



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

UNIDAD IRAPUATO

LA UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA (LANGEBIO)

**“Factores que regulan al gen *SPATULA (SPT)* en *Arabidopsis
thaliana*”**

Tesis que presenta

IAG. Angela Guadalupe Juárez Corona

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biotecnología de Plantas

Director de Tesis

Dr. Stefan de Folter

Irapuato, Guanajuato.

Julio del 2018

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas, perteneciente a LA UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA, LABORATORIO NACIONAL DE GENÓMICA PARA LA BIODIVERSIDAD VEGETAL Y MICROBIANA (LANGEBIO) del CINVESTAV-IPN, 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 que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

A la UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA (LANGEBIO) y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato por proporcionar las instalaciones, recursos humanos y materiales que me permitieron realizar mi proyecto de maestría.

Al Dr. Stefan de Folter darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por toda su disposición para resolver mis dudas y complicaciones experimentales y por la confianza de permitirme contribuir a un objetivo mayor.

A la Dra. Nayelli Marsch y Dr. Alfredo Cruz por sus sugerencias y observaciones que contribuyeron a mejorar mi trabajo de investigación y mi formación como estudiante de posgrado.

A Víctor Zúñiga, por guiar mi trabajo experimental, por tener tanta paciencia para responder mis mil dudas y por mantenerme siempre atenta a mi meta.

A Andrea Gómez, por ser tan buena compañera de laboratorio, siempre dispuesta a ayudar y sobre todo por ser tan linda persona.

A Vincent Cerbantez, por compartir sus experiencias y valiosos consejos que me ayudaron a no cometer los mismos errores.

A los miembros del Laboratorio de genómica funcional del desarrollo de plantas, Karlita por siempre estar pendiente de que nada falte para nuestros experimentos, Humberto por su valiosa ayuda para culminar la parte final de mi trabajo y a todos los compañeros que siempre mantienen un agradable ambiente: Joanna, Valentín, Roger, Judith y Eduardo.

A Betty y Eve, por toda esa diversión que te mantiene con cordura en momentos de desesperación (bioquímica) y por toda su ayuda en lo personal y lo profesional...

DEDICATORIAS

A Dios, por la vida y la salud que me permiten seguir con todas mis metas.

A Jordan... Por encontrarme... Por ser mi amigo y sobre todo mi amor, gracias por estar a mi lado, por formar parte de mi mundo y por compartir conmigo tantas buenas experiencias.

A mi mamá, Rosalba Corona, por ser el gran motor de mi vida y nunca permitir que me dé por vencida, por todo tu apoyo y por darme un hogar al que sé que siempre puedo volver para sentirme mejor.

RESUMEN

La flor de *Arabidopsis* se desarrolla en el ápice del tallo a partir de un meristemo de inflorescencia y está formada por diferentes órganos florales. El gineceo es el órgano reproductor femenino, se desarrolla a partir de la fusión de dos carpelos y cuando está completamente desarrollado se produce la auto-fecundación para la obtención del fruto. Para que el proceso de desarrollo se lleve a cabo de manera adecuada, la correcta coordinación de factores genéticos y hormonales es fundamental. El factor de transcripción *SPT* y las fitohormonas auxinas y citocininas han demostrado tener un papel importante en el desarrollo del gineceo. En mutantes de *spt* se ha observado la afectación en el correcto desarrollo de tejidos que dan como resultado la obtención de frutos de menor tamaño y con menor producción de semillas. Estudios recientes han señalado que las auxinas y citocininas tienen una relación sinérgica durante el desarrollo del gineceo y que *SPT* es importante para esta interacción. Hasta ahora hay poca información acerca de la regulación transcripcional de *SPT*, por ende, es importante conocer los factores genéticos que podrían estar actuando en su regulación y el efecto de estas dos hormonas en su expresión en tejidos de interés como el gineceo. En este trabajo se realizaron estudios bioinformáticos y moleculares para ampliar el panorama respecto a la regulación de *SPT*. Los resultados obtenidos indican que factores de transcripción pertenecientes a diferentes familias son capaces de unirse a la región promotora de *SPT*, sugiriendo que la regulación transcripcional de este gen podría darse a través de la acción combinatoria de diferentes factores de transcripción, además se demuestra que la aplicación exógena de citocininas y auxinas induce la expresión de *SPT* en gineceo. Ambas hormonas podrían estar actuando sinérgicamente en la regulación transcripcional de *SPT*.

