



Biología de Plantas
Posgrado



Cinvestav
Unidad Irapuato

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

**UNIDAD IRAPUATO, GUANAJUATO
UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA**

**“Función del *STM* durante el desarrollo del gineceo de
Arabidopsis thaliana”**

**Tesis que presenta:
Biol. Vincent Eloel Cerbantez Bueno**

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Con especialidad en
Biología de Plantas

Director de Tesis
Dr. Stefan de Folter

Irapuato, Guanajuato

Agosto, 2017

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas, que pertenece al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, bajo la dirección del Dr. Stefan de Folter y la asesoría de la Dra. Nayelli Marsch Martínez y el Dr. Alfredo Cruz Ramírez.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No. 588258 para poder completar los estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato por el préstamo de sus instalaciones, recursos humanos y materiales necesarios para la realización del proyecto de maestría.

Al Dr. Stefan de Folter por aceptarme en su grupo de investigación, por ser un excelente guía durante la realización del proyecto y sobre todo por el apoyo y motivación personal para seguir siempre adelante.

A la Dra. Nayelli Marsch y Dr. Alfredo Cruz por el apoyo con sus consejos, sugerencias y comentarios con respecto al proyecto realizado.

A todos los integrantes del laboratorio No. 8 de la Unidad de Genómica Avanzada (UGA); en especial a la auxiliar M. en C. Karla González por su apoyo técnico siempre disponible; a los posdocs Dra. Joanna Serwatowska, Dr. Víctor Zuñiga y Dr. Ricardo Chávez por sus valiosos consejos; a los M. en C. Humberto Herrera, Marisela Celso, Andrea Gómez e Ing. Rogelio Nájera por su apoyo y amistad brindada durante este periodo tan importante.

A todos mis amigos de la generación de Biotecnología de Plantas (2015-2017), amigos de otros grupos de investigación y amigos externos de la institución con quienes compartí momentos inolvidables.

DEDICATORIA

Quisiera dedicarle este trabajo a mis grandes pilares de toda la vida: mis padres Martin Cerbantez y Martina Bueno, quienes me han apoyado durante toda mi vida para superarme cada día profesional y personalmente.

A mi hermana Roxana, su esposo Wouter y bebé Lowie, quienes me acompañaron gran parte de este camino de manera personal y me dieron lecciones sobre el significado de la familia.

A mis hermanas Viridiana y Stephanie, quienes me inspiran y enseñan grandes lecciones cada que convivimos juntos.

RESUMEN

Las angiospermas producen flores que son tan complejas como bellas. La flor está formada por diferentes órganos, entre ellos los reproductivos. El gineceo es el órgano reproductor femenino, que una vez desarrollado y fertilizado forma un ovario maduro o fruto. Para esto, muchos procesos deben tener lugar de una manera finamente coordinada. Estos procesos están directamente relacionados con una regulación genética y hormonal durante su desarrollo. La fitohormona citocinina juega un rol importante en el desarrollo temprano del gineceo, ya que regula la división celular en la región meristemática de los carpelos. Además, otras evidencias aseguran que esta hormona también cumple funciones en otros tejidos del gineceo durante su desarrollo. Las citocininas son producidas por una serie de pasos enzimáticos que las convierten de un ATP o ADP a una base libre y activa. Las enzimas ISOPENTENIL TRANSFERASA (IPT) juegan un rol muy importante al inicio de este proceso de biosíntesis. Cuando la citocinina es producida, puede desencadenar una respuesta génica por la acción combinada de los receptores de citocininas (AHK) y los reguladores de respuesta (ARR). Se ha reportado que el factor de transcripción SHOOTMERISTEMLESS (STM) juega un rol importante en el proceso de biosíntesis de citocininas, activando la expresión de genes *IPT* que a su vez producen citocininas. Sin embargo, esta función se le ha atribuido a STM con base en estudios de plántulas. Desde que STM también se expresa en el gineceo, es importante saber si su función de inducir la producción de citocininas ocurre también en el gineceo. En este estudio, se utilizaron herramientas genéticas y moleculares para determinar la relación entre STM y la producción de citocininas así como para saber si STM activa directamente los genes *IPT*. Los resultados obtenidos sugieren que STM es capaz de activar directamente los genes *IPT* uniéndose a sus promotores, sin embargo no a todos ellos. Además, los resultados también sugieren que STM puede afectar la biosíntesis de citocininas en el gineceo, aunque no tan claro

como la observada en plántula por lo que son necesarios más experimentos para obtener alguna conclusión.

ABSTRACT

Angiosperms produce flowers that are as complex as beautiful. The flower is formed by different organs and contains the reproductive organs. The gynoecium is the female reproductive organ, which once fully developed and fertilized forms a mature ovary or fruit. For this, many processes have to take place in a coordinated way. These processes are directly related with genetic regulation and hormonal regulation during development. Besides genes, the phytohormone cytokinin plays an important role in the early development of the gynoecium, because it regulates cellular division in the meristematic region of the carpels. Furthermore, other evidences suggest that this hormone also has functions in other gynoecial tissues during its development. The cytokinins are produced by an enzymatic pathway that uses ATP or ADP to convert them in a free and active base. The enzymes ISOPENTENYL TRANSFERASE (*IPT*) play a very important role in the beginning of this biosynthetic process. When cytokinin is produced, it can trigger a genetic response by the combined action of the cytokinin receptors (*AHK*) and the cytokinin response regulators (*ARR*). It has been reported that the transcription factor SHOOTMERISTEMLESS (*STM*) plays a role in the biosynthetic pathway of cytokinin by activating the expression of the *IPT* genes that produce cytokinin. However, this function has been attributed to *STM* based on studies in seedlings. Since *STM* is also expressed in the gynoecium, it is important to know if its function to induce biosynthesis of cytokinin also happens in the gynoecium. In this study, we used genetic and molecular tools to determine the relation between *STM* and cytokinin production and to know if *STM* directly activates the *IPT* genes. The obtained results suggest that *STM* is able to directly activate *IPT* genes by binding to their promoters, however not with all. Moreover, the results suggest that *STM* can affect the biosynthesis of cytokinin in the gynoecium, however, not that clear as observed in seedlings, and, therefore, more experiments should be performed to conclude.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Angiospermas y Frutos	1
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.3 Desarrollo de gineceo de <i>Arabidopsis</i>	3
1.4 Factores involucrados en desarrollo de gineceo de <i>Arabidopsis</i>	4
1.4.1. Factores genéticos	4
1.4.2. Factores hormonales	5
1.5 Biología de las Citocininas	6
1.5.1. Biosíntesis	7
1.5.2. Transporte	9
1.5.3. Señalización y Respuesta.....	9
1.6 <i>STM</i> y su relación con Citocininas	12
1.6.1. El Meristemo Apical (SAM)	12
1.6.2. Los genes <i>KNOX</i> y el meristemo apical	12
1.6.4. <i>STM</i> como un gen <i>KNOXI</i>	13
1.6.5. <i>KNOXI</i> y las Citocininas	13
1.6.6. Los genes <i>KNOX</i> y el Gineceo.....	14
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo General	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1. Construcción de vectores	18
4.1.1. Análisis de promotores <i>IPT</i> y diseño de oligonucleótidos cebadores.....	18
4.1.2. Amplificación de promotores <i>IPT</i>	19
4.1.3. Clonación, recombinación y obtención de vectores de expresión.....	20
4.2. Ensayos interacción proteína-ADN.....	21
4.2.1. Transformación de Levadura.....	21
4.2.2. Ensayos de Autoactivación con AbA.....	22

4.2.3. Ensayos de un Híbrido (Y1H).....	23
4.3. Generación de líneas transgénicas <i>IPT</i>	24
4.3.1. Transformación de Arabidopsis.....	24
4.3.2. Selección de transformantes de Arabidopsis.....	24
4.3.3. Análisis de fluorescencia tdTomato.....	25
4.4. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	25
4.5. Cruzas de líneas marcadoras con líneas inducibles.....	26
4.6. Análisis de pérdida o ganancia de función de <i>STM</i>	26
4.6.1. Análisis confocal para GFP.....	27
4.6.2. Análisis del reportero GUS	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Construcción de vectores.....	29
5.1.1. Análisis de promotores	29
5.1.2. Amplificación de promotores	30
5.1.3. Clonación y obtención de vectores de expresión.....	30
5.2. Interacción proteína-ADN.....	31
5.2.1. Prueba de Autoactivación	31
5.2.2. Ensayos de un Híbrido (Y1H).....	36
5.3 Líneas transgénicas <i>IPT</i> con fusión con tdTomato	37
5.4. <i>IPT</i> bajo la pérdida o ganancia de función de <i>STM</i>	37
5.5. <i>STM</i> como inductor de la síntesis de citocininas.....	38
5.5.1. Respuesta a citocininas con línea <i>TCS::GFP</i>	38
5.5.2. Respuesta a citocininas con la línea <i>ARR5::GFP</i>	40
5.6. <i>STM</i> y los receptores de citocininas	44
5.6.1. <i>AHK2</i>	44
5.6.2. <i>AHK3</i>	45
5.6.3. <i>AHK4</i>	47
6. DISCUSIÓN	49
6.1. Relación <i>STM-IPT</i>	49
6.1.1. Y1H.....	49
6.1.2. Análisis de <i>IPT</i> bajo pérdida y ganancia de función de <i>STM</i>	51
6.2. <i>STM</i> como inductor de la producción de citocininas.....	52

6.3. <i>STM</i> como regulador de los genes <i>AHK</i>	54
7. CONCLUSIONES	57
8. PERSPECTIVAS.....	58
9. ANEXOS.....	59
10. BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Florde Arabidopsis	2
Figura 2. Desarrollo de la flor de <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
Figura 3. Ruta de Biosíntesis de citocininas	8
Figura 4. Esquema de promotores <i>iPT</i>	29
Figura 5. Bandas obtenidas al amplificar cada uno de los promotores <i>IPT</i>	30
Figura 6. Esquema de autoactivación del promotor <i>IPT1</i>	32
Figura 7. Esquema de autoactivación del promotor <i>IPT3</i>	32
Figura 8. Esquema de autoactivación del promotor <i>IPT4</i>	33
Figura 9. Esquema de autoactivación del promotor <i>IPT5</i>	34
Figura 10. Esquema de autoactivación del promotor <i>IPT6</i>	34
Figura 11. Esquema de autoactivación del promotor <i>IPT7</i>	35
Figura 12. Esquema de autoactivación del promotor <i>IPT8</i>	35
Figura 13. Ensayo de un híbrido	36
Figura 14. Imágenes de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>IPT1::GUS</i> en ganancia o pérdida de función de <i>STM</i>	38
Figura 15. Imágenes en microscopio confocal de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>TCS::GFP</i> en ganancia y pérdida de función de <i>STM</i>	39
Figura 16. Imágenes en microscopio confocal de cortes de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>TCS::GFP</i> en ganancia y pérdida de función de <i>STM</i>	40
Figura 17. Imágenes en microscopio confocal de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>ARR5::GFP</i> en ganancia y pérdida de función de <i>STM</i>	41
Figura 18. Imágenes en microscopio confocal de cortes de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>ARR5::GFP</i> en ganancia y pérdida de función de <i>STM</i>	42
Figura 19. Imágenes en microscopio confocal de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>ARR7::GFP</i> en ganancia y pérdida de función de <i>STM</i>	43
Figura 20. Imágenes en microscopio confocal de cortes de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>ARR7::GFP</i> en ganancia y pérdida de función de <i>STM</i>	44
Figura 21. Imágenes de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>AHK2::GUS</i> en ganancia o pérdida de función de <i>STM</i>	45
Figura 22. Imágenes de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>AHK3::GUS</i> en ganancia o pérdida de función de <i>STM</i>	46
Figura 23. Imágenes de gineceos de Arabidopsis de la línea <i>AHK4::GUS</i> en ganancia o pérdida de función de <i>STM</i>	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar los promotores de cada <i>iPT</i>	19
Tabla 2. Construcciones obtenidas de los diferentes <i>IPT</i>.....	31
Tabla 3. Número de transformantes obtenidas (resistentes a BASTA) por cada construcción	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Angiospermas y Frutos

Las Angiospermas (del griego *angíon*-vaso y *sperma*-semilla) son plantas superiores muy importantes para el hombre. Su importancia nace a partir de sus estructuras caracterizadas por ser únicas y muy complejas en este grupo vegetal, las flores. La flor es una estructura que se encarga de la reproducción sexual y en esta se pueden encontrar uno o ambos órganos reproductores (androceo y gineceo) de manera separada o en conjunto. El gineceo es el órgano reproductor femenino y está encargado de desarrollar, proteger y dispersar las semillas. El desarrollo de las semillas comienza una vez que el gineceo es polinizado y al mismo tiempo ocurren otros eventos de maduración que convierten al gineceo en un ovario maduro o fruto. Una vez que el fruto maduró ocurre la dispersión de semillas con la ayuda de factores bióticos o abióticos.

Los frutos son de gran importancia para el hombre y la mayoría de ellos son utilizados como alimento. Pueden presentarse en una inmensa variedad de formas, texturas, colores y sabores. Debido a su gran importancia, se han hecho muchos esfuerzos para poder entender cómo es que esta estructura es desarrollada desde etapas muy tempranas hasta que el fruto es maduro y listo para servir de alimento.

1.2. *Arabidopsis thaliana*

La planta *Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia de las Brassicaceas y ha sido utilizada por muchos años como modelo de estudio para entender los procesos biológicos que rigen la vida vegetal. Esta planta no representa ninguna importancia económica pero posee un gran número de características que la hacen fácil de manipular (Gepstein y Horwitz, 1995; Meinke et al., 1998).

La flor de *Arabidopsis* es una flor perfecta y su estructura se puede dividir en cuatro verticilos (Figura 1). En el primero de ellos (el más externo) se encuentran cuatro sépalos; en el segundo tiene cuatro pétalos; en el tercero se pueden diferenciar seis estambres (órgano reproductor masculino) y en la parte más interna encontramos un gineceo (órgano reproductor femenino) (Causier et al., 2010). El gineceo de *Arabidopsis* está compuesto por dos carpelos fusionados congénitamente que al madurar se convierten en un fruto llamado silicua. El gineceo de *Arabidopsis* se compone de un estigma, un estilo, un ovario y un ginóforo.



Figura 1. Flor de Arabidopsis. En la imagen se pueden apreciar las estructuras de una flor del ecotipo Columbia de *Arabidopsis thaliana*. Foto: Jurgen Bergen, Instituto Max Plank.

El estigma se encuentra en la parte más apical y cumple la función de atrapar a los granos de polen y hacer que germinen en esta zona para luego fertilizar a los óvulos en la parte interna siguiendo el camino de un tracto de transmisión. El estilo en *Arabidopsis* es una estructura muy corta y vascularizada que tiene en su interior células del tracto de transmisión. El ovario es la estructura más grande del gineceo y está encargada del desarrollo y protección de las semillas. En el ovario se pueden diferenciar otras estructuras que cumplen diferentes funciones. Las valvas son las estructuras que alojan las semillas y son separadas por el réplum

en la parte externa y por el septum en la parte interna; además, en la parte externa cada una de las valvas termina en márgenes que son importantes para la dehiscencia del fruto. Por último y en la parte más basal del gineceo se encuentra el ginóforo que tiene la función de internodo que une al ovario con la planta (Roeder y Yanofsky, 2006).

1.3 Desarrollo de gineceo de Arabidopsis

Para Arabidopsis, se han descrito veinte etapas de desarrollo de la flor y fruto desde el momento en el que es un primordio hasta que las semillas son liberadas (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010) (Figura 2).

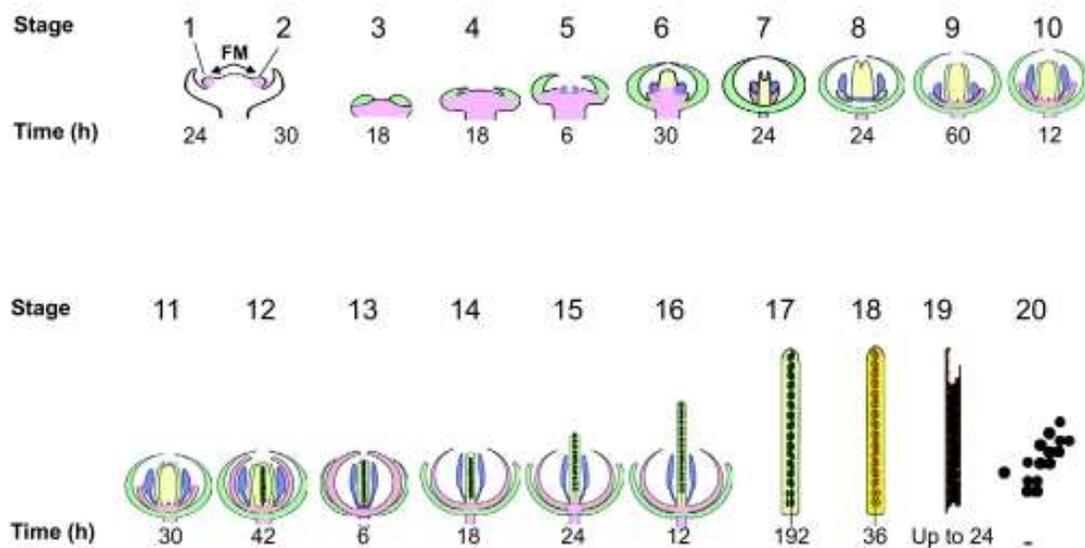


Figura 2. Desarrollo de la flor de Arabidopsis thaliana. Imagen representativa de los 20 estadios de desarrollo de la flor de Arabidopsis y la duración en horas de cada uno de ellos. Imagen tomada de Alvarez-Buylla *et al.*, 2010.

El proceso de desarrollo del gineceo comienza en la etapa número 6. En este estadio aparece el primordio de esta estructura. Este primordio se elonga como un

tubo hueco en la etapa número 7, para luego comenzar a formar la placenta y la vasculatura principal en el estadio 8; exteriormente se sigue elongando. En la etapa 9 aparecen los primordios de los óvulos y se va especializando y diferenciando más el tejido interno; las paredes de los carpelos alcanzan un grosor de tres capas celulares y comienzan a diferenciarse los haces vasculares secundarios. Los primordios de los tejidos internos se siguen desarrollando y el gineceo elongándose. En la etapa 10 el tubo hueco se sella en la parte apical e internamente se forma el septum. En la etapa 11 el endocarpio se diferencia en dos capas y los óvulos se siguen desarrollando ahora con tejido funicular que los une al tejido medio. El estadio 12 se caracteriza por un crecimiento y maduración general, además de una diferenciación del tracto de transmisión. En esta etapa el gineceo está maduro y listo para ser polinizado; lo que ocurre en el estadio número 13. A partir de la polinización y fecundación de los óvulos comienza el desarrollo del fruto como tal, de los estadios 14 al 20. En estos estadios ocurren una serie de eventos de expansión celular, elongación, lignificación y finalmente la dehiscencia (Ferrándiz *et al.*, 1999).

1.4 Factores involucrados en desarrollo de gineceo de Arabidopsis

Cada una de las diferentes etapas de desarrollo está caracterizada por el nacimiento, formación o elongación de las diversas estructuras que lo conforman. En cada uno de estos acontecimientos intervienen factores genéticos y hormonales que permiten que ocurran en el momento correcto (Ferrándiz *et al.*, 2010; Reyes-Olalde *et al.*, 2013; Marsch-Martinez y de Folter, 2016).

