110.171355>
- Wu, G., & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development (Cambridge, England)*, *133*(18), 3539–3547. <https://doi.org/10.1242/dev.02521>

- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J., Weigel, D., & Scott, R. (2009). The sequential actions of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell*, 138(4), 750–759. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>.The
- Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M. Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L., & Poethig, R. S. (2016). Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006263>
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., & Scott Poethig, R. (2013). Sugar promotes vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife*, 2013(2). <https://doi.org/10.7554/eLife.00260>
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S. H., Liou, L. W., Barefoot, A., Dickman, M., & Zhang, X. (2011). Arabidopsis argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, 145(2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.024>