ABSTRACT

The flower of *Arabidopsis* develops at the apex of the stem from an inflorescence meristem and is formed by different floral organs. The gynoecium is the female reproductive organ, develops from the fusion of two carpels and when fully developed, self-fertilization occurs to obtain the fruit. For the proper development, correct coordination of genetic and hormonal factors is essential. The transcription factor *SPT* and the phytohormones auxin and cytokinin have been shown to have an important role in the development of the gynoecium. In *spt* mutants, alterations have been observed in the correct development of tissues that result in obtaining smaller fruits and reduced seed production. Recent studies have indicated that auxins and cytokinins have a synergistic relationship during gynoecium development, and that *SPT* is important for this interaction. Until now there is poor information about the transcriptional regulation of *SPT*, therefore, it is important to know the genetic factors and hormones that could be acting in its regulation in tissues of interest such as the gynoecium. In this work, bioinformatic and molecular studies were carried out to broaden the panorama regarding *SPT* regulation. The results obtained indicate that transcription factors belonging to different families are capable of binding to the *SPT* promoter region, suggesting that the transcriptional regulation of this gene could occur through the combinatorial action of different transcription factors. Furthermore, exogenous application of cytokinin and auxin induce the expression of *SPT* in the gynoecium. Both hormones could be acting synergistically in the transcriptional regulation of *SPT*.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Factores del desarrollo vegetal.....	1
1.1.1. Factores de transcripción.....	1
1.1.2. Hormonas vegetales.....	2
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.2.1. Morfología y taxonomía.....	5
1.2.2. Modelo de estudio.....	7
1.3. El desarrollo de la flor y el gineceo.....	7
1.3.1. Las hormonas en el desarrollo del gineceo.....	10
1.3.2. Regulación genética en el desarrollo del gineceo.....	10
1.4. <i>SPATULA</i> (<i>SPT</i>).....	11
1.4.1. Patrón de expresión y región promotora de <i>SPT</i>	12
1.4.2. Factores de transcripción que afectan a <i>SPATULA</i>	14
1.4.3. <i>SPATULA</i> y las hormonas vegetales.....	15
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo General.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIALES Y METODOS.....	19
4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	19
4.2. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>SPATULA</i> y conservación en otras especies.....	19
4.2.1. Análisis de la región promotora de <i>SPT</i>	19
4.2.2. Análisis de la región promotora de especies filogenéticamente cercanas.....	20
4.3. Clonación de los fragmentos promotores de <i>SPATULA</i> y del gen <i>LFY</i>	20
4.4. Ensayo de un híbrido en levadura para la detección de interacciones ADN- proteína.....	23
4.4.1. Ensayo de un híbrido en levadura para la detección de interacciones ADN-proteína.....	25

4.5. Análisis del patrón de expresión en línea marcadora <i>SPT-GFP</i>	26
4.5.1. Tratamientos exógenos de citocininas y auxinas.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Análisis de la región promotora de <i>SPATULA</i>	27
5.2. Análisis de conservación en miembros de la Brassicaceae.....	30
5.3. Interacción de factores de transcripción con la región promotora de <i>SPATULA</i>	37
5.3.1. Clonación de fragmentos de la región promotora y el gen <i>LEAFY</i> ...	37
5.3.2. Prueba de auto-activación.....	38
5.3.3. Ensayos de un Híbrido (Y1H).....	42
5.4. Cambios en el patrón de expresión de <i>SPATULA</i> en tratamientos exógenos de citocininas y auxinas.....	46
6. DISCUSIÓN.....	52
6.1. Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>SPATULA</i>	52
6.2. Conservación de regiones promotoras en miembros de la familia <i>Brassicaceae</i>	52
6.3. Interacción de diversos factores de transcripción con la región promotora de <i>SPATULA</i>	55
6.4. Efecto de las hormonas auxinas y citocininas en el patrón de expresión de <i>SPATULLA</i> en gineceo.....	56
7. CONCLUSIONES.....	58
8. PERSPECTIVAS.....	59
9. REFERENCIAS.....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta, flor y fruto de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 2. Desarrollo de la flor en *Arabidopsis thaliana*.

Figura 3. Desarrollo del gineceo en *Arabidopsis thaliana*.

Figura 4. Fenotipos en gineceo y fruto de la mutante *spt*.

Figura 5. Patrón de expresión de *SPT* en *Arabidopsis*.

Figura 6. Análisis de la región promotora de *SPT*.

Figura 7. La expresión de *SPT* es inducida por *IND*.

Figura 8. El patrón de expresión de *SPT* es dependiente de *MP* en embrión de *Arabidopsis*.

Figura 9. Efecto de la aplicación de NPA sobre la línea mutante *spt-2*.

Figura 10. Efecto de la aplicación exógena prolongada de citocininas en el gineceo de *Arabidopsis*.

Figura 11. Fragmentación de la región promotora de *SPT* para el análisis de interacción ADN-PROTEINA.

Figura 12. Predicción de sitios de unión en la región promotora de *SPT* desde -45 a -2000 pb.

Figura 13. Relación filogénica de gen *SPT* y región promotora de *Arabidopsis thaliana* y otras especies.