1.4.1. Factores genéticos

Los factores genéticos juegan un papel muy importante, de tal manera que si se muta alguno de ellos, la formación del gineceo y fruto se ve afectada por completo. Solo por mencionar algunos, cuando se muta el gen *SPATULA* (*SPT*), el gineceo no se fusiona en la región apical y tampoco desarrolla correctamente el tracto de transmisión, por lo que se le atribuye esta función a dicho gen (Álvarez y Smyth,

1999). Los genes *SHATTERPROOF1* y *2* (*SHP1/2*) participan en la adecuada formación de las capas de lignificación y separación de los márgenes de la valva, ya que sus mutantes carecen de estos procesos (Liljerén *et al.*, 2000). La mutante del gen *FRUITFULL* (*FUL*) está afectada en la división y elongación de las células de las valvas, lo que provoca que no se desarrollen completamente; además, su réplum tiene a ensancharse y torcerse, por lo que se le atribuye a *FUL* dichas funciones (Ferrándiz *et al.*, 2000).

1.4.2. Factores hormonales

Las hormonas vegetales también desempeñan roles importantes durante el desarrollo del gineceo. Las auxinas por ejemplo, deben estar localizadas en un momento, en un lugar y a una concentración específica para que los programas de desarrollo se lleven a cabo correctamente. Se ha observado que la desregulación en genes relacionados con biosíntesis y señalización de estas hormonas afecta drásticamente estos programas. Por ejemplo, cuando se muta el gen *SPT*, se puede rescatar el defecto de la fusión apical del gineceo bloqueando el transporte con NPA (ácido naftilftalámico); este fenotipo ocurre también induciendo la biosíntesis de auxinas mediante la sobre-expresión de *STYLISH1* (*STY1*), quien activa a *YUCCA4* (*YUC4*), un gen importante para la síntesis de esta hormona (Nemhauser *et al.*, 2000; Eklund *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que las auxinas controlan desde muy temprano el inicio de la formación de los carpelos; y que estas deben ser transportadas de unas regiones a otras de manera específica por los transportadores codificados por los genes *PIN* durante todo el proceso de desarrollo (Larsson *et al.*, 2014).

Por otro lado, las citocininas también desempeñan un rol muy importante para que el gineceo sea desarrollado correctamente. Se ha observado que están presentes durante el desarrollo de esta estructura desde estadios muy tempranos hasta la formación del fruto (Marsch-Martínez *et al.*, 2012; Reyes-Olalde *et al.*, 2017). Una de sus funciones en el gineceo parece ser meristemática como en el meristemo apical del tallo (*SAM* en inglés), ya que su mayor expresión se observa en un

tejido de este tipo en el gineceo joven, el meristemo marginal del carpelo (CMM en inglés). Cuando se afecta la concentración de citocininas, los diferentes tejidos se afectan en tamaño y número de células; incluso se ha observado que cuando hay aplicaciones exógenas de citocininas, puede proliferar tejido desde el réplum. Lo que sugiere que la concentración de citocininas está estrictamente controlado (Bartrina *et al.*, 2011; Marsch-Martínez *et al.*, 2012; Reyes-Olalde *et al.*, 2017).

Estas dos hormonas juegan roles diferentes durante el proceso de desarrollo. Sin embargo, es bien sabido que una comunicación entre ellas es necesaria para que el programa de desarrollo del gineceo se lleve a cabo correctamente. Se ha encontrado que estas dos hormonas muestran perfiles de localización evidenciadas por sus reporteros *DR5* y *TCS* de manera contrastante (Marsch-Martínez *et al.*, 2012); lo que nos indica que existen factores genéticos controlados por estas hormonas que se regulan positiva y negativamente entre ellos (Galbiati *et al.*, 2013; Schaller *et al.*, 2015; Marsch-Martinez y de Folter, 2016; Reyes-Olalde *et al.*, 2017).

1.5 Biología de las Citocininas

Las citocininas son hormonas involucradas en la regulación de diferentes procesos de desarrollo de la planta, tales como el ciclo celular; proliferación celular en el SAM; desarrollo de la raíz principal y laterales; desarrollo de tejido vascular; desarrollo de gametofito; desarrollo de hoja y su senescencia; respuesta a la luz; ritmo circadiano; defensa de plantas; estrés abiótico y toma de nutrientes (Boer y Murray, 2000; Hwang *et al.*, 2012; Riefler *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Dettmer *et al.*, 2009; Kinoshita-Tsujimura y Kakimoto, 2011; Xu *et al.*, 2010; Lochmanova *et al.*, 2008; Salomé *et al.*, 2005; Gan and Amasino, 1996; Naseem and Dandekar, 2012; Hare *et al.*, 1997; Argueso *et al.*, 2009). Su descubrimiento se remonta a 1950, cuando Folke Skoog y Carlos Miller encontraron que existía un compuesto derivado de las adeninas, la 6-furfurylamino purina, que estimulaba la división celular en células de tabaco; ellos la llamaron kinetina. Sin embargo, este compuesto lo obtenían autoclavando esperma de arenque, o sea que no era

natural (Miller *et al.*, 1955; Miller *et al.*, 1956). No fue hasta en 1973, que Letham descubrió una citocinina natural en el endospermo del maíz inmaduro, la zeatina. Desde ese entonces se han ido estudiando cada vez más a fondo estas fascinantes hormonas (Kieber y Schaller, 2013; Schaller *et al.*, 2015). Las citocininas pueden ser de dos tipos: isoprenoides y aromáticas dependiendo de la estructura química que las conforme. Las citocininas más estudiadas y más importantes son las isoprenoides, incluyendo la trans-zeatina. En *Arabidopsis thaliana* se han realizado muchos estudios funcionales en cuanto a esta hormona de desarrollo.

1.5.1. Biosíntesis

Como las citocininas isoprenoides son las más abundantes y estudiadas, así también lo es su proceso de biosíntesis. En la Figura 3 se resumen los pasos de biosíntesis de citocininas y las enzimas involucradas en el proceso. La biosíntesis de estas citocininas comienza con la producción de un isopenteniladenosin-5'-trifosfato (iPRTP) o un isopentenil-adenosin-5'-difosfato gracias a la unión de una cadena isoprenoide al N⁶ de un ATP o AMP por la acción de una enzima codificada por genes *ISOPENTENIL TRANSFERASA (IPT)*. Esta cadena isoprenoide suele ser un dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) producido mayormente en el plastidio por la ruta del metil-eritrol-fosfato (MEP) (Kasahara *et al.*, 2004). Análisis *in silico* del genoma de *Arabidopsis* revelaron la presencia de nueve homólogos *IPT*, designados *IPT1* al 9. Sin embargo, *IPT2* y *IPT9* codifican para *IPTs* de tRNA y forman un clado distinto al resto de los *IPT*. Además, se ha observado que al silenciar o sobre-expresar *IPT2* y 9, no se alteran los niveles de citocininas en ninguno de los experimentos realizados. Además, al mutarse *IPT2* y 9 decaen los niveles de cis-tZ (no tan importante para *Arabidopsis*) y al mutarse *IPT1*, 3, 5 y 7 decaen considerablemente los niveles de tZ (muy importante en *Arabidopsis*) (Miyawaki *et al.*, 2006). Por lo que se determinó que los *IPT1*, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 son los que codifican para las enzimas de biosíntesis de citocininas tZ (Takei *et al.*, 2001; Kakimoto, 2001). Por otro lado, se sabe que todos los *IPT* son

expresados de manera tejido-específico en *Arabidopsis*, con lo que se sugieren diferentes lugares de producción de citocininas (Miyawaki *et al.*, 2004).

El siguiente paso de la biosíntesis es la hidroxilación de la cadena isoprenoide por una enzima citocromo P450. Para esta enzima se han identificado dos parálogos de *Arabidopsis* *CYP735A1* y *CYP735A2*. Estos genes se identificaron a partir de la co-expresión de IPT4 con el citocromo P450 en un sistema de levadura para producir tZ a partir de nucleótidos isopentenil adenina. La expresión de *CYP735A1* y *CYP735A2* se regula de manera diferencial de acuerdo al órgano (Takei *et al.*, 2004).

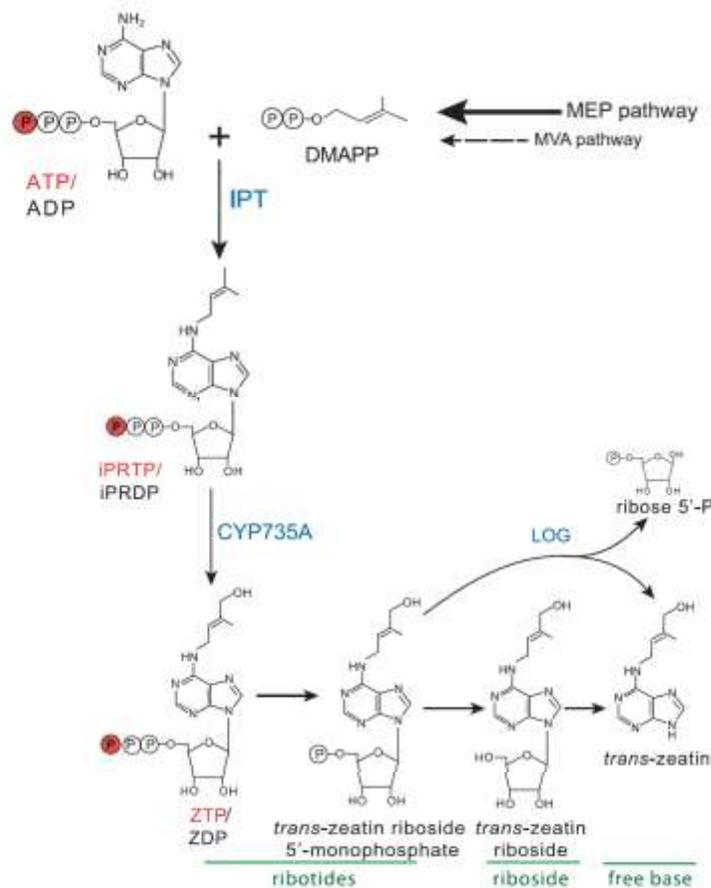


Figura 3. Ruta de biosíntesis de citocininas. Se presentan la ruta general de biosíntesis de citocininas, así como las enzimas involucradas en los diferentes pasos que son necesarios para que esta se lleve a cabo y las moléculas resultantes en cada una de sus actividades. Imagen tomada de la revisión de Kieber y Schaller, 2013.

Finalmente, el paso que convierte a los ribotidos a su forma de base libre activa lo realiza la familia de enzimas codificadas por los genes *LONELY GUY (LOG)*. En *Arabidopsis* se han identificado siete de estas enzimas del 1 al 7. Cuando se muta alguno de estos genes de manera sencilla no es posible detectar algún defecto. En cambio, cuando hay dobles o triples mutaciones en estos genes existen fenotipos que fallan en el desarrollo de alguna de sus estructuras (Kuroha *et al.*, 2009). De los siete genes, *LOG7* y *LOG4* desempeñan un papel más importante en el meristemo apical y *LOG3* y *LOG4* en la raíz (Tokunaga *et al.*, 2012).

1.5.2. Transporte

Por muchos años se pensó que las citocininas se sintetizaban en las raíces y posteriormente se transportaban a toda la planta. Estudios recientes han demostrado que los genes *IPT* y *LOG* (encargados de la biosíntesis) se expresan en diversos tejidos de *Arabidopsis* (Sakakibara, 2006; Kudo *et al.*, 2010). Esto sugiere que las citocininas se pueden producir en muchos tejidos de la planta, incluyendo los aéreos.

1.5.3. Señalización y Respuesta

La señalización y respuesta de citocininas depende de un sistema muy parecido al sistema de dos componentes que se encuentra en organismos más simples como las bacterias. Este sistema funciona de tal manera que se sensa el ambiente con un receptor localizado transmembranalmente; posteriormente este transfiere la señal a un regulador de respuesta que propaga la señal regulando la transcripción de genes (Parkinson, 1993; Gao y Stock, 2009). En *Arabidopsis* se encontraron familias de genes que codifican proteínas similares a los del sistema de dos componentes (Schaller *et al.*, 2008). Estas proteínas son histidin-cinasas (AHKs), proteínas de fosfotransferencia que contienen histidina (AHPs) y reguladores de respuesta (ARR).

La familia de las histidin-cinasas consta de tres proteínas: AHK2, AHK3 y AHK4 (también llamada CRE1 o WOL1). Estas proteínas cuentan con una estructura similar entre ellas, con un dominio transmembranal con una región fuera del citosol. Esta región tiene un sensor extracelular asociado a ciclasas histidin-cinasas o CHASE (por sus siglas en inglés), el cual funciona como sitio de unión para las moléculas de las citocininas (Heyl *et al.*, 2007). La región interna tiene un dominio histidin-cinasa y un extremo C-terminal con residuos altamente conservados que le confieren su actividad enzimática. Estos receptores funcionan de tal manera que una vez que una citocinina se une a la porción externa, se activa la histidin-cinasa y se auto-fosforila en un residuo de His. Esta fosforilación es seguida por la transferencia de este grupo fosfato a un Asp conservado en la región C-terminal (Yamada *et al.*, 2001). Este grupo fosfato será transferido posteriormente a un AHP y a los ARR.

Los receptores de citocininas cumplen funciones independientes, de acuerdo a su localización. Sin embargo, es necesario que colaboren entre sí para un buen proceso de recepción de citocininas (Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004). Suelen ser activados en su mayoría por trans-zeatina (tZ) e isopentyladenina (iP), de acuerdo a su localización (Ueguchi *et al.*, 2001). Estudios genéticos demuestran que sus funciones son tan específicas que hace que las pruebas de complementación se vuelvan muy complicadas. Por ejemplo, AHK4 se puede sustituir por AHK2 pero no por AHK3 (Stolz *et al.*, 2011).

El siguiente componente de este sistema son las proteínas AHP. Estas se encargan de transferir el grupo fosfato del dominio C-terminal de los AHK a un ARR localizado en el núcleo. En el genoma de *Arabidopsis* se encontraron cinco genes que codifican para estas proteínas, *AHP1* a *5*. Todas ellas con un residuo de histidina que funciona como sitio de fosforilación que le confiere su acción en este sistema de señalización de citocininas (Hutchison *et al.*, 2006). Además, se encontró también un sexto gen (*AHP6*), a quien se le designó pseudo *AHP* por la carencia de un sitio de fosforilación en su estructura (Schaller *et al.*, 2008). Los

genes *AHP1*, *AHP2*, *AHP3* y *AHP5* parecen tener funciones redundantes y *AHP4* contribuir muy poco al sistema de señalización (Hutchison *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó, el siguiente componente son los reguladores de respuesta (ARR); quienes se dividen en dos grandes grupos: los de tipo B y los de tipo A. Las proteínas ARR de tipo B se encargan de la transcripción de genes en respuesta a citocininas. Existen 11 genes que codifican a proteínas de este tipo en el genoma de *Arabidopsis*. Su estructura se caracteriza por poseer un dominio receptor del grupo fosfato y un C-terminal muy largo que actúa como dominio de unión al DNA (Hosoda *et al.*, 2002). De estos ARR, el número 1, 10 y 12 parecen ser los que juegan los roles más importantes en este proceso (Ishida *et al.*, 2008b).

El segundo grupo de ARR son los de tipo A, de los cuales se encontraron 10 genes que codifican para proteínas de este tipo en el genoma de *Arabidopsis* (Schaller *et al.*, 2008). Estas proteínas contienen un dominio que se encarga de recibir el grupo fosfato pero carecen del largo extremo C-terminal para la regulación transcripcional (Taniguchi *et al.*, 2007). Son caracterizados como genes de respuesta primaria de la respuesta a citocininas. Cuando se aplican citocininas exógenas, pueden ser inducidos transcripcionalmente de manera muy rápida (de 10 a 15 minutos), por lo que se han utilizado como genes reporteros de la presencia de citocininas (D'Agostino *et al.*, 2000). Sus promotores contienen múltiples sitios de unión para los ARR de tipo B y se ha demostrado que estos son los encargados de activar su transcripción (Ramireddy *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que los ARR de tipo A regulan negativamente la transducción de señales de citocininas. Esto puede ocurrir de dos maneras: la primera es debido a que los ARR de tipo A compiten con los ARR de tipo B por el grupo fosfato (Dortay *et al.*, 2006); la segunda es debida a que los ARR de tipo A pueden participar en interacciones fosfo-específicas con otras proteínas reguladoras (Jenal y Galperin, 2009).

1.6 *STM* y su relación con Citocininas

1.6.1. El Meristemo Apical (SAM)

El desarrollo de las angiospermas es caracterizado por la indeterminación de su crecimiento, dado por la continua formación de órganos desde el meristemo apical (SAM) (Steeves y Sussex, 1989). El SAM cumple con dos funciones principales: el mantenimiento de una población de células pluripotentes indiferenciadas en la zona central y la iniciación de órganos laterales por la diferenciación de células en la zona periférica (Lenhard *et al.*, 2002). Además de la iniciación de órganos, el SAM también se encarga de producir meristemos florales (FM) (Blazquez *et al.*, 2006). Este evento de terminación de mantenimiento de células indiferenciadas está regulado por genes MADS box, como el gen *AGAMOUS* (*AG*), que está encargado de iniciar el desarrollo de carpelos y estambres en la flor (Busch *et al.*, 1999).

1.6.2. Los genes *KNOX* y el meristemo apical

La acción meristemática del SAM está controlada por los genes *KNOTTED-like homeobox* (*KNOX*). Estos genes controlan la formación y mantenimiento del meristemo apical. Pertenecen a una gran familia de factores de transcripción llamados genes homeobox, quienes poseen un dominio de unión al ADN (homeodomain), que controla crecimiento y patrones de desarrollo en muchos organismos como plantas, insectos y mamíferos (Muckherjee *et al.*, 2009). En plantas, el primer *KNOX* identificado fue *KNOTTED1* (*KN1*) de maíz (Vollbrecht *et al.*, 1991) del cual reciben el nombre de *KNOTTED-like*. Basados en la similitud de secuencias, posición de intrones, patrones de expresión y análisis filogenéticos, los *KNOX* se pueden dividir en dos clases *KNOXI* y *KNOXII* (Furumizu *et al.*, 2015). La clase I de los genes *KNOX* está integrada por cuatro genes: *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), *KNAT1* (*BREVIPEDICELLUS* o *BP*), *KNAT2* y *KNAT6*. Sus funciones en SAM han sido esclarecidas gracias al gran número de estudios que se han realizado en los últimos años. *STM* es el gen más estudiado y se sabe

que juega un papel crítico en la formación y mantenimiento del meristemo gracias al estudio de alelos medios y fuertes de pérdida de función. Las mutantes *stm-2* y *stm-6* (alelos medios) perturban la organización y mantenimiento del SAM, mientras que los alelos fuertes *stm-1* y *stm-5* arrestan el desarrollo del SAM en etapas tempranas (Long *et al.*, 1996). Al realizar la expresión ectópica de *STM* se forman meristemos *de novo* en superficies abaxiales de las hojas, indicando su rol específico en meristemo apical (Lenhard *et al.*, 2002). Por otro lado, *BP* también participa en la formación del SAM pero puede ser sustituido por *STM* (Chuck *et al.*, 1996). La pérdida de función de *BP* no afecta el SAM pero parece estar afectando el desarrollo de pedicelos florales y de internodos (Venglat *et al.*, 2002). Los genes *KNAT2* y *KNAT6* no parecen estar tan involucrados en el desarrollo del SAM, aunque mutaciones en *KNAT6* amplifican algunos fenotipos de mutantes *stm* (Dean *et al.*, 2004). Además, las proteínas de los *KNOXI* pueden formar heterodímeros con otras proteínas para regular actividades genéticas con diferentes combinaciones *KNOX/BLH* (Arnaud y Pautot, 2014). En contraste a los *KNOXI*, los *KNOXII* han sido poco estudiados y sus funciones específicas aún quedan sin ser resueltas.

1.6.4. *STM* como un gen *KNOXI*

En particular, el gen *STM* codifica para una proteína homeodominio de la clase *KNOTTED I* (Long *et al.*, 1996). Tiene 382 aminoácidos y cuenta con tres bloques de secuencias conservadas. Dos de ellas caen en la región (181-220) para formar una hélice anfipática que podría estar jugando un rol muy importante en las interacciones proteína-proteína. El tercer bloque, es un sitio con residuos que al parecer actúan como un dominio de activación de la transcripción (Kerstetter *et al.*, 1994).

1.6.5. *KNOXI* y las Citocininas

Se ha identificado una relación muy estrecha entre los genes *KNOXI* y las citocininas. Cuando se hace sobre-expresa algún gen *KNOXI*, se ve modificado un

proceso de desarrollo directamente relacionado con las citocininas, y además, viene acompañado de un aumento en la concentración de las mismas (Kusaba *et al.*, 1998; Ori *et al.*, 1999).

Algunos estudios sugieren que la síntesis de citocininas está controlada directamente por los genes *KNOX1* (en especial *STM*). El gen *STM* es capaz de rescatar parcialmente el fenotipo *stm-1* cuando se sobre-expresa, ya que este activa la expresión de algunos *IPT* en plántula; así como también cuando el gen *IPT7* se controla bajo el promotor de *STM* en el mismo fondo mutante. Por su parte, *BP/KNAT1* y *KNAT2* funcionan de manera similar, aumentando la expresión del *IPT7* cuando son sobre-expresados. Además, la sobre-expresión de *STM* o *BP* es capaz de estimular una respuesta rápida del regulador de respuesta de tipo A, *ARR5*, gracias a la sobreproducción de citocininas (Yanai *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2005). Por otro lado, los genes *KNOX1* también regulan la degradación de giberelinas en el SAM, para que las células se mantengan indiferenciadas (Jasinski *et al.*, 2005). *STM* actúa redundantemente con *BP/KNAT1* para reprimir la expresión de *AtGA20ox1*, un gen de síntesis de giberelinas. Además, es necesaria una ausencia de los genes *KNOX* en la periferia del meristemo para que se dé el inicio de órganos laterales como hojas (Hay *et al.*, 2002).

1.6.6. Los genes *KNOX* y el Gineceo

Muchos estudios sugieren el rol de los *KNOX* en el desarrollo del meristemo floral, particularmente en la formación de carpelos. Los alelos mutantes débiles de *STM* (*stm-2* y *stm-6*) muestran un fenotipo en el que las flores se ven afectadas de tal manera que el desarrollo del gineceo es parcial o nulo (Endrizzi *et al.*, 1996). Cuando se expresa ectópicamente *KNAT2*, surgen carpelos ectópicos y una conversión homeótica de óvulos a carpelos dentro del gineceo (Pautot *et al.*, 2001), aunque *KNAT2* no es necesario para el desarrollo del carpelo (Byrne *et al.*, 2002).

En un estudio más profundo en el 2007, Scofield *et al.* desarrolló líneas inducibles para ganancia de función de *STM* y *BP* bajo el sistema de inducción TGV (Bohner

et al., 1999). Lo anterior, con el objetivo de estudiar la función de estos genes en el desarrollo del tejido reproductivo. Sus resultados demuestran que cuando se induce la sobre-expresión de *STM* ocurren cambios muy drásticos en la flor, tales como: crecimiento altamente inhibido de todos los órganos florales, exceptuando el gineceo; una flor más pequeña que abre más temprano; aparición de estructuras carpeloides en sitios externos, donde debería localizarse otro órgano floral; estambres con papilas estigmáticas desarrolladas y conversión homeótica de óvulos a carpelos. Por su parte, cuando se induce la sobre-expresión de *BP*, no causa cambios tan drásticos en la flor. La sobre-expresión de *BP* solo inhibe un poco el crecimiento de los otros órganos florales pero no presenta estructuras carpeloides.

De la misma manera, Scofield *et al.* también desarrolló un sistema de pérdida de función inducible para *STM* y *BP* bajo la inducción de un RNAi específico para los dos genes. Encontró que cuando induce la expresión del RNAi de *STM*, se reduce drásticamente el nivel del mRNA de este gen. Este nivel reducido de mRNA de *STM* resultó ser similar al de la mutante *stm-2*. Morfológicamente, la inducción de *RNAi-STM* arrestó el fenotipo de la planta en etapa vegetativa. En el tejido reproductivo, las flores presentaron fenotipos interesantes: en algunos casos fallaban en la fusión de carpelos y producían menos óvulos que las líneas WT; en otros casos el gineceo estaba totalmente ausente y fallaba en la formación de pétalos. En contraste, la línea inducible *RNAi-BP* no afectó el desarrollo de la planta, permitiéndole crecer de una manera casi normal. Estos fenotipos indican un rol crítico para *STM* en la formación de carpelos (Scofield *et al.*, 2007).

2. HIPÓTESIS

STM induce la expresión de genes de biosíntesis de citocininas y estas a su vez inducen la expresión de los genes de respuesta y señalización durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Analizar la función del gen *STM* y su relación con las citocininas durante el desarrollo del gineceo en *Arabidopsis thaliana*.

3.2. Objetivos específicos

- Estudiar la relación entre los genes de biosíntesis de citocininas (*IPT*) y *STM* durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis*.
- Evaluar el rol de *STM* como inductor de la producción de citocininas durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.
- Estudiar la relación de los genes de señalización a citocininas y *STM* durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Construcción de vectores

Para el estudio sobre la relación de los *IPT* y *STM* se plantearon dos estrategias: La primera consistió en el análisis de *STM* como interactor directo de los promotores de los *IPT*, mediante experimentos de interacción proteína-ADN en el sistema de ensayos de un híbrido en levadura (Y1H); y la segunda consistió en analizar líneas marcadoras *IPT* en un fondo de pérdida o ganancia de función inducible de *STM*. Sin embargo, desde que solo se contaba con dos líneas marcadoras (*IPT1::GUS* e *IPT5::GUS*) para la segunda estrategia, se hizo el procedimiento para la obtención de otras líneas *IPT* marcadas con proteína fluorescente. Es decir, para las dos estrategias se realizaron construcciones con los *IPT*.

4.1.1. Análisis de promotores *IPT* y diseño de oligonucleótidos cebadores

Se obtuvieron las secuencias de los genes *IPT1*, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 por su relevancia en la producción de citocininas en TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y se consideró como “promotor” la región intergénica previa al ATG de cada *IPT* sin tomar la región codificante del gen anterior. Cada uno de los promotores fue analizado en el programa “Promoter analysis” de la página de internet “PlantPan 2.0; <http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/>” para localizar sitios de unión a *STM* (TGAC, TGACRKS, GSAYRDNW, NNWHDN). Se diseñaron oligonucleótidos cebadores que amplificaran un producto que contuvieran al menos uno de estos sitios y que su longitud no rebasara los 2 kb. Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron en función del vector al que serían clonados posteriormente, es decir, a los oligonucleótidos directos se les adicionó la secuencia CACC (recomendada por el protocolo vector p-ENTRTM D-TOPO[®]) para facilitar la clonación direccional.

4.1.2. Amplificación de promotores *IPT*

A partir de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* Col-0, se amplificaron los promotores de los diferentes *IPT* con los oligonucleótidos diseñados anteriormente, siguiendo las características de cada uno de ellos como guía para encontrar las mejores condiciones de amplificación. Una vez que se encontró la mejor temperatura de alineamiento, se procedió a amplificar cada promotor. La Tabla 1 resume las características de cada par de oligonucleótidos. Además, las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes: 94°C durante 5 minutos (1X); 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento específica (ver Tabla 1) por 30 segundos y 72°C por 1 minuto por cada kb a amplificar (ver Tabla 1) (30X); 72°C durante 5 minutos (1X). Los resultados de cada prueba de condiciones y la amplificación final se analizaron en geles de agarosa 0.8% TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar los promotores de cada *IPT*. Se presenta la secuencia de los oligos directos y reversos así como la temperatura de alineamiento que se utilizó y el tamaño obtenido.

<i>IPT</i>	Oligo F (5'- 3')	Oligo R (5'- 3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)
<i>IPT1</i>	CACCTGATTTGGTCCGAGGACAC	CAATGGAGGTGGTGGCTGAC	59.5	1,700
<i>IPT3</i>	CACCAAAGGAATAGGCGTGAC	CAGGTGACTTTGCATGAAGGA	59.5	2,063
<i>IPT4</i>	CAC CGA CTT TGC TTT CTT CAC	TGG TTA CCC CAT GCA TAC AT	54.5	575
<i>IPT5</i>	CAC CAA TGA CTC TCG TAC AAG	ACTCCCCTGCTGGATTAAT	51.5	1,926
<i>IPT6</i>	CACCAGTCTCAGTCAGTAATAAG	TGGCTTTCTTCTCACTTAAGTG	53	745
<i>IPT7</i>	CACCTAACGACAATTCGTGCA	CCTAGAACTAAGTAGCCGTGTT	58.3	1,592
<i>IPT8</i>	CCA CTT CGG TTC TAT TCG CTC TC	GAG AGA CGA ATG TGG ACG TAA	58	1,358

4.1.3. Clonación, recombinación y obtención de vectores de expresión

Los promotores amplificados se purificaron con el kit (DNA Clean & ConcentratorTM-5; Zymo Research, Cat. No. D4004); se cuantificó su concentración por espectrofotometría en NanoDrop y se ligaron al vector de entrada p-ENTRTM D-TOPO[®] en una reacción de ligación con radio molar 2:1 del producto de PCR: vector TOPO[®] en reacciones de 3 ul. Cada reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* (One Shot[®]) químicamente competentes siguiendo el protocolo correspondiente y se plaquearon en medio LB con kanamicina (100 ug/mL). Posteriormente las bacterias transformadas se analizaron por PCR de colonia o el ADN plasmídico con digestiones con enzimas de restricción (*NotI* y *AscI*). Las bacterias que resultaron positivas se sometieron a extracción de ADN plasmídico (miniprep) para extraer el vector de entrada con el promotor correspondiente. Cada uno de los vectores de entrada se mandó a secuenciar con el oligo M13F al Laboratorio de Servicios Genómicos (LABSERGEN) del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) para corroborar la presencia del promotor adecuado. Las secuencia obtenidas se alinearon con las secuencias molde con ayuda de herramientas bioinformáticas como BLAST, MEGA y ApE.

Una vez que se corroboró la secuencia de los promotores en el vector de entrada se procedió a hacer las reacciones de recombinación con los vectores destino. Los vectores destino utilizados fueron: el CZN1018 (basado en pAbAi; Danisman *et al.*, 2012) para el análisis de las interacciones proteína-ADN (*STM*-promotor *IPT*) en levadura, con resistencia a Aureobasidina A (AbA) en levaduras cuando hay interacción y con resistencia a ampicilina en *E. coli*; mientras que para la fusión transcripcional con proteína roja fluorescente tdTomato se utilizó el PSG107, con resistencia a kanamicina en *E. coli* y a BASTA en plantas. La recombinación se realizó bajo el principio de la tecnología Gateway[®] (Invitrogen) y se siguieron reacciones simples de recombinación LR (150 ng de vector de Destino; 150 ng de vector de entrada; 2 ul de LR clonasa MIX) en 10 ul para cada vector de entrada con los dos vectores destino; se dejaron incubando una hora a temperatura

ambiente y se desactivó la enzima LR clonasa con 1 ul de proteinasa K incubando a 67°C por 10 min. Las reacciones obtenidas se utilizaron para transformar *E. coli* (DH5α) quimio o electrocompetente siguiendo el protocolo correspondiente y se plaquearon en medio con antibiótico de acuerdo al vector destino utilizado (Ampicilina 50 ug/mL para CZN1018 y Kanamicina 50 ug/mL para PSG107).

Las bacterias resultantes de la transformación de cada reacción LR con el CZN1018 fueron directamente analizadas por PCR de colonia y digestión con enzimas de restricción (*NotI* y *AscI*), debido a las diferencias en resistencia a antibióticos. Sin embargo, para el PSG107 todas las bacterias resultantes de la transformación de cada reacción LR fueron sometidas a una miniprep total en donde se extrajeron todos los plásmidos resultantes de la transformación (p-ENTR-IPT e IPT-PSG107), debido a la misma resistencia a la kanamicina. El resultado de cada miniprep total se utilizó para transformar células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* con el protocolo de transformación correspondiente y se plaquearon en medio LB con kanamicina (50 ug/mL) y rifampicina (25 ug/mL). En este paso se eliminan los plásmidos p-ENTR-IPT porque en *Agrobacterium* solo pueden crecer los binarios IPT-PSG107. Las colonias transformadas de *Agrobacterium* fueron analizadas por PCR de colonia y/o digestión con enzimas de restricción.

4.2. Ensayos interacción proteína-ADN

4.2.1. Transformación de Levadura

La transformación de levadura (de Folter y Immink, 2011) se hizo de acuerdo al protocolo de transformación en el que el plásmido se integra al genoma de la levadura. Para realizar la integración primero se linearizó cada uno de los productos de la recombinación de los promotores *IPT* y el plásmido CZN1018. La linearización se hizo con la enzima *Bsp119I* (Thermo Scientific™, Cat. No. ER0121) ya que tiene un solo sitio de corte que se encuentra en la región *URA-3* del plásmido CZN1018. De esta manera el plásmido solo es capaz de sintetizar el

URA cuando está en el genoma de la levadura, debido a que en el genoma se vuelve a completar la región URA-3.

Para cada reacción de digestión se utilizó 3 ug de cada uno de los plásmidos y se incubó por dos horas a 37°C. Una vez que transcurrió el tiempo, se corroboró la digestión total en un gel de agarosa 0.8% TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio. Una vez que se tuvo cada uno de los plásmidos en configuración linear, se procedió al protocolo de integración al genoma.

El protocolo de integración del plásmido al genoma de la levadura consistió de los siguientes pasos para cada construcción: se hizo un cultivo de la cepa PJ69-4α en 10 mL de medio rico YPAD en un matraz de 50 mL a 30°C, 200 rpm durante toda la noche; se diluyó el cultivo ON en medio SD completo y se incubó a 30°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,4-0,6; se centrifugó por 5 min a 5,000 rpm; se resuspendió el pellet en 25 mL de LiAc 100 mM y se centrifugó por 5 minutos a 5,000 rpm; se removió el sobrenadante y se resuspendió en PEG 50% para posteriormente agregar 360 ul de LiAc 1 M, 50 ul de DNA de esperma de salmón (10 mg/mL) precalentado, 20 ul del plásmido linearizado y 680 ul de agua MQ; se vortexeó durante un minuto; se incubó a 42°C por 20 min; se centrifugó por 5 minutos a 5,000 rpm; se lavaron los pellets con 500 ul de agua MQ y se centrifugó por 5 minutos a 5,000 rpm; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 300 ul de agua MQ; se plaqueó en medio de selección SD-Ura y se incubó por 3 días a 30°C.

Una vez que se transformó la levadura, se aislaron ocho colonias individuales de cada construcción en medio selectivo SD-Ura.

4.2.2. Ensayos de Autoactivación con AbA.

El promotor de cada *IPT* está clonado río arriba del gen *AbA'*, gen de resistencia a Aureobasidina A (AbA). Si el sitio en donde se incorporó el plásmido es muy activo puede que la resistencia a AbA se active automáticamente y se podrían generar falsos positivos. Por lo anterior, antes de hacer el ensayo de interacción se

estandarizó la concentración de AbA para cada construcción en un ensayo de autoactivación.

El ensayo de autoactivación consistió en la siembra de tres colonias independientes de cada construcción en medio SD-Ura con diferentes concentraciones de AbA. En este caso se utilizaron las concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ng/mL. Una vez sembradas, se incubaron a 30°C por 6 días y se monitoreó su crecimiento tomando fotografías cada dos días.

La concentración utilizada en el ensayo Y1H para cada construcción fue la mínima en la que las tres colonias pararon de crecer.

4.2.3. Ensayos de un Híbrido (Y1H)

Para realizar el ensayo de un híbrido primero se hizo un cruce de las levaduras que contenían las diferentes regiones promotoras de los *IPT* (en cepa PJ69-4 α) con las que contenían el AD-STM (en cepa PJ69-4A; Marsch-Martínez *et al.*, 2014). Para este cruce, primero se hizo el inóculo de las colonias a utilizar en medio SD líquido –Ura para los promotores *IPT* y –Trp para el AD-STM y se incubó durante toda la noche a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó una gota (2 μ l aprox) de cada colonia con los promotores, se colocó en medio rico YPAD semisólido y se dejó secar. Una vez que se secó, de igual manera se tomó una gota de colonia con AD-STM, se colocó encima de cada gota seca de cepa alfa y se dejó secar. Este cultivo se incubó ON y al día siguiente se resembró el producto del cruce de cada unión en medio selectivo SD –Ura y –Trp para seleccionar diploides, es decir, seleccionar las levaduras que tenían los promotores *IPT* y el AD-STM. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento para los AD de *BP* y *KNAT2* por su estrecha relación con *STM*.

Una vez que se obtuvieron las colonias diploides, se sembraron en medio selectivo SD –Ura, -Trp y con la concentración necesaria de AbA para cada uno de los promotores y se incubaron a 30°C por 5 o 6 días. Como control positivo se utilizó un dímero con el AD de TCP-20 y un TFT-TCP8 que se une al promotor del

gen *LOX2* a una concentración de 175 ng/mL de AbA; y como control negativo se utilizó un dímero AD-TCP6 y TFT-TCP20 que se comprobó que no se une al promotor del gen *LOX2* (Danisman *et al.*, 2012). Las colonias que crecieron en presencia de AbA, indicaron interacción directa.

4.3. Generación de líneas transgénicas IPT

4.3.1. Transformación de Arabidopsis

Una vez que se obtuvieron los vectores de expresión IPT-PSG107 en *Agrobacterium*, se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis* por floral dip de la siguiente manera: Se incubó una colonia de *Agrobacterium* de cada vector en medio LB líquido con kanamicina (50 ug/mL) y rifampicina (25 ug/mL) a 28°C en agitación por 48 horas; se centrifugaron 3 mL en dos rondas de 1.5 mL de cada cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL; se resuspendió el pellet en 1.5 mL de medio de infiltración (2.3 g/L de medio MS; 50 g/L de sucrosa al 5%; y Silwet 0.02%); se sumergieron inflorescencias de *Arabidopsis* sin silicuas ni flores abiertas (removidas previamente) en el medio de infiltración+*Agrobacterium* durante 10 s. Se repitió el proceso para 8 plantas por construcción. Luego de la transformación, las plantas se dejaron crecer y secar para posteriormente cosechar las semillas producto de la transformación.

4.3.2. Selección de transformantes de Arabidopsis

Una vez que se obtuvieron semillas de cada transformación, se sembraron de manera masiva en charola con sustrato (vermiculita, perlita y suelo orgánico en proporción 1:1:3, respectivamente) bajo condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) en una cámara de crecimiento a 22°C. Una semana después las plántulas obtenidas fueron asperjadas tres veces por semana durante dos semanas con Glufosinato de amonio (BASTA), ya que el vector que las transformó les confiere la característica de resistencia a este herbicida. Las plantas resistentes se dejaron crecer en el mismo sustrato en condiciones de

invernadero y fueron genotipadas por la fluorescencia que les otorga el vector de expresión.

4.3.3. Análisis de fluorescencia tdTomato

Debido a que la clorofila le confiere a la planta una autofluorescencia que se ve excitada a una longitud de onda cercana a la de tdTomato, se intentó clarear el tejido antes del análisis en confocal como se muestra enseguida: Se disectaron los tejidos a observar de acuerdo al patrón de expresión predicho (e-FP Browser; Miyawaki *et al.*, 2004); se fijaron los tejidos con paraformaldehído (PFA) al 4% (w/v) en PBS 1X al vacío por 30 minutos a temperatura ambiente; se lavaron los tejidos con PBS 1X por un minuto y se dejaron clarear con solución ClearSee (polvo xilitol al 10% p/v; deoxicolato de sodio al 15% p/v y urea al 25% p/v) a temperatura ambiente; los tejidos clareados se tiñeron con Calcofluor Blanco (100 ug/mL) en solución de ClearSee por 2 minutos; luego de la tinción, los tejidos se lavaron con ClearSee y se observaron en el confocal LSM 800 Carl Zeiss. Además, el tdTomato se excitó usando el láser a 581 nm y el Calcofluor a 432 nm.

4.4. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para el análisis del rol de *STM* como inductor de la producción de citocininas se trabajó con tres diferentes genes importantes en la respuesta de citocininas: los reguladores de respuesta de tipo A: *ARR5* y *ARR7* y con la línea sintética *TCS*. Para el análisis de la interacción de *STM* con genes de señalización de citocininas se trabajó con los tres genes de receptores de citocininas: *AHK2*, *AHK3* y *AHK4*. Y para una parte del estudio de la relación entre los genes de biosíntesis de citocininas (*IPT*) y *STM* se realizó analizando uno de sus genes importantes para esta ruta: *IPT1*. Para lo cual, se consiguieron líneas transgénicas de los genes mencionados clonados río arriba de genes reporteros ya sea el de proteína verde fluorescente (GFP) o el gen *UIDA* que codifica para la β -glucuronidasa (GUS). Las líneas *ARR5::GFP*, *ARR7::GFP* y *TCS::GFP* se obtuvieron del laboratorio de Bruno Muller (Universidad de Zurich); las líneas *AHK3::GUS*, *AHK4::GUS* y

IPT1::GUS se obtuvieron del laboratorio de Tatsuo Kakimoto; y la línea *AHK2::GUS* se obtuvo del laboratorio de Chia-Yi Cheng.

El análisis de los genes en las líneas mencionadas se hizo en un fondo de pérdida o ganancia de función inducible de *STM* por las líneas *35S::STM::TGV* y *STM-RNAi* (ambas en fondo *Ler*), obtenidas del laboratorio de Simon Scofield (Universidad de Cardiff).

Todas las plantas fueron germinadas en sustrato (vermiculita, perlita y suelo orgánico en proporción 1:1:3, respectivamente) bajo condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) en una cámara de crecimiento a 22°C. Dos semanas después de la germinación las plantas se transfirieron al invernadero bajo condiciones de luz natural en un rango de temperatura de 22 a 28°C.

4.5. Cruzas de líneas marcadoras con líneas inducibles

Las líneas madres fueron emasculadas, quitándoles los 6 estambres a cada botón que se pretendía polinizar. Una vez emasculadas se les transfirió polen del padre en dos ocasiones (una al momento de emascular y otra a las 24 horas) para aumentar la eficiencia de fertilización. Los botones utilizados para la cruce se marcaron y las silicuas resultantes se dejaron crecer y secar para la posterior cosecha de sus semillas producto de cruce.

Las semillas colectadas de cada producto de cruce fueron sembradas en medio MS para asegurar la germinación. Cada una de las placas con semillas se puso en condiciones de día largo en cámara de crecimiento y una vez que alcanzaron un tamaño considerable, se transfirieron a sustrato y se dejaron crecer en condiciones de invernadero.

4.6. Análisis de pérdida o ganancia de función de *STM*

Debido a que los productos de cruce provienen de dos líneas homocigotas dominantes, una inducible para ganancia o pérdida de función y otra marcadora con GUS o GFP, se trabajó directamente con la generación F1. Antes de hacer la

inducción correspondiente a cada producto de cruce, se estandarizaron las condiciones de inducción para cada una de las líneas parentales. Se hicieron pruebas para probar la concentración de Dexametasona a utilizar (10 uM, 30 uM y 60 uM); el método de inducción (Asperjar, aplicar, floral dip) y el tiempo a esperar para que las líneas presentaran fenotipo. Al final, las plantas que resultaron de la silicua producto de cada cruce se indujeron con Dexametasona 60 uM en DMSO (concentración sugerida por Scofield *et al.*, 2007) por el método de floral dip (Anexo 1). Se analizaron tres estadios de desarrollo del gineceo: un temprano (estadio 8), un medio (estadio 9 o 10) y un tardío (estadio 12-13) de dos inflorescencias de tres plantas de cada línea a las 48 horas después de la inducción. Los análisis se hicieron de manera longitudinal (gineceo completo) y de manera transversal (cortes de gineceo) después de hacer el tratamiento correspondiente de acuerdo al tipo de gen marcador (GUS o GFP).

4.6.1. Análisis confocal para GFP

Se colectaron inflorescencias de las plantas inducidas y se disectaron gineceos en diferentes etapas para su procesamiento. Unos gineceos fueron tratados enteros y otros fueron cortados a la mitad del ovario para el análisis transversal, de tal manera que se pudiera tener un mejor panorama del patrón de expresión. El tratamiento se resume de la siguiente manera (basado en Reyes-Olalde *et al.*, 2015): cada gineceo (completo o en partes) se colocó en una solución con glicerol al 20% que contenía yoduro de propidio (IP) 50 uM durante 40 segundos y después en un porta o cubreobjetos sobre glicerol al 25% para su observación. Las imágenes se capturaron en el microscopio confocal invertido LSM 510 META. Además, el IP se excitó usando el láser de Argón a 514 nm y el GFP a 488 nm. Las emisiones de IP y GFP fueron filtradas a LP 575 nm y 500-550 nm, respectivamente.

4.6.2. Análisis del reportero GUS

-Fijación de muestras

Se colectaron inflorescencias de las plantas inducidas en los tiempos correspondientes y se les procesó de la siguiente manera: 1) Se colocaron en acetona fría al 90% por 20 minutos. 2) Se lavaron con solución buffer (buffer fosfato sódico 50 mM pH 7; tritón-X100 0.1%; EDTA 10 mM) durante 5 minutos en hielo. 3) Se retiró el buffer de lavado y se añadió la misma solución más ferricianuro potásico 5mM; ferrocianuro potásico 5 mM y el sustrato para la enzima beta-Glucuronidasa (GUS), X-Gluc (1 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido) y se sometió a vacío por 20 minutos en hielo. 4) Se incubaron las muestras en oscuridad a 37°C por el tiempo necesario dependiendo de la línea a analizar: *AHK2::GUS*, *AHK3::GUS*, *AHK4::GUS* por 20 horas e *IPT1::GUS* por 72 horas. 5) Se realizaron lavados en etanol al 20, 35 y 50% durante 30 minutos por solución. 6) Se fijaron los tejidos en una solución de formaldehído, ácido acético y etanol (FAE) al vacío por 20 minutos y se dejaron reposar durante dos horas a temperatura ambiente. 7) Se lavaron con etanol al 70% por 24 horas a 4°C. 8) Se deshidrataron en series de etanol al 80, 90 y 100% durante una hora por solución.

-Preparación de muestras para observación longitudinal

Una vez que las muestras pasaron por todas las series de etanol hasta el del 100% se disectaron gineceos en diferentes estadios de desarrollo y se colocaron en una solución con glicerol al 50%. Las imágenes de los gineceos se obtuvieron utilizando el Microscopio Leica EZ4D (Leica, Wetzlar, Germany).

5. RESULTADOS

5.1. Construcción de vectores

5.1.1. Análisis de promotores

Al analizar cada uno de los promotores se encontró que poseen diferencias en cuanto a la presencia de sitios de unión de *STM*. Se encontró con algunos que contenían solo un sitio como el *IPT1*, *IPT4* o *IPT5*; otros que poseían unos cuantos (3-4 sitios) como *IPT6* e *IPT8* y otros que tenían sitios abundantes (10-11) como *IPT3* e *IPT7*. Además, cada uno de estos promotores considerados a amplificar presentó diferente longitud. En la Figura 4 se resume la longitud de cada promotor, así como sus sitios de unión encontrados después del análisis en PlantPan 2.0.

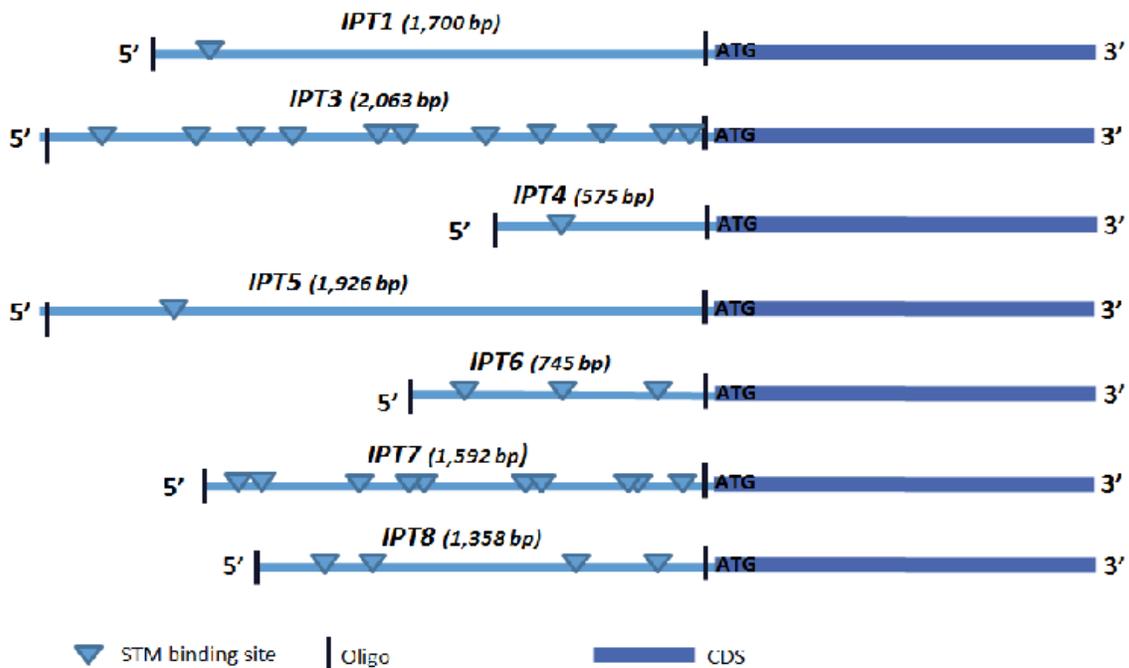


Figura 4. Esquema de promotores de IPT. En azul oscuro se presenta la región codificante; en azul claro el promotor considerado después del análisis en PlantPan 2.0; los triángulos invertidos indican los sitios de unión de *STM*; y las franjas verticales que flanquean el promotor representan la localización de los oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar cada uno de los promotores.

5.1.2. Amplificación de promotores

Los promotores amplificados de acuerdo a sus condiciones señaladas en la metodología resultaron ser del tamaño esperado de acuerdo a los oligonucleótidos diseñados. En la Figura 5 se presenta el gel de agarosa en donde se analizó la amplificación final.

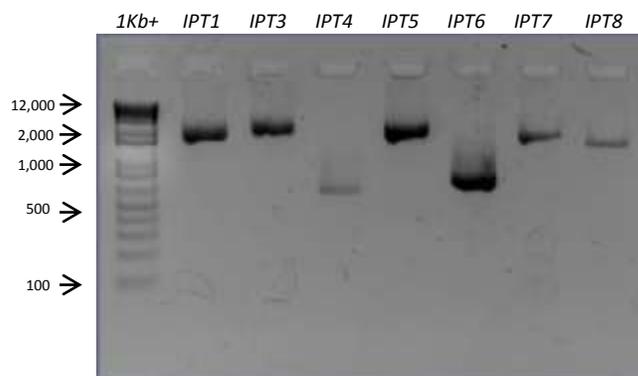


Figura 5. Bandas obtenidas al amplificar cada uno de los promotores *IPT*. Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa 0.8% TBE, teñidos con bromuro de etidio. Sus tamaños en pares de bases corresponden a los esperados de acuerdo al marcador molecular 1KbPlus: *IPT1*: 1,700 pb; *IPT3*: 2063 pb; *IPT4*: 575 pb; *IPT5*: 1,926 pb; *IPT6*: 745 pb; *IPT7*: 1, 592 pb e *IPT8*: 1, 358 pb.

5.1.3. Clonación y obtención de vectores de expresión

La ligación de los promotores de los *IPT* al vector de entrada p-ENTR™ D-TOPO® resultó exitosa, prueba de ello es la presencia de secuencias correctas con una identidad mayor al 95% con las secuencias de TAIR que se utilizaron como molde para el diseño de oligos.

Por otro lado, en cuanto a los vectores de expresión (CZN1018 para Y1H y PSG107 para fusión con tdTomate) obtenidos luego de la recombinación, se pudo comprobar la presencia del promotor de los diferentes *IPT* en cada uno de ellos de manera independiente, ya sea por PCR de colonia, por digestión con enzimas de restricción o ambas. En la Tabla 2 se resumen los vectores de expresión obtenidos para los diferentes *IPT* y el método de comprobación que se utilizó para cada uno de ellos.

Tabla 2. Construcciones obtenidas con los diferentes IPT. En la tabla está señalando el método utilizado para el diagnóstico de cada una de las construcciones.

Vector Destino	Promotor	Método de Diagnostico
CZN1018	<i>IPT1</i>	PCR Colonia y Digestión
	<i>IPT3</i>	PCR Colonia y Digestión
	<i>IPT4</i>	PCR Colonia y Digestión
	<i>IPT5</i>	PCR Colonia y Digestión
	<i>IPT6</i>	PCR Colonia y Digestión
	<i>IPT7</i>	PCR Colonia y Digestión
	<i>IPT8</i>	PCR Colonia y Digestión
	PSG107	<i>IPT1</i>
<i>IPT3</i>		PCR Colonia
<i>IPT5</i>		PCR Colonia
<i>IPT6</i>		Digestión
<i>IPT7</i>		PCR Colonia
<i>IPT8</i>		PCR Colonia

5.2. Interacción proteína-ADN

5.2.1. Prueba de Autoactivación

Con las levaduras transformadas exitosamente con cada construcción, se procedió al ensayo de autoactivación. En este ensayo se obtuvo un diferencial de crecimientos restringidos de las levaduras en función de la concentración del antibiótico Aureobasidina A (AbA) y el promotor presente en la construcción utilizada para transformar las diferentes levaduras. En general, se observó una variación muy marcada entre construcciones. En algunas construcciones hubo mucha autoactivación, por lo que requirieron mayor concentración de AbA para dejar de crecer. En otras, la autoactivación se presentó de menor proporción por lo que dejaron de crecer en presencia de poco antibiótico. Por otro lado, existe también una ligera variación entre colonias (réplicas biológicas) pero esta diferencia es mínima.

De manera específica, para el *IPT1* hubo mucha autoactivación hasta concentraciones altas de AbA, sin embargo se pudo definir que a 500 ng/mL dejan de crecer casi en su totalidad las tres colonias estudiadas

(Figura 6). Por lo que la concentración definida para esta construcción fue de 550 ng/mL.

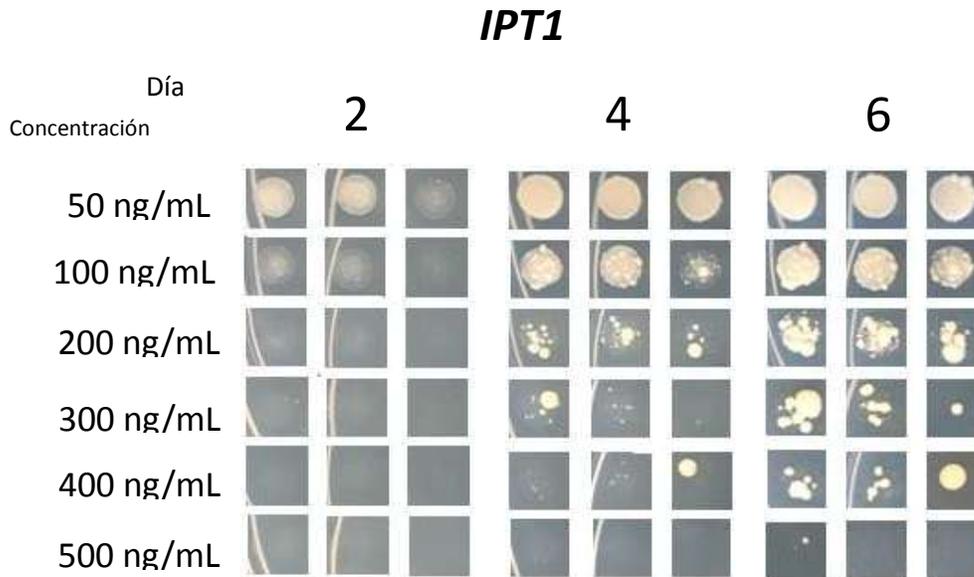


Figura 6. Esquema de autoactivación del promotor *IPT1*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante seis días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA.

Para el *IPT3* al igual que en el *IPT1* hubo mucha autoactivación pero también se pudo definir que a 500 ng/mL dejan de crecer casi en su totalidad las tres colonias estudiadas (Figura 7). Por lo que la concentración definida para esta construcción fue de 550 ng/mL.

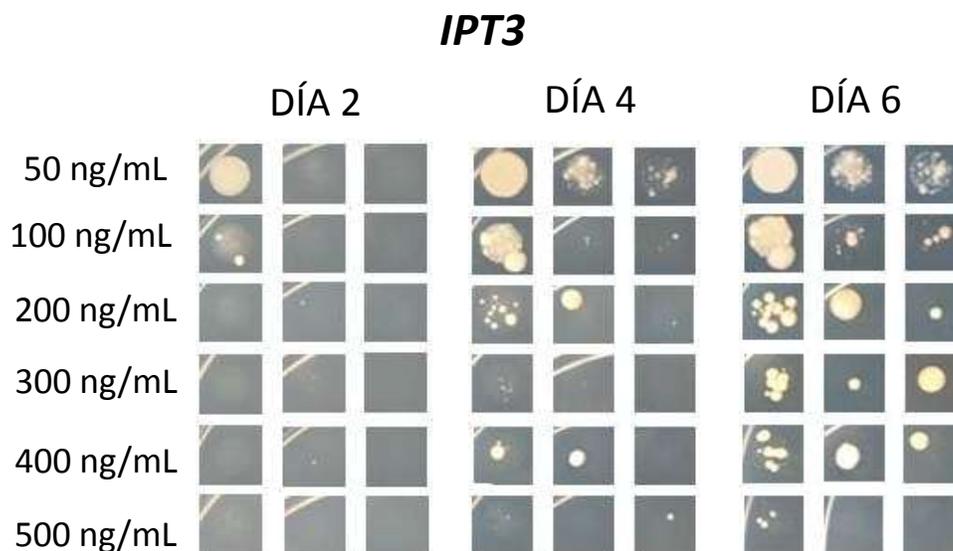


Figura 7. Esquema de autoactivación del promotor *IPT3*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante seis días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA.

Para el promotor de *IPT4* se presentó una situación en la que fue imposible encontrar una concentración de AbA en la que dejaran de crecer las levaduras (Figura 8). Por lo anterior, *IPT4* se descartó para experimentos posteriores.

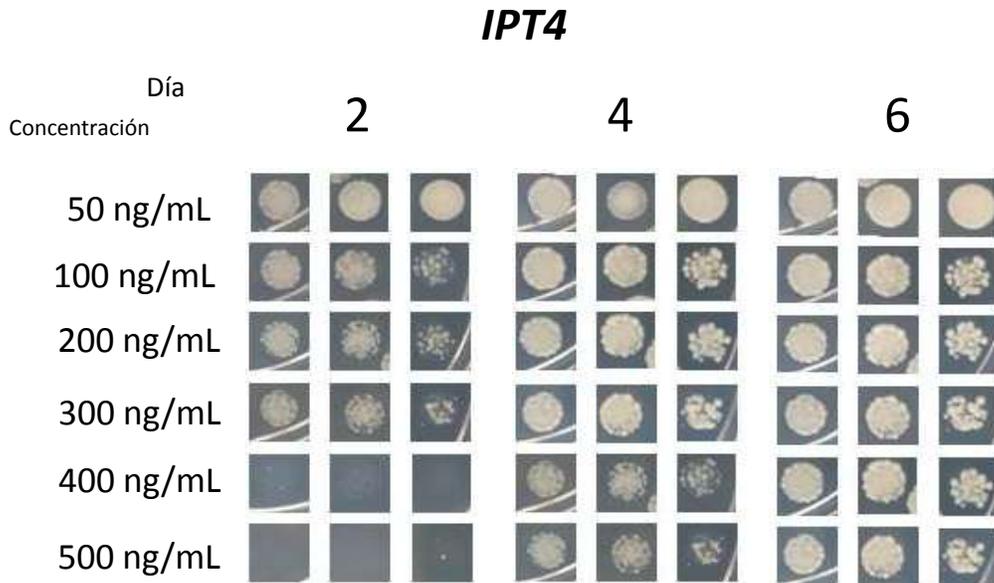


Figura 8. Esquema de autoactivación del promotor *IPT4*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante seis días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA.

Para el *IPT5* se presentó una autoactivación sencilla de detectar y deletar con una concentración de 200 ng/mL (Figura 9). Sin embargo, como en la colonia número uno sigue habiendo un poco de crecimiento a esta concentración, se utilizó una concentración de 250 ng/mL.

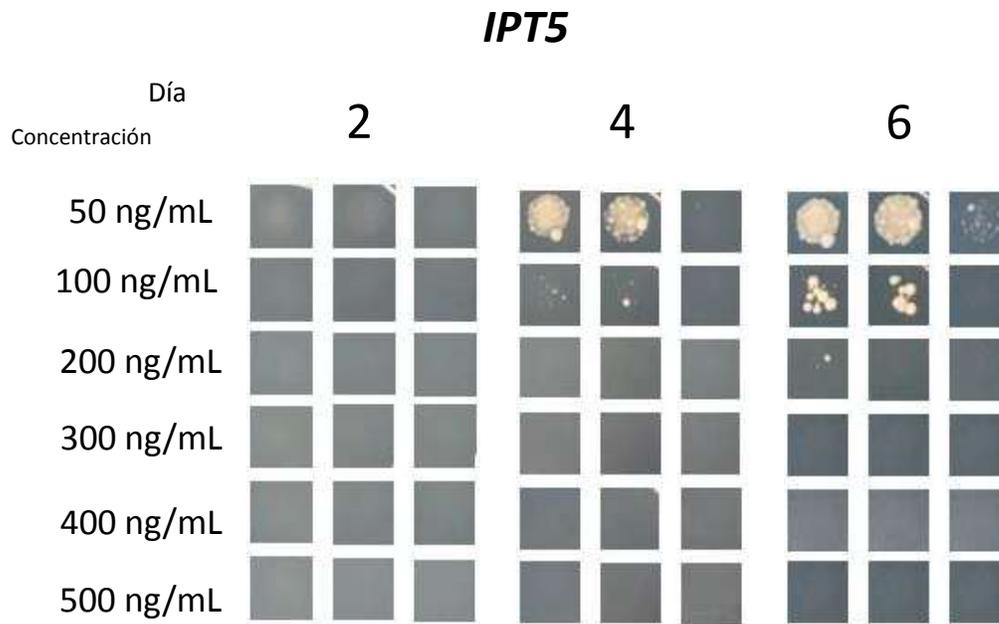


Figura 9. Esquema de autoactivación del promotor *IPT5*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante seis días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA.

La construcción del *IPT6* presentó una autoactivación muy pobre, por lo que se pudo definir una menor concentración de AbA para el Y1H, 100 ng/mL (Figura 10).

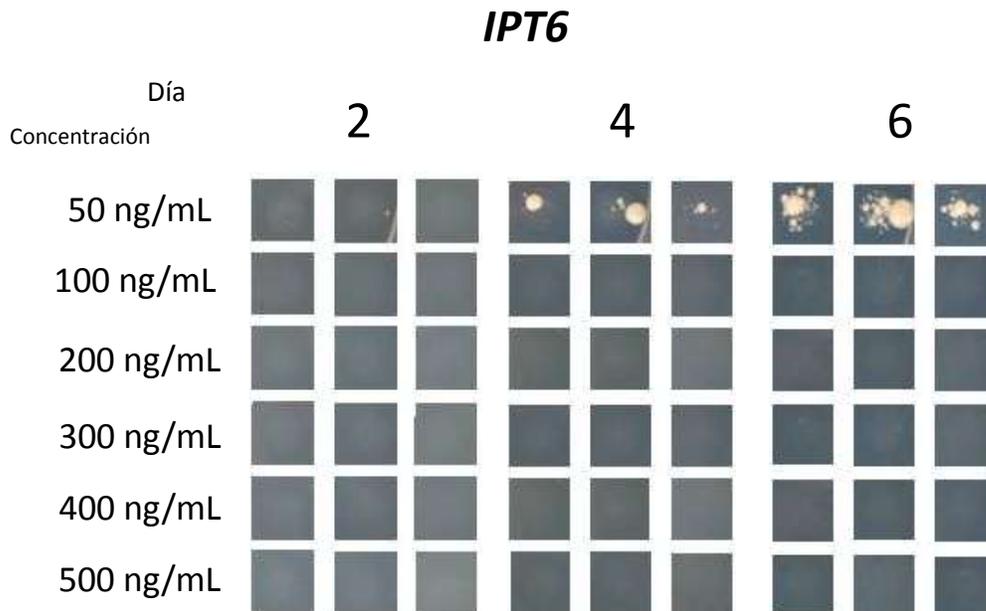


Figura 10. Esquema de autoactivación del promotor *IPT6*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante seis días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA.

El *IPT7* presentó poca autoactivación en las tres colonias analizadas, por lo que se pudo definir que en 300 ng/mL las colonias dejan de crecer (Figura 11).

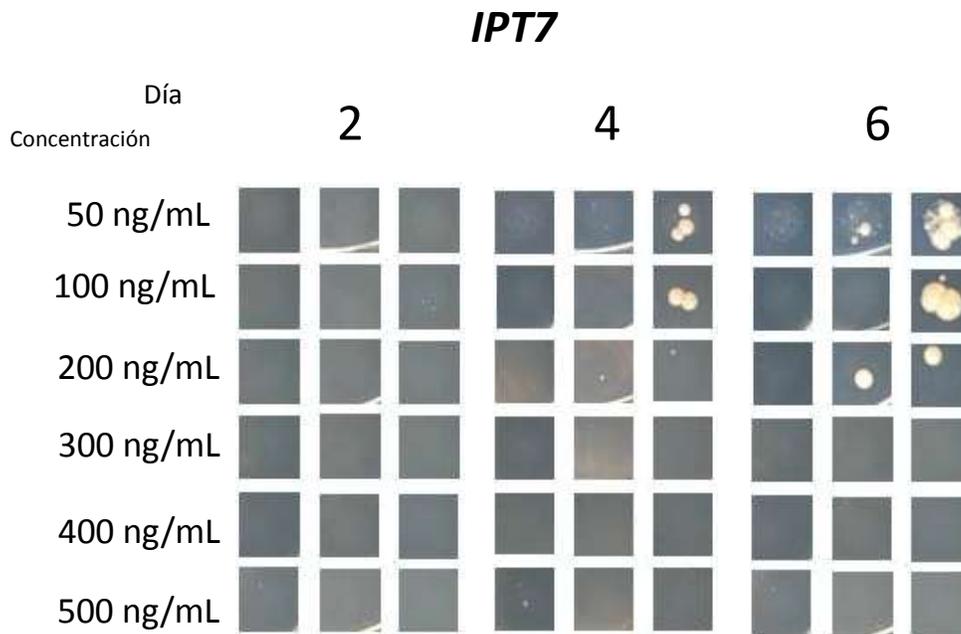


Figura 11. Esquema de autoactivación del promotor *IPT7*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante seis días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA.

Finalmente, para la construcción de *IPT8*, se seleccionó una concentración de 200 ng/mL para realizar el ensayo de un híbrido (Figura 12).

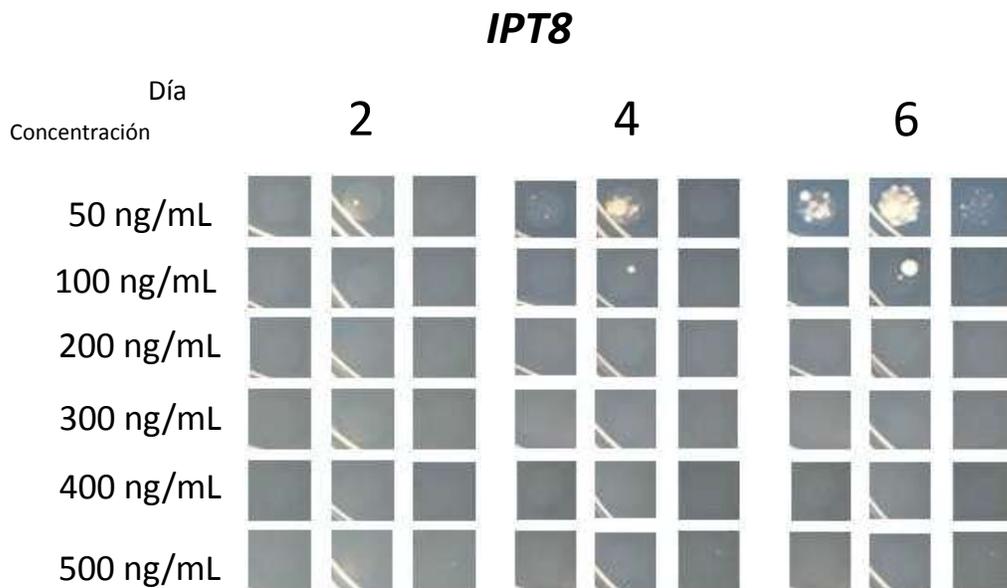


Figura 12. Esquema de autoactivación del promotor *IPT8*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante seis días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA.

5.2.2. Ensayos de un Híbrido (Y1H)

El ensayo de un híbrido nos muestra que las levaduras de las construcciones con los promotores de *IPT6* e *IPT8* pueden crecer en presencia de una concentración de AbA a la que normalmente no crecerían. Este resultado sugiere que el AD del FT de *STM* se está uniendo a algún sitio de los promotores mencionados (Figura 13). En el caso del resto de los promotores, no hubo crecimiento de levadura. Este resultado sugiere que en estos casos el AD de *STM* no se está uniendo al promotor.

Adicionalmente, se hizo el ensayo con otros dos genes *KNOXI* (*BP* y *KNAT2*). Para el caso de *BP*, al igual que en *STM*, se observó crecimiento significativo en las construcciones con los promotores de *IPT6* e *IPT8*. Por su parte, *KNAT2* solo presentó crecimiento significativo con la construcción *IPT6*. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 13, *BP* y *KNAT2* presentaron activación para otros promotores aunque esta no parece ser representativa.

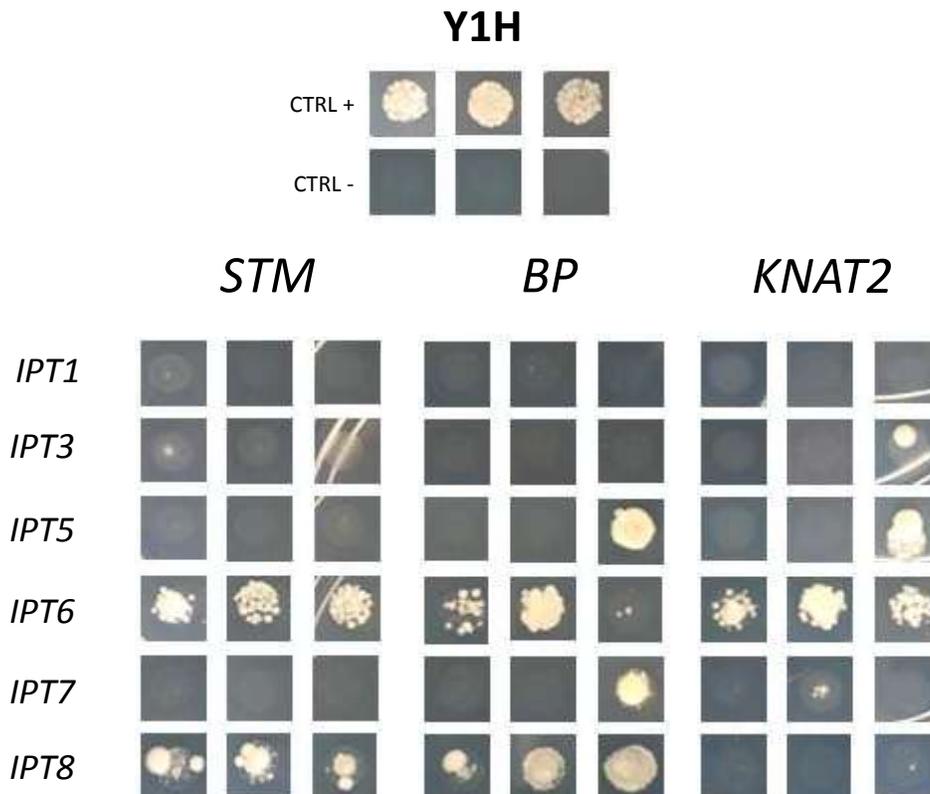


Figura 13. Ensayo de un híbrido. Colonias de levaduras con diferentes construcciones de IPT que crecieron o no en presencia de AbA. La unión de los factores de transcripción a los promotores presentes río arriba del gen de resistencia al antibiótico permitió su activación.

5.3 Líneas transgénicas *IPT* con fusión con *tdTomato*

Casi todas las construcciones de los *IPT* resultaron exitosas en la transformación de *Arabidopsis*, ya que presentaron transformantes resistentes a BASTA (Tabla 3). A excepción de *IPT5* e *IPT7*, quienes no presentaron plantas con resistencia a este herbicida hasta el momento. Adicionalmente, es importante señalar que el análisis de fluorescencia de cada línea resistente no se realizó completamente hasta el momento.

Tabla 3. Número de transformantes obtenidas (resistentes a BASTA) para cada construcción.

Promotor en PSG107	No. De Transformantes
<i>IPT1</i>	5
<i>IPT3</i>	3
<i>IPT5</i>	0
<i>IPT6</i>	9
<i>IPT7</i>	0
<i>IPT8</i>	3

5.4. *IPT* bajo la pérdida o ganancia de función de *STM*

En el control sin inducir, la expresión de *IPT1* no se observa en estadios jóvenes del desarrollo del gineceo. Es hasta un estadio tardío en el desarrollo de esta estructura cuando se puede observar expresión en una región de los óvulos. Al inducir la ganancia o pérdida de función de *STM* en la línea disponible *IPT1::GUS* se puede observar que la en estadios jóvenes e intermedios se mantiene la expresión nula de este gen. En un estadio más tardío del desarrollo, esta expresión se mantiene en la misma zona de los óvulos pero con ligeros cambios en intensidad con respecto al control (Figura 14).

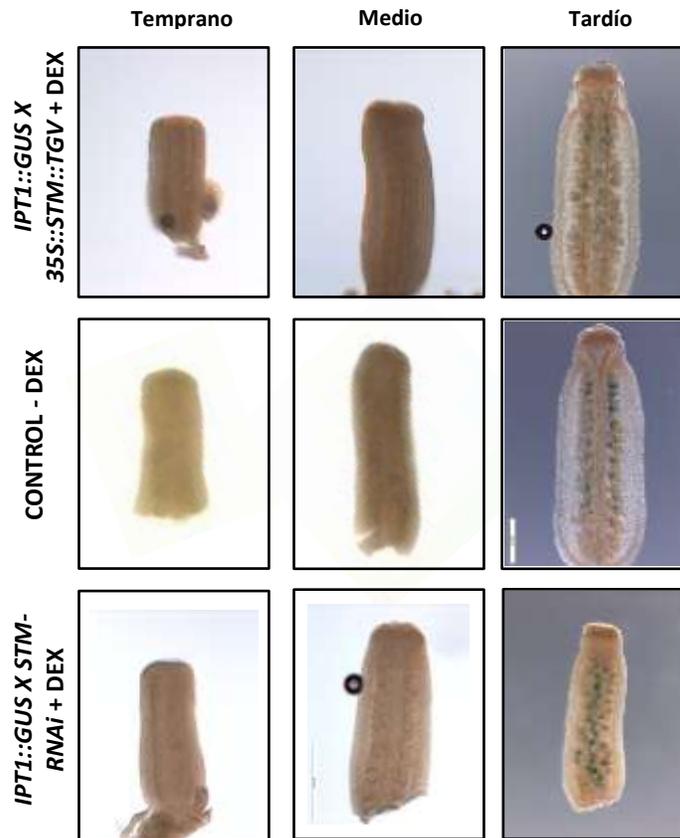


Figura 14. Imágenes de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *IPT1::GUS* en ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control es el producto de cruce sin inducir con Dexametasona.

5.5. *STM* como inductor de la síntesis de citocininas

5.5.1. Respuesta a citocininas con línea *TCS::GFP*

En la Figura 15 se puede observar que de manera longitudinal, la línea sintética *TCS::GFP* muestra un patrón de expresión en el que la proteína GFP no se puede detectar con el método usado en estadios tempranos y medios en el desarrollo del gineceo. En estadios tardíos, GFP es fácilmente observable en los márgenes de las valvas. Al inducir la ganancia de función de *STM*, los estadios tempranos y medios del desarrollo mantienen indetectable la proteína GFP. Mientras que en un estadio tardío, se observa GFP en el mismo sitio de los márgenes de las valvas en una intensidad similar al control. De la misma manera, cuando se induce la pérdida de función de *STM*, GFP no se observa en estadios jóvenes y medios del

desarrollo del gineceo pero sí en un tardío. La imagen tomada del estadio tardío bajo pérdida de función de *STM* parece tener el mismo patrón e intensidad que el control.

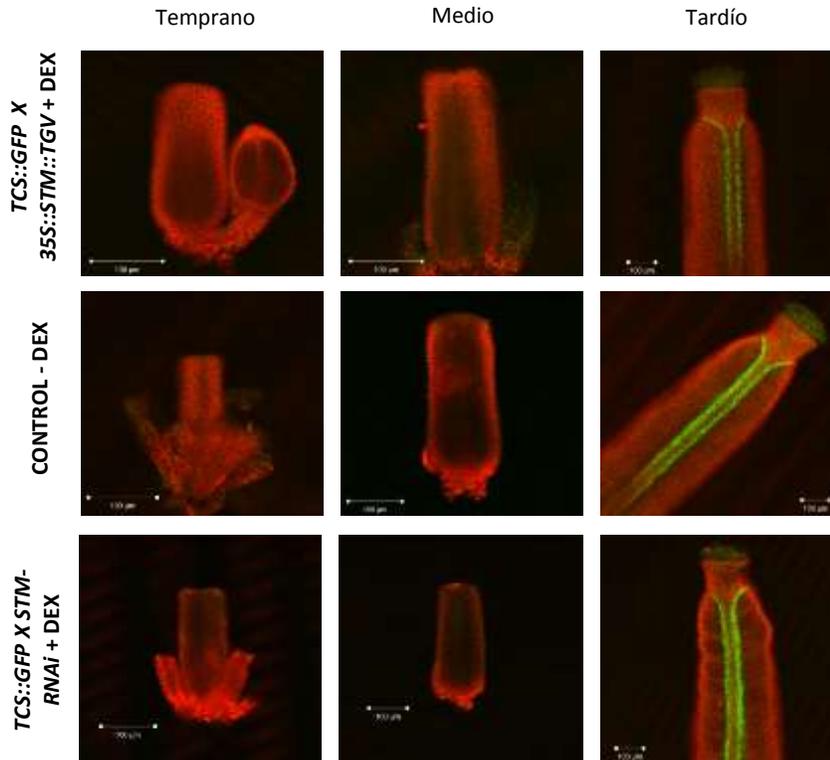


Figura 15. Imágenes en microscopía confocal de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *TCS::GFP* en un fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

En el mismo contexto, de manera transversal (Figura 16), se puede observar en el control que GFP se detecta ligeramente en estadios tempranos del desarrollo del gineceo. En un estadio intermedio se puede detectar una señal más clara en el tejido medio, en la región donde se va formando el tracto de transmisión. Y, en un estadio tardío, GFP se hace presente en el mismo sitio del tejido medio y en los márgenes de las valvas. Cuando se hace la inducción de ganancia de función de *STM*, el patrón parece ser conservado, con la única excepción de que en el estadio tardío aumenta ligeramente la intensidad de GFP. De la misma forma, cuando se induce la pérdida de función de *STM*, parece haber un ligero cambio en

intensidad de la GFP, donde se reduce un poco en solo en el estadio tardío en el desarrollo del gineceo.

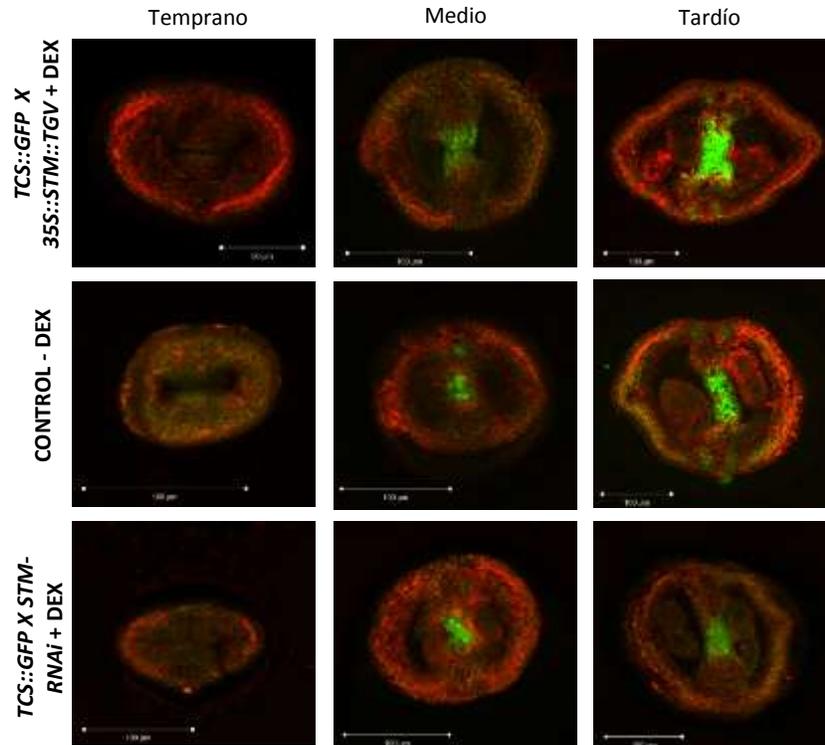


Figura 16. Imágenes en microscopía confocal de cortes de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *TCS::GFP* en un fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

5.5.2. Respuesta a citocininas con la línea *ARR5::GFP*

El gen *ARR5* es un regulador de respuesta de tipo A, es muy utilizado para identificar la presencia de citocininas. Este gen tiene una expresión muy importante durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis*. Si se observa longitudinalmente el gineceo durante diferentes etapas de desarrollo se puede ver un patrón característico. En este estudio (Figura 17) se observó que en un estadio joven, *ARR5* es indetectable; en un estadio intermedio su expresión aumenta drásticamente y se puede observar su expresión en la parte interna del gineceo en desarrollo, justo en el tejido medio. Cuando el gineceo madura un poco más, la

expresión de *ARR5* se mantiene fuerte en el tejido medio y además se dispersa a los funículos. Cuando se observan gineceos en donde se indujo la pérdida o ganancia de función de *STM*, la expresión de este regulador de respuesta parece mantenerse similar a la expresión encontrada en el control. De tal manera que la expresión se mantiene nula en estadios tempranos; mientras que en estadios intermedios y tardíos, la expresión de *ARR5* se sigue haciendo presente en el tejido medio y funículos de manera respectiva al estadio de desarrollo.

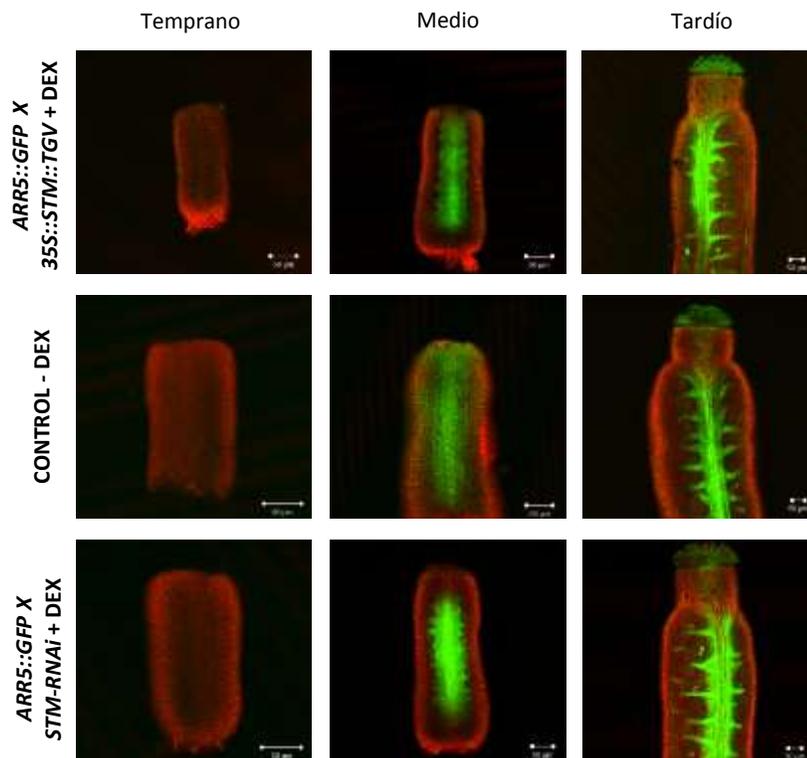


Figura 17. Imágenes en microscopía confocal de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *ARR5::GFP* en fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

Para tener un panorama más amplio de los patrones de expresión en los tejidos internos del gineceo de *Arabidopsis* en esta línea, también se hizo un análisis transversal. La expresión observada en el control de este estudio parece estar ausente en un estadio temprano; mientras que cuando el gineceo alcanza un estadio intermedio, se puede observar una gran expresión en el tejido medio. En

un estadio más avanzado de desarrollo, *ARR5* se presenta en el tejido medio y resalta la expresión en la primera capa de cada uno de los dos componentes del septum. Cuando se induce la ganancia o pérdida de función de *STM*, la expresión de *ARR5* se mantiene nula en estadios tempranos de desarrollo. En estadios intermedios el patrón se observa muy similar al control, aunque se pueden apreciar algunas diferencias en intensidad de la proteína GFP. Los cortes transversales de los gineceos de estadios tardíos que fueron inducidos con dexametasona para la ganancia de función de *STM*, presentan un ligero aumento de la intensidad de GFP con respecto al control, sobre todo en la región del tracto de transmisión. En cambio, bajo la inducción de la pérdida de función de *STM*, la señal de GFP de un gineceo en estadio tardío parece mantenerse muy similar a la del gineceo control (Figura 18).

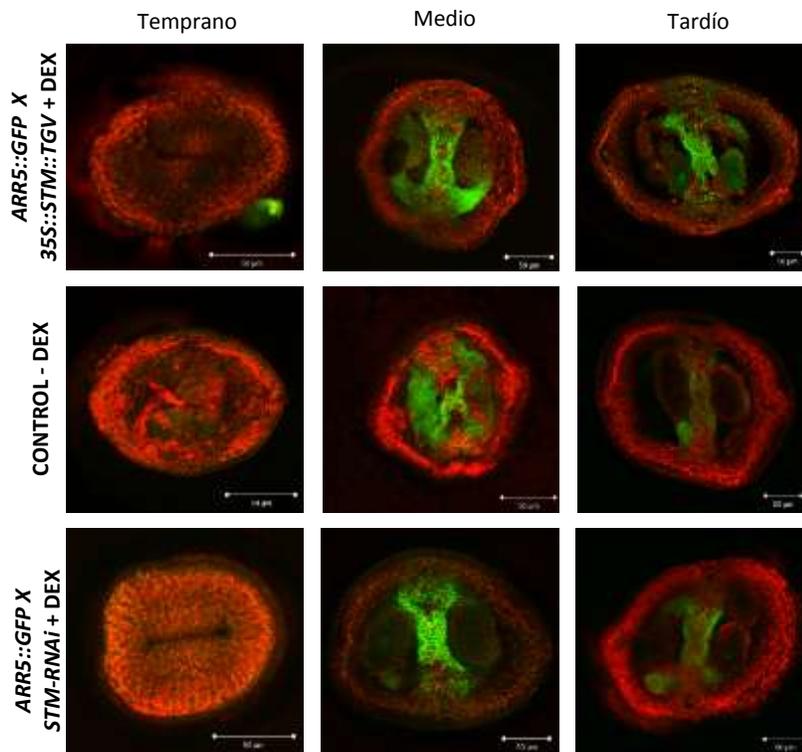


Figura 18. Imágenes en microscopía confocal de cortes de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *ARR5::GFP* en fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

5.5.3. Respuesta a citocininas con la línea *ARR7::GFP*

La línea *ARR7::GFP* con la que se trabajó no parece presentar una expresión importante en el desarrollo del gineceo. Sin embargo, su análisis fue requerido para identificar la sensibilidad ante la inducción de producción de citocininas por parte de *STM*. En el análisis longitudinal, el control presenta indetectable la GFP en estadios jóvenes e intermedios. En un estadio tardío, se puede observar una delgada franja de GFP que recorre longitudinalmente el réplum. Cuando se hace la inducción de ganancia o pérdida de función de *STM*, la expresión se mantiene nula o indetectable en estadios jóvenes e intermedios y se puede observar la misma línea de GFP recorriendo el réplum en los dos casos del gineceo tardío (Figura 19).

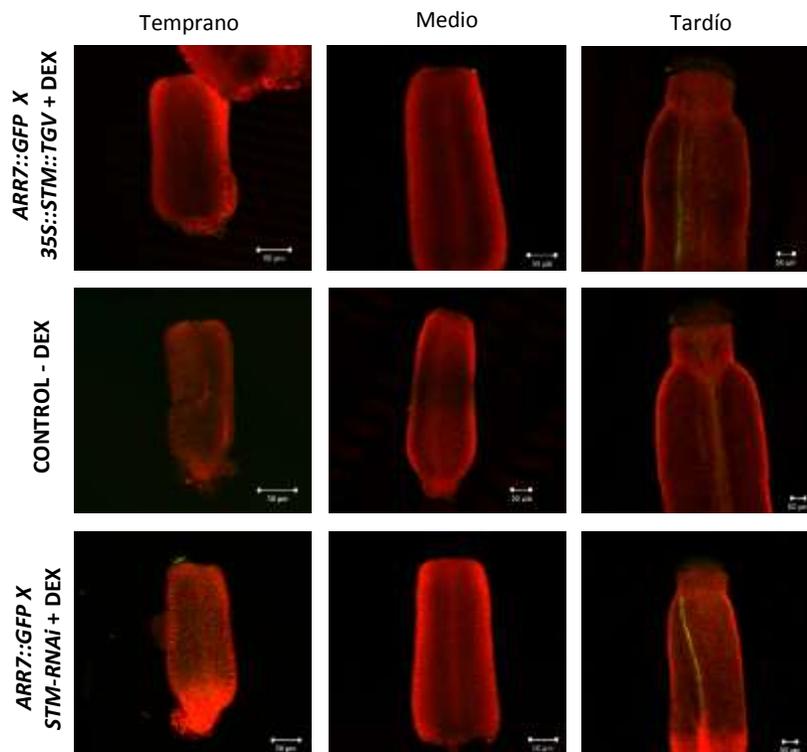


Figura 19. Imágenes en microscopía confocal de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *ARR7::GFP* en fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

De manera transversal, el control no presentó GFP detectable en ninguno de los tres estadios de desarrollo analizados. Y, cuando se hace la inducción de pérdida o ganancia de función esta ausencia se mantiene (Figura 20).

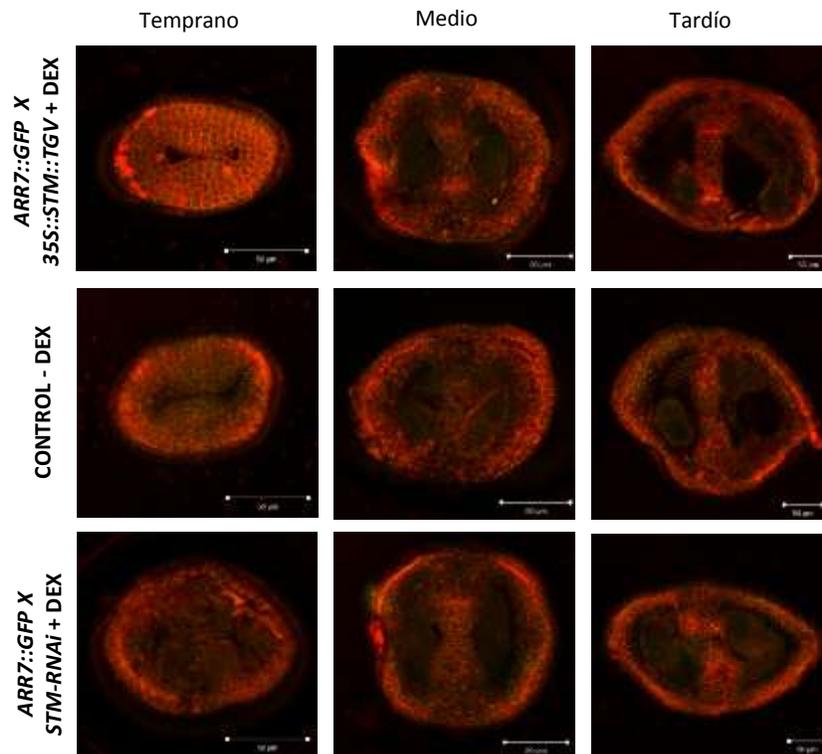


Figura 20. Imágenes en microscopía confocal de cortes de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *ARR7::GFP* en fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

5.6. *STM* y los receptores de citocininas

5.6.1. *AHK2*

El gen *AHK2* está presente desde estadios muy tempranos de desarrollo del gineceo, hasta estadios más avanzados en donde el gineceo está listo para ser polinizado. En la Figura 21 se puede observar que cuando se analiza la expresión del control, *AHK2* se hace presente de manera casi uniforme en el estadio joven y en el intermedio. Cuando se desarrolla a un gineceo tardío, la expresión se

localiza en el tejido medio, tracto de transmisión, funículos y óvulos de una manera importante. Cuando se induce la ganancia de función de *STM* parece mantenerse el patrón de expresión e intensidad de GUS en los tres estadios de desarrollo analizados. Sin embargo, cuando se hace la inducción de la pérdida de *STM*, se puede observar que en un estadio tardío del desarrollo del gineceo no se presenta GUS en la parte del tejido medio donde se localiza el septum y tracto de transmisión; y está casi ausente también en los funículos.

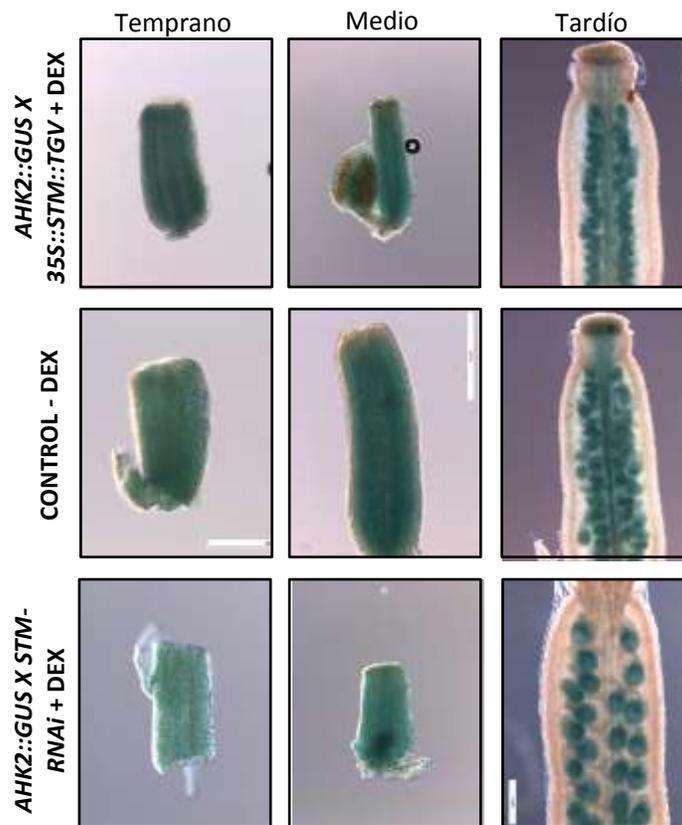


Figura 21. Imágenes al microscopio de gineceos de *Arabidopsis* de la línea marcadora *AHK2::GUS* en fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

5.6.2. *AHK3*

El gen *AHK3* al igual que el *AHK2* se expresa durante todo el desarrollo del gineceo y de manera casi idéntica al *AHK2*. El análisis de la línea control señala que *AHK3* se expresa en estadios jóvenes de manera casi uniforme al igual que

AHK2, con una única diferencia en mayor intensidad de GUS en la región del CMM. En un estadio intermedio, esta expresión uniforme parece mantenerse, aunque se puede apreciar un poco más de intensidad de GUS en algunas regiones del tejido medio. Cuando el gineceo está más desarrollado, *AHK3* se localiza en los óvulos, funículos, estigma y ligeramente en el tracto de transmisión. Cuando se induce la ganancia de función de *STM*, el patrón de expresión parece mantenerse en los tres estadios de desarrollo. Solo en el estadio tardío se puede observar una diferencia en intensidad de GUS localizado en los óvulos. En el mismo contexto, se puede observar que cuando se deleta la función de *STM* por RNAi, la expresión de *AHK3* parece ser similar a la expresión observada en el control (Figura 22).

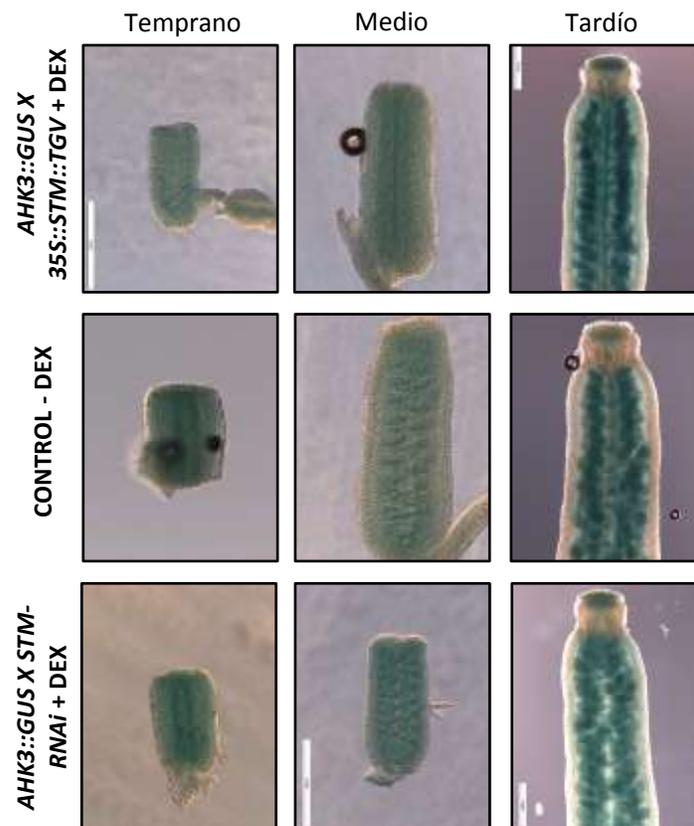


Figura 22. Imágenes al microscopio de gineceos de Arabidopsis de la línea marcadora *AHK3::GUS* en fondo de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

5.6.3. *AHK4*

El receptor *AHK4* parece tener una expresión menos importante o abundante en el desarrollo del gineceo como se puede observar en la Figura 23. Cuando se analiza la expresión en el control sin inducir con dexametasona, *AHK4* es indetectable en estadios jóvenes; mientras que en un estadio intermedio se comienza a localizar en la vasculatura que recorre el réplum y se mantiene así hasta un estadio tardío. En este estadio también se puede observar la presencia de GUS en los óvulos desarrollados, pero de manera tenue. Cuando se induce la ganancia de función de *STM*, la expresión parece mantenerse casi idéntica al control en los tres estadios de desarrollo. Sin embargo, cuando se hace la inducción de la pérdida de función se puede observar como la señal de GUS casi desaparece de los óvulos pero se mantiene en la vasculatura que recorre el réplum.

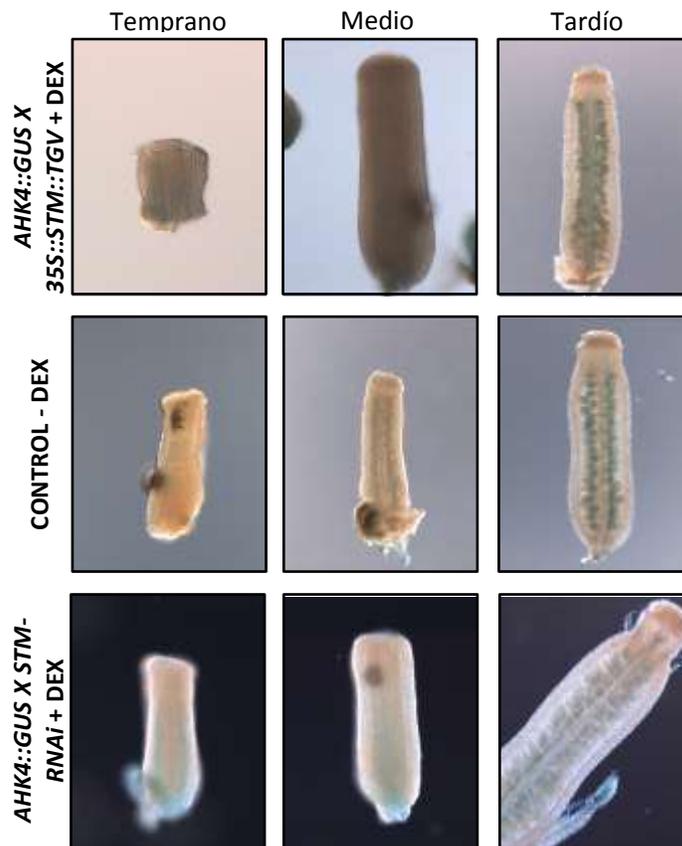


Figura 23. Imágenes al microscopio de gineceos de Arabidopsis de la línea marcadora *AHK4::GUS* en fonde de ganancia o pérdida de función de *STM*. Se presentan los gineceos en tres diferentes estadios de desarrollo. El control (testigo) es el producto de cruce sin inducir con dexametasona.

6. DISCUSIÓN

6.1. Relación *STM-IPT*

6.1.1. Y1H

El (FT) *STM* induce la producción de citocininas en el SAM mediante la activación transcripcional de los genes *IPT* (Yanai *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2005); sin embargo, a la fecha sigue siendo incierto si la inducción de *IPT* por parte de *STM* es directa o indirecta. En este estudio se pretendió elucidar si es que existe una relación directa entre *STM* y los *IPT*, es decir, si *STM* es un FT que activa directo a los genes *IPT*. El enfoque se hizo principalmente a los *IPT1*, 3, 5, 6, 7 y 8 por su importancia en la producción de citocininas (Takei *et al.*, 2001; Kakimoto, 2001) a pesar de que se señala que *STM* activa los nueve genes *IPT* (Yanai *et al.*, 2005). Adicionalmente, se analizó la capacidad de los FT *BP/KNAT1* y *KNAT2* a unirse a los promotores *IPT*, por su importancia también en la producción de citocininas (Yanai *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2005).

Los resultados del ensayo de Y1H indican que la proteína *STM* se puede unir a los promotores de los genes *IPT6* e *IPT8* y activar la resistencia al antibiótico AbA. El promotor *IPT6* presenta tres sitios de unión de *STM*, a -744, -413 y -80 pb río arriba del ATG. El promotor de *IPT8* contiene cuatro sitios de unión, a -1,161, -1,025, -237 y -139 pb río arriba del ATG. Como se observa en la Figura 4, estos sitios se encuentran casi uniformemente distribuidos por todo el promotor, por lo que *STM* se pudo haber unido a cualquiera de ellos o a todos. Existen estudios en otros genes como *CUC1*, en donde *STM* se pega a su promotor en un sitio muy cercano al ATG (-124 pb) (Spinelli *et al.*, 2011). Esto podría sugerir que *STM* se pega en el promotor al sitio más cercano al ATG de los genes *IPT6* e *IPT8*; sin embargo, cada promotor funciona de manera diferente y son necesarios más estudios para definir el sitio exacto de unión de *STM*. En el mismo contexto de la activación de *IPT6* e *IPT8*, es bien sabido que *STM* los puede inducir transcripcionalmente en base de experimentos qRT-PCR en plántula, pero no de

manera tan importante como a otros genes *IPT* (*IPT1*, 3, 5 y 7) (Yanai *et al.*, 2005). Entonces, es importante analizar más las situaciones del resto de los promotores de los genes *IPT* y estudiar la relevancia biológica de la interacción STM con los promotores *IPT6* e *IPT8*.

Los promotores de *IPT1* y 5 presentan solo un sitio de unión de STM y este se encuentra a una distancia considerable en posición río arriba, -1450 y -789 pb, respectivamente. Los *IPT1* y 5 son inducidos por STM (Yanai *et al.*, 2005) pero en este estudio STM no parece unirse a sus promotores. Como ya se observó, existen promotores que tienen sitios de unión muy cercanos al ATG y en estudios como estos han resultado positivos. Quizás STM sí se une al sitio de unión de estos *IPT* pero por su lejanía al ATG, en este sistema de levadura no alcanza a transcribir el gen de resistencia a AbA, lo que nos arroja un falso negativo. Por lo anterior, es necesario un estudio más a fondo de estos promotores para poder descartar que STM se una directamente a estos promotores.

Por otro lado, los *IPT3* y 7 presentan abundantes sitios de unión de STM (11 y 10, respectivamente). Estos sitios están distribuidos casi de manera uniforme en todo el promotor, incluyendo regiones cercanas al ATG. Además, entre los *IPT*, el *IPT7* es el mayormente inducido transcripcionalmente cuando se sobre-expresa STM (Yanai *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2005). Lo anterior resulta en que a pesar de que *IPT3* e *IPT7* son fuertes candidatos para que STM los induzca de manera directa, en este estudio no lo fueron. Un estudio hecho por Danisman *et al.* en 2012 demostró que en algunas ocasiones es necesaria la interacción de dos proteínas o factores de transcripción para que la misma se lleve a cabo en este tipo de experimentos. Además, las proteínas KNOX poseen un dominio que las hace interactuar con otras proteínas y formar heterodímeros (Arnaud y Pautot, 2014). Esto podría sugerir que STM podría requerir la interacción de otra proteína para poder unirse y activar los promotores de estos genes *IPT*. Sin embargo, es necesario realizar este estudio para determinar dicha capacidad.

Por otro lado, es bien sabido que existen genes en esta ruta (*AHK*) que se inducen de manera indirecta por otros genes, sugiriendo que hay factores intermedios

(Yanai et al., 2005; Jasinski et al., 2005; Scofield et al., 2013). Lo que podría ser posible en el caso de la relación de STM con algunos de los genes *IPT*. Sin embargo, aún es necesaria la inversión de tiempo y esfuerzo para elucidar el tipo de relación que llevan estos dos elementos. Además, las predicciones de expresión de los genes *IPT* (Miyawaki et al., 2004; Anexo 2) señalan diferencias importantes en los patrones de expresión de todos ellos, lo que podría sugerir que su forma de ser regulados por los FT podría ser independiente para cada uno de ellos.

En el estudio adicional de los FT BP/KNAT1 y KNAT2, se encontró que tienen capacidades similares de unión a los mismos promotores que STM. BP/KNAT1 se une a *IPT6* y *8*; mientras que KNAT2 se une a *IPT6*. Los sitios de unión en los diferentes promotores de *IPT* para BP/KNAT1 y KNAT2 resultan ser los mismos sitios que para STM (PlantPan 2.0). Lo anterior podría sugerir que las razones por las cuales BP/KNAT1 activa *IPT6* e *IPT8* y no a los demás *IPT* tienen relación con las mismas de STM. En experimentos realizados se ha encontrado mucha similitud en las funciones de STM y BP/KNAT1 (Yanai et al., 2005; Jasinski et al., 2005, Scofield et al., 2007), lo que podría sugerir una función más cercana y redundante de STM y BP/KNAT1 en la activación de genes *IPT*. Con respecto a KNAT2, aunque está reportado que activa transcripcionalmente a *IPT7* (Yanai et al., 2005), en este estudio no parece tener una relación directa con ese gen pero sí con el *IPT6*. Lo que podría sugerir un rol menos importante para KNAT2 en la producción de citocininas.

6.1.2. Análisis de *IPT* bajo pérdida y ganancia de función de STM

Las imágenes obtenidas al inducir la ganancia o pérdida de función de STM, sugieren un ligero cambio en intensidad de expresión de *IPT1* en un estadio tardío del desarrollo del gineceo, comparado con el control sin inducir. Este resultado podría coincidir de alguna manera con el estudio hecho por Yanai et al. en el 2005 en donde se observó que *IPT1* se induce transcripcionalmente de manera muy leve al sobre expresar STM en plántula. Por lo que *IPT1* no parece ser el blanco

principal de STM en plántula. Este estudio sugiere que en el desarrollo del gineceo podría estar ocurriendo lo mismo y el pequeño cambio que pudiera estar provocando es poco detectable en este tipo de experimentos. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para llegar a una conclusión.

6.2. STM como inductor de la producción de citocininas

Muchos autores le han atribuido a *STM* la función del principal inductor de la biosíntesis de citocininas. Se ha observado que al sobre-expresarlo hay genes de respuesta que se inducen en tejidos vegetativos (Yanai *et al.*, 2005; Jasinski *et al.*, 2005; Scofield *et al.*, 2013). Se ha observado que *STM* se expresa en el gineceo durante algunas de sus etapas de desarrollo (datos no mostrados). En este estudio se analizó si el *STM* expresado en el gineceo tiene como función principal la inducción de la síntesis de citocininas. Esto mediante el análisis de líneas marcadoras de respuesta a citocininas en fondos de ganancia o pérdida de función inducible de *STM*.

Los resultados de la inducción de la pérdida o ganancia de función de *STM* en líneas marcadoras de respuesta a citocininas (*ARR5::GFP*, *ARR7::GFP* y *TCS::GFP*) arrojaron algunas sugerencias en cuanto a la relación de *STM* con la producción de citocininas.

En este estudio, el resultado general de la inducción de pérdida o ganancia de función de *STM* no parece modificar de manera tan drástica la respuesta a citocininas como lo haría en el SAM de plántula con el *ARR5* (Yanai *et al.*, 2005). Sin embargo, al observar las imágenes de las líneas por separado se pueden observar en algunas de ellas pequeñas variaciones en la intensidad de expresión y esto podría sugerir algunos cambios.

Las líneas marcadoras *TCS::GFP* y *ARR5::GFP* son usadas comúnmente para saber en dónde existe la respuesta a citocininas en algún tejido por la rápida respuesta a citocininas de los genes que las conforman (D'Agostino *et al.*, 2000). En el caso del gineceo tienen un patrón muy característico durante su desarrollo

(Marsch-Martínez *et al.*, 2012; González Jacob, 2015). En este estudio, al inducir la pérdida o ganancia de función, no parecen presentar cambios en estadios tempranos ni medios. Pero cuando se observan los estadios tardíos de gineceo en cortes transversales, es posible detectar ligeros cambios en cuanto a la intensidad de GFP, apoyando que STM regula biosíntesis de citocininas. Este cambio en intensidad podría significar algo. Sin embargo, Yanai *et al.*, 2005 encontró que al sobre-expresar *STM* en plántula ocurre un cambio muy drástico tanto en la intensidad como en el patrón de expresión de *ARR5::GFP*. Además, está reportado que *ARR5* es un gen de respuesta primaria a citocininas; el nivel de transcritos de *ARR5* aumenta en los primeros 10 minutos de aplicación exógena de citocininas (Brandstatter y Kieber, 1998). Lo anterior sugiere que a pesar de que en este estudio se observa un cambio en intensidad de GFP, este cambio no es como el que ocurre en otros experimentos, pero se necesita tomar en cuenta que la manera de observar cambios (microscopía, tipo de cortes del tejido, tiempo del desarrollo del gineceo y el tiempo después la inducción de STM) se puede mejorar.

Por otro lado, en este estudio la línea *ARR7::GFP* mantiene su expresión casi nula durante todo el desarrollo del gineceo aún en ganancia o pérdida de función de STM. Se ha observado que cuando a la línea *ARR7::GFP* se le adicionan citocininas exógenas, ocurre un cambio drástico en cuanto al patrón de expresión; siendo observable en todos los tejidos del gineceo, incluyendo valvas (González Jacob, 2015). Esto sugiere que la ganancia o pérdida de función de *STM* en este estudio no es suficiente para producir citocininas en dicha magnitud.

Con los datos obtenidos es difícil concluir si *STM* está induciendo la producción de citocininas durante el desarrollo del gineceo, debido a que en algunas líneas se observan pequeños cambios y en otras no. La bibliografía existente dice que durante la biosíntesis de citocininas, *STM* induce a los genes *IPT* en plántula (Yanai *et al.*, 2005). Se sabe que *STM* se expresa durante el desarrollo del gineceo (Long *et al.*, 1996) y que los genes *IPT* se expresan en algún momento del desarrollo de la flor (Miyawaki *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2015); lo que podría

indicar que los genes *IPT* también se expresan en el desarrollo del gineceo; que vamos a saber seguro cuándo se tiene los resultados de los análisis de las líneas reporteras de los genes *IPT*. Además, las predicciones en eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi) permiten saber que algunos *IPT* y *LOG* se expresan en el gineceo; sin embargo, estas mismas predicciones señalan que los *CYP435* no están expresados en el gineceo. Todo lo anterior, sugiere que *STM* podría estar jugando un rol importante en el desarrollo del gineceo. Sin embargo, esta importancia se podría deber a otros roles que desempeña este gen en este tejido y no necesariamente a la inducción de síntesis de citocininas. Ya que, por más que tenga la capacidad de inducir los *IPT* presentes, las predicciones indican que no hay ningún *CYP435* que continúe con la ruta. Aunque, podría ocurrir un transporte de la proteína *STM* a otros tejidos (Balkunde *et al.*, 2017) e inducir la síntesis en otro sitio. Es importante indagar en esta área con estudios más profundos para poder hacer una conclusión de este tipo.

6.3. *STM* como regulador de los genes *AHK*

Como ya se ha mencionado anteriormente, los estudios sugieren que *STM* es el principal encargado de inducir la producción de citocininas; y que, mediante estas citocininas se induce la expresión de genes relacionados con el proceso de señalización, tales como los receptores de citocininas (*AHK4*) (Scofield *et al.*, 2015). En el presente estudio se quiso investigar si otros receptores de citocininas (*AHK2* y *AHK3*) también responden al cambio de la producción de citocininas vía *STM*. Así como también, se pretendió saber si estos dos receptores y el *AHK4* responden a esta inducción por este gen durante el proceso del desarrollo del gineceo.

De manera general, los resultados de inducción de pérdida o ganancia de función de *STM* en las tres líneas de los receptores podrían sugerir algunos cambios. Los tres receptores no parecen cambiar su patrón de expresión en estadios jóvenes y

medianos ante la pérdida o ganancia de función de *STM*; pero sí en estadios tardíos.

Ante la pérdida de función, parece haber un ligero cambio en el patrón de *AHK2*, ya que deja de emitir señal de GUS en una región del tejido medio, en el septum y el tracto de transmisión. En *AHK3*, la intensidad del GUS aumenta ligeramente ante la ganancia de función de *STM* y viceversa. Además, la señal de GUS en *AHK3* en fondo de pérdida de función parece cambiar en el tejido medio al igual que en *AHK2*. Por otro lado, en la línea *AHK4*, el cambio más notable es la ligera disminución en intensidad de GUS en los óvulos.

El resultado de la pérdida de señal de GUS en tejido medio para *AHK2* y *AHK3* podría tener mucho sentido, ya que al parecer en esta región se concentra la respuesta a citocininas en otras líneas de respuesta a citocininas como *TCS::GFP* (Marsch-Martínez *et al.*, 2012); lo que nos podría sugerir que ante la pérdida de función de *STM*, las citocininas no se producen de manera normal y no alcanzan a llegar al tejido medio y regular la señalización y respuesta. Además, los patrones de expresión y su respuesta ante la pérdida de función de *STM* son muy similares para estas dos líneas. Estudios en otros tejidos han demostrado su expresión sobrelapada y redundante (Stolz *et al.*, 2001). Por lo que este resultado podría sugerir que su función podría ser muy parecida.

Por otro lado, para *AHK4*, la pérdida de señal de GUS en óvulos podría estar indicando que en este tejido también es regulado por las citocininas producidas por *STM* al sobre-expresarse, tal como lo hace en el estudio de (Scofield *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en este experimento podrían estar sugiriendo el control de la biosíntesis de citocininas, y por lo tanto la regulación de genes *AHK* por parte de *STM*, pero solo en estadios tardíos. Sin embargo, los promotores de los genes *AHK* contienen sitios de unión de *STM* (PlantPan 2.0), por lo que esta regulación podría ser también de manera directa. Esto contrasta un tanto con los resultados

obtenidos en otras líneas en este mismo estudio, por lo que es necesario continuar estudiando más a fondo para poder llegar a una conclusión más sustentada.

7. CONCLUSIONES

-*STM* tiene la capacidad de unirse a los promotores de los genes de biosíntesis de citocininas *IPT6* y *8*.

- *BP* y *KNAT2* tienen la capacidad de unirse a los promotores de los genes *IPT6* y *8* e *IPT6*, respectivamente.

-De acuerdo a los resultados de las líneas marcadoras *TCS::GFP*, *ARR5::GFP* y *ARR7::GFP*, *STM* podría estar induciendo la síntesis de citocininas en el gineceo.

-De acuerdo a los resultados de las líneas de los receptores de citocininas, *STM* podría estar regulando la expresión de estos genes mediante la inducción de producción de citocininas en el gineceo.

-La función de *STM* como productor de citocininas en el desarrollo del gineceo podría ser muy leve.

8. PERSPECTIVAS

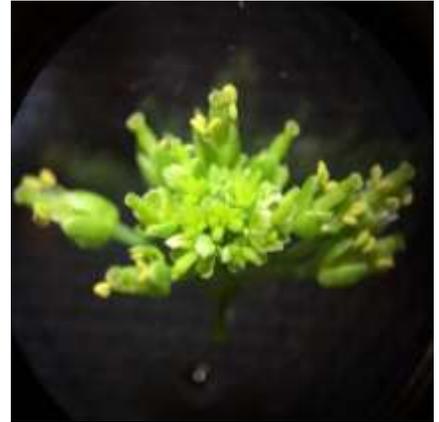
- Utilizar otras metodologías para el análisis de interacción STM-promotores, como ChIP.
- Afinar la metodología del Y1H de este estudio para analizar mejor la interacción de STM-promotorIPT, de tal manera que se acorten los promotores o flanqueen sitios de unión de STM.
- Analizar las líneas transgénicas generadas con tdTomato.
- Analizar las cruzas en estado homocigoto.
- Analizar tiempos más cortos y etapas más tempranas del desarrollo del gineceo ante la inducción de STM por Dexametasona.
- Utilizar otras líneas inducibles de STM.

9. ANEXOS

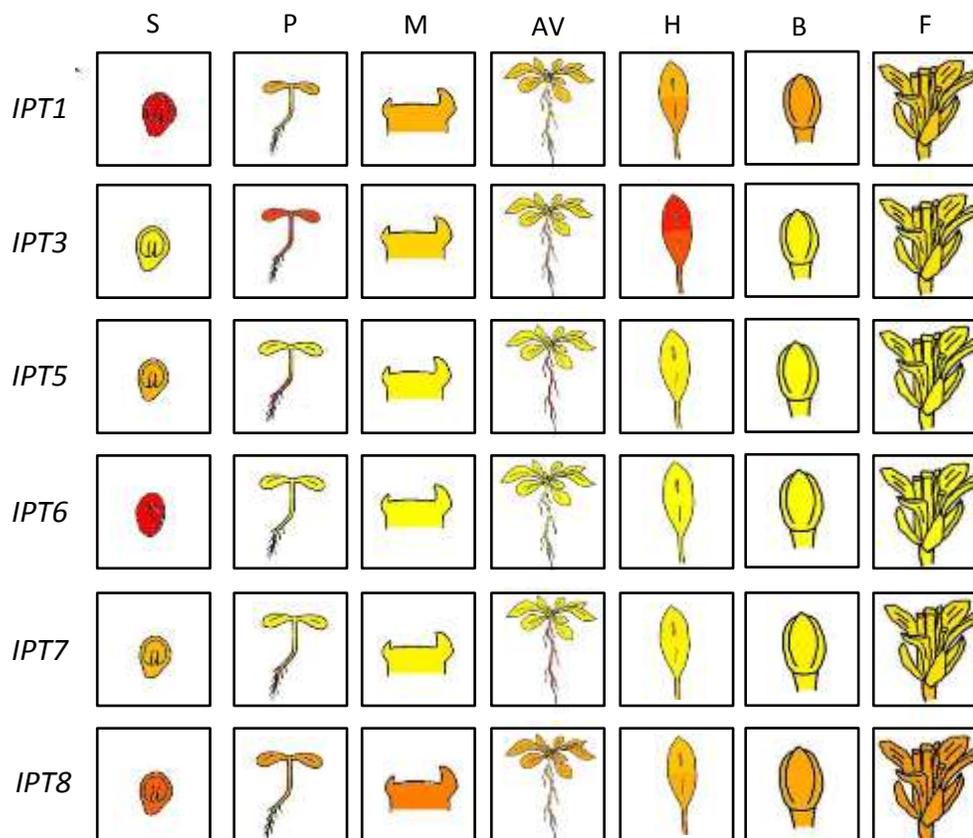
WT

30 uM

60 uM



Anexo 1. Inflorescencias de la línea 35S::STM::TGV de Arabidopsis (Ler) 10 días después de la aplicación de diferentes tratamientos con dexametasona. Se puede apreciar claramente cómo la aplicación de una concentración de 60 uM dexametasona asevera el fenotipo de sobre expresión de STM en la flor de Arabidopsis, similar a como lo reporta Scofield *et al.*, 2007 en esta misma línea.



Anexo 2. Predicción de patrón de expresión de los diferentes IPT en diferentes tejidos y estadios de desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. El color rojo indica una expresión fuerte, mientras que el amarillo una expresión baja o nula; colores intermedios indican expresión media. S= Semilla; P= Plántula; M= Meristemo; AV= Adulto Vegetativo; H= Hoja; B=Botón floral y F=Flor. Imágenes obtenidas de eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-Buylla E. R., M. Benitez, A. Corvera-Poirao, A. Chaos Cador, S. de Folter, A. de Gamboa de Buen, A. Garay-Arroyo, B. García-Ponce, F. Jaimes-Miranda, R. V. Perez-Ruiz, A. Pineyro-Nelson y V. E. Sanchez-Corrales. 2010. Flower development. Arabidopsis Book.
2. Alvarez J. y D. R. Smyth. 1999. CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development*, 126: 2377-2386.
3. Argueso C. T., F. J. Ferreira y J. J. Kieber. 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environ*, 32: 1147-1160.
4. Arnaud N. y V. Pautot. 2014. Ring the BELL and tie the KNOX: roles for TALEs in gynoecium development. *Front Plant Sci*, 5: 93.
5. Balkunde R., M. Kitagawa, X. M. Xu, J. Wang y D. Jackson. 2017. SHOOT MERISTEMLESS trafficking controls axillary meristem formation, meristem size and organ boundaries in Arabidopsis. *Plant J*, 90: 435-446.
6. Bartrina I., E. Otto, M. Strnad, T. Werner y T. Schumling. 2011. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 23: 69-80.
7. Blazquez M. A., C. Ferrandiz, F. Madueno y F. Parcy. 2006. How floral meristems are built. *Plant Mol Biol*, 60: 855-870.
8. Boer B. G. y J. A. Murray. 2000. Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol*, 10: 245-50
9. Bohner S., I.I. Lenk, M. Rieping, M. Herold y C. Gatz. 1999. Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J*, 19: 87-95.

10. Brandstatter I. y J. J. Kieber. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in Arabidopsis. *Plant J*, 35: 1345-1355.
11. Busch M. A., K. Bomblies y D. Weigel. 1999. Activation of a floral homeotic gene in Arabidopsis. *Science*, 285: 585-587.
12. Byrne M. E., J. Simorowski y R. A. Martienssen. 2002. ASYMETRIC LEAVES1 reveals Knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development*, 129: 1957-1965.
13. Chuck G., C. Lincoln y S. Hake. 1996. KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell*, 8: 1277-1289.
14. D'Agostino I., J. Deruere y J. J. Kieber. 2000. Characterization of the response of the Arabidopsis ARR gene family to cytokinin. *Plant Physiol*, 124: 1706-1717.
15. de Folter S. y R. G. H. Immink. 2011. Yeast protein-protein interaction assays and screens. En: *Plant Transcription Factors*. Humana Press Inc. NY, USA. 754: 145-165.
16. Dean G., S. Casson y K. Lindsey. 2004. KNAT6 gene of Arabidopsis is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. *Plant Mol Biol*, 54: 71-84.
17. Dettmer J., A. Elo y Y. Helariutta. 2009. Hormone interactions during vascular development. *Plant Mol Biol*, 69: 347-360.
18. Dortay H., N. Mehnert, L. Burkle, T. Schmulling y A. Heyl. 2006. Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of Arabidopsis thaliana. *FEBS J*, 273: 4631-4644.
19. Eklund D. M., V. Staldal, I. Valsecchi, I. Cierlik, C. Eriksson, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi, J. F. Sundstorm, M. Thelander e I. Ezcurra. 2010. The Arabidopsis thaliana STYLISH1 protein acts as a transcriptional activator regulatin auxin biosynthesis. *Plant Cell*, 22: 349-363.

20. Endrizzi K., B. Moussian, A. Haecker, J. Z. Levin y T. Laux. 1996. Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell*, 65: 991-1002.
21. Ferrandiz C., S. Pelaz y M. F. Yanofsky. 1999. Control of carpel and fruit development in Arabidopsis. *Annu Rev Biochem*, 68: 321-54
22. Ferrandiz C., S. J. Liljergren y M. F. Yanofsky. 2000. Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development.
23. Ferrandiz C., K. Jean-Claude y D. Michel. 2010. Carpel development. *Advances in Botanical Research*, 55: 1-73.
24. Furumizu C., J. P. Alvarez, K. Sakakibara y J. L. Bowman. 2015. Antagonistic roles for KNOX1 and KNOX2 genes in a patterning the land plant body plan following an ancient gene duplication. *PLoS Genet*. 11:31004980.
25. Galbiati F., D. Sinha Roy, S. Simonini, M. Cucinotta, L. Ceccato, C. Cuesta, M. Simaskova, E. Benkova, Y. Kamiuchi, M Aida. 2013. An integrative model of the control of ovule primordia formation. *Plant J*, 76: 446-455.
26. Gan S. y R. Amasino. 1996. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bioessays*, 18: 557-565.
27. Gao R. y A. M. Stock. 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*, 63: 133-154.
28. Gepstein S. y Horwitz B. A. 1995. The impact of Arabidopsis research on plant biotechnology. *Biotechnol Adv*, 13(3): 403-14.
29. Hare P. D., W. A. Cress y J. van Staden. 1997. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regul*, 23: 79-103.
30. Hay A., H. Kaur, A. Phillips, P. Hedden, S. Hake y M. Tsiantis. 2002. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol*, 12: 1557-1565.

31. Heyl A., K. Wulfetange, B. Pils, N. Nielsen, G. A. Romanov y T. Schimulling. 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol*, 7: 62.
32. Higuchi M., M. S. Pischke, A. P. Mahonen, K. Miyawaki, Y. Hashimoto, M. Seki, M. Kobayashi, K. Shinozaki, T. Kato, S. Tabata, Y. Helariutta, M. R. Sussman y T. Kakimoto. 2004. In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 8821-8826.
33. Hosoda K., A. Imamura, E. Katoh, T. Hatta, M. Tachiki, H. Yamada, T. Mizuno y T. Yamazaki. 2002. Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the Arabidopsis response regulators. *Plant Cell*, 14: 2015-2029.
34. Hutchinson C. E., J. Li, C. Argueso, M. Gonzalez, E. Lee, M. W. Lewis, B. B. Maxwell, T. D. Perdue, G. E. Schaller, J. M. Alonso, J. R. Ecker y J. J. Kieber. 2006. The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, 18: 3073-3087.
35. Hwang I., J. Sheen y B. Muller. 2012. Cytokinin signaling networks. *Annu Rev Plant Biol*, 63:353-380
36. Ishida K., T. Yamashino, A. Yokohyama y T. Mizuno. 2008. Three type-B response regulators ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, 49: 47-57.
37. Jasinski S., P. Piazza, J. Craft, A. Hay, L. Woolley, I. Rieu, A. Phillips, P. Hedden y M. Tsiantis. 2005. KNOX1 action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin. *Curr Biol*, 15: 1560-1565.
38. Jenal U. y M. Y. Galperin. 2009. Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamic. *Curr Opin Microbiol*, 12: 152-160.

39. Kakimoto T. 1996. CK1, a histidin kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274: 982-985.
40. Kasahara H., K. Takei, N. Ueda, S. Hishiyama, T. Yamaya, Y. Kamiya, S. Yamaguchi y H. Sakakibara. 2004. Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 279: 14049-14054.
41. Kerstetter R., E. Vollbrecht, B. Lowe, B. Veit, J. Yamaguchi y S. Hake. 1994. Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. *Plant Cell*, 6: 1877-1887.
42. Kieber J. J. y G. E. Schaller. 2014. Cytokinins. *The Arabidopsis book*.
43. Kinoshita-Tsujimura K. y T. Kakimoto. 2011. Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signa Behav*, 6: 66-71.
44. Kudo T., T. Kiba y H. Sakakibara. 2010. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J Integr Plant Biol*, 52: 53-60.
45. Kuroha T., H. Tokunaga, M. Kojima, N. Ueda, T. Ishida, S. Nagawa, H. Fukuda, K. Sugimoto y H. Sakakibara. 2009. Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3152-3169.
46. Kusaba S., Y. Kano-Murakami, M. Matsuoka, M. Tamaoki, T. Sakamoto, I. Yamaguchi y M. Fukumoto. 1998. Alteration of hormone levels in transgenic tobacco plants overexpressing the rice homeobox gene OSH1. *Plant Physiol.*, 116: 471-476.
47. Larsson E., C. J. Roberts, A. R. Claes, R. G. Franks y E. Sundberg. 2014. Polar auxin transport is essential for medial versus lateral tissue specification and vascular-mediated valve outgrowth in *Arabidopsis gynoecia*. *Plant Physiol*, 166: 1998-1012.

48. Lenhard M., G. Jurgens y T. Laux. 2002. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfill complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development*, 129: 3195-3206.
49. Letham D. S. 1973. Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*, 12: 2445-2455.
50. Li X., X. Mo, H. Shou y P. Wu. 2006. Cytokinin mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 47: 1112-1123.
51. Liljergren S. J., G. S. Ditta, Y. Eshed, B. Savidge, J. L. Bowman y M. F. Yanofsky. 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature*, 404: 766-70.
52. Lochmanova G., Z. Zdrahal, H. Konecna, S. Koukalova, J. Malbeck, P. Soucek, M. Valkova, N. S. Kiran y B. Brzobohaty. 2008. Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown Arabidopsis: a proteomic analysis. *J Exp Bot*, 59: 3705- 3719.
53. Long J. A., E. I. Moan, J. L. Medford y M. K. Barton. 1996. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by STM gene of Arabidopsis. *Nature*, 379: 66-69.
54. Marsch-Martínez N., D. Ramos-Cruz, J. I. Reyes-Olalde, P. Lozano-Sotomayor, V. M. Zuñiga-Mayo and S. de Folter. 2012. The role of cytokinin during Arabidopsis gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant J*, 72: 222-234.
55. Marsch-Martínez N., V. M. Zuñiga-Mayo, H. Herrera-Ubaldo, P. B. Ouwkerk, J. Pablo-Villa, P. Lozano-Sotomayor, R. Greco, P. Ballester, V. Balanzá, S. J. Kuijt, A. H. Meijer, A. Pereira, C. Ferrandiz y S. de Folter. 2014. The NTT transcription factor promotes replum development in Arabidopsis fruits. *Plant J*, 80: 69-81
56. Marsch-Martínez N. y S. de Folter. 2016. Hormonal control of the development of the gynoecium. *Curr Opin Plant Biol*, 29: 104-114.

57. Meinke D. W., J. M. Cherry, C. Dean, S. D. Rounsley y M. Koornneef. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282: 679-82.
58. Miller C. O., F. Skoog, M. H. von Saltza y F. Strong. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc*, 77: 1392.
59. Miller C. O., F. Skoog, F. S. Okomura, M. H. von Saltza y F. M. Strong. 1956. Isolation structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J Am Chem Soc*, 78: 1345-1350.
60. Miyawaki K., M. Matsumoto-Kitano y T. Kakimoto. 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J*, 37: 128-138.
61. Miyawaki K., P. Tarkowski, M. Matsumoto-Kitano, T. Kato, S. Sato, D. Tarkowska, S. Tabata, G. Sandberg y T. Kakimoto. 2006. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Curr Iss*, 103: 16598-16603.
62. Mukherjee K., L. Brocchieri y T. R. Burglin. 2009. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Mol. Biol. Evol.*, 26: 2775-2794.
63. Naseem M. y T. Dandekar. 2012. The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathog* 8: 31003026.
64. Nemhauser J. L., L. J. Feldman y P. C. Zambryski. 2000. Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Development*, 127: 3877-3888.
65. Nishimura C., Y. Ohashi, S. Sato, T. Kato, S. Tabata y C. Ueguchi. 2004. Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 1365-1377.
66. Ori N., M. Juarez, D. Jackson, J. Yamaguchi, G. Banowetz y S. Hake. 1999. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox

gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell*, 11: 1073-1080.

67. Parkinson J. 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, 73: 857-871.

68. Pautot V., J. Dockx, O. Hamant, J. Kronenberger, O. Grandjean, D. Jublot y J. Traas. 2001. *KNAT2*: evidence for a link between knotted-like genes and carpel development. *Plant Cell*, 13: 1719-1734.

69. Ramireddy E., W. G. Brenner, A. Pfeifer, A. Heyl y T. Schmulling. 2013. In planta analysis of a cis-regulatory cytokinin response motif in *Arabidopsis* and identification of a novel enhancer sequence. *Plant Cell Physiol*, 54: 1079-1092.

70. Reyes-Olalde J. I., V. M. Zuñiga-Mayo, R. A. Chavez Montes, N. Marsch-Martínez y S. de Folter. 2013. Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends in Plant Science*, 18: 644-655.

71. Reyes-Olalde J. I., N. Marsch-Martínez y S. de Folter. 2015. Imaging early stages of the female reproductive structure of *Arabidopsis* by confocal laser scanning microscopy. *Developmental dynamics*, 244: 1286-1290.

72. Reyes-Olalde J. I., V. M. Zuñiga-Mayo, J. Serwatowska, R. A. Chavez Montes, P. Lozano-Sotomayor, H. Herrera-Ubaldo, K. L. Gonzalez-Aguilera, J. J. Ripoll, I. Ezquer, D. Paolo, A. Heyl, L. Colombo, M. F. Yanofsky, C. Ferrandiz, N. Marsch-Martínez y S. de Folter. 2017. The bHLH transcription factor *SPATULA* enables cytokinin signaling, and both activate auxin biosynthesis and transport genes at the medial domain of the gynoecium. *PLoS Genetics* 13: e1006726.

73. Riefler M., O. Novak, M. Strnad y T. Schmulling. 2006. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, 18: 40-54.

74. Roeder A. H. y M. F. Yanofsky. 2006. Fruit development in *Arabidopsis*. *Arabidopsis book*.

75. Salomé P. A., J. P. C. To, J. J. Kieber y C. R. McClung. 2005. Arabidopsis Response Regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell*, 18: 55-69.
76. Sakakibara H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 431-449.
77. Schaller G. E., J. J. Kieber y S. H. Shiu. 2008. Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *The Arabidopsis Book*.
78. Schaller G. E., A. Bishopp y J. J. Kieber. 2015. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, 27: 44-63.
79. Scofield S., W. Dewitte y J. A. H. Murray. 2007. The KNOX gene SHOOT MERISTEMLESS is required for the development of reproductive meristematic tissues in Arabidopsis. *Plant J*. doi: 10.1111
80. Scofield S., W. Dewitte, J. Nieuwland y J. A. H. Murray. 2013. The Arabidopsis homeobox gene SHOOT MERISTEMLESS has a cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. *Plant J*, 75: 53-66.
81. Spinelli S., A. P. Martin, I. Viola y J. F. Palatnik. 2011. A mechanistic link between STM and CUC1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol*, 156: 1894-1904.
82. Steeves T. A. y I. M. Sussex. 1989. *Patterns in Plant Development*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
83. Stolz A., M. Riefler, S. N. Lomin, K. Achazi, G. A. Romanov y T. Schmulling. 2011. The specificity of cytokinin signaling in Arabidopsis thaliana is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J*, 67: 157-168.

84. Taniguchi M., N. Sasaki, T. Tsuge, T. Aoyama y A. Oka. 2007. ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant Cell Physiol*, 48: 263-277.
85. Takei K., H. Sakakibara y T. Sugiyama. 2001. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 276: 26405-26410.
86. Tokunaga H., M. Kojima, T. Kuroha, T. Ishida, K. Sugimoto, T. Kiba y H. Sakakibara. 2012. *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J*, 69:355-365.
87. Ueguchi C., S. Sato, T. Kato y S. Tabata. 2001. The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 42: 751-755.
88. Venglat S. P., T. Dumonceaux, K. Rozwadowski, L. Parnell, V. Babic y W. Keller. 2002. The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 99: 4730-4735.
89. Vollbrecht E., B. Veit, N. Sinha y S. Hake. 1991. The developmental gene Knotted-1 is a member of maize homeobox gene family. *Nature*, 350: 241-243.
90. Xu T., M. Wen, S. Nagawa, Y. Fu, J. G. Chen, M. J. Wu, C. Perrot-Rechenman, J. Friml, A. M. Jones y Z. Yang. 2010. Cell surface and rho GTPase-based auxin signaling control cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell*, 143: 99-110.
91. Yamada H., N. Koizumi, N. Nakamichi, T. Kiba, T. Yamashino y T. Mizuno. 2004. Rapid response of *Arabidopsis* T87 cultured cells to cytokinin through His-to-Asp phosphorelay signal transduction. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 1996-1976.
92. Yanai O., E. Shani, K. Dolezal, P. Tarkowski, R. Sablowski, G. Sandberg, A. Samach y N. Ori. 2005. *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol*, 15: 1566-1571.