Figura 14. Regiones conservadas en las secuencias promotoras de los ortólogos de *SPT* en otras especies.

Figura 15. Delimitación de zonas para el análisis de conservación.

Figura 16. Posibles sitios de unión para *MP* en la región promotora de *SPT* para las diferentes especies.

Figura 17. Bandas obtenidas al amplificar cada uno de los fragmentos promotores de *SPT* y el gen *LFY*.

Figura 18. Bandas obtenidas después del corte con enzimas de restricción para los fragmentos promotores *pSPT-A* y *pSPT-B*.

Figura 19. Esquema de auto-activación del fragmento promotor *pSPT-A*.

Figura 20. Esquema de auto-activación del fragmento promotor *pSPT-B*.

Figura 21. Bandas obtenidas al amplificar cada uno de los fragmentos promotores de *SPT* y gen *LFY*.

Figura 22. Interacción ADN-PROTEINA del fragmento *pSPT-A*.

Figura 23. Interacción ADN-PROTEINA del fragmento *pSPT-B*.

Figura 24. Patrón de expresión en línea marcadora *pSPT::GFP*.

Figura 25. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas.

Figura 26. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas.

Figura 27. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas.

Figura 28. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas.

Figura 29. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas en reconstrucción 3D.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de amplificación para los oligonucleótidos

Tabla 2. Número de sitios de unión correspondientes a cada familia de factores de transcripción.

Tabla 3. Factores de transcripción obtenidos de la predicción en AthaMap.

Tabla 4. Familias de factores de transcripción con sitios de unión en las regiones conservadas de cada especie.

Tabla 5. Cajas conservadas correspondientes a los motivos de unión de los factores de transcripción de la familia bHLH en todas las especies.

Tabla 6. Cajas conservadas en los motivos de unión de SPT en cada especie.

Tabla 7. Cajas conservadas correspondientes a los motivos de unión de los factores de transcripción de la familia BES1 en todas las especies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Factores del desarrollo vegetal

El desarrollo vegetal combina los resultados de tres procesos: la división celular, que produce nuevas células; el crecimiento, que incrementa el tamaño de las células y órganos; y la diferenciación, que es el conjunto de cambios por los que las células se especializan en su estructura y función. Los factores ambientales (temperatura, humedad, luz, gravedad etc.), el código genético y las fitohormonas son los principales factores que rigen este proceso (Pimienta *et al.*, 2006).

1.1.1. Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas involucradas en el proceso de convertir o transcribir el ADN en ARN. Incluyen un gran número de proteínas, excluyendo la ARN polimerasa, que inician y regulan la transcripción de genes. Una característica distintiva de los factores de transcripción es que tienen dominios de unión al ADN que les dan la capacidad de unirse a secuencias específicas de ADN llamadas secuencias potenciadoras o promotoras. Algunos factores de transcripción se unen a una secuencia promotora de ADN cerca del sitio de inicio de la transcripción y ayudan a formar el complejo de iniciación de la transcripción. Otros factores de transcripción se unen a secuencias reguladoras, tales como secuencias potenciadoras, y pueden estimular o reprimir la transcripción del gen. Estas secuencias reguladoras pueden estar miles de pares de bases río arriba o río abajo del gen que se transcribe. La regulación de la transcripción es la forma más común de control de genes. La acción de los factores de transcripción permite que se lleve a cabo un perfil de expresión específico para cada gen en diferentes tipos de células y durante el desarrollo (Nature Education, 2014).

Los factores de transcripción pueden convertir señales ambientales transitorias de la superficie celular en cambios a largo plazo en la transcripción génica, actuando, así como "mensajeros nucleares", pueden activarse dentro del núcleo, a menudo con el factor de transcripción ya unido al ADN o dentro del citoplasma (Ito *et al.*, 2006).

En los organismos eucariotas, las proteínas involucradas en la transcripción se pueden clasificar en cuatro grupos funcionales diferentes (Lee y Young, 2000; Lemon y Tjian, 2000):

Maquinaria de transcripción basal y factores asociados intrínsecos (también conocidos como factores de transcripción generales, o GTF). Su objetivo es la transcripción de genes que codifican para proteínas, proceso que se lleva a cabo exclusivamente por la Pol II (Cramer *et al.*, 2001).

Coactivadores de subunidades múltiples y otros cofactores. Esta clase heterogénea de proteínas reguladoras incluye cofactores que interactúan con secuencias específicas de factores de transcripción y modulan su unión al ADN o su interacción con la maquinaria central (Hampsey y Reinberg, 1999).

Factores de transcripción de unión a ADN de secuencia específica. Son factores de transcripción del tipo clásico, generalmente definidos como proteínas con una secuencia específica de unión a ADN y son capaces de activar y / o reprimir la transcripción. Son responsables de la selectividad en la regulación de genes, y a menudo son expresados en un tejido, tipo de célula, dependiente de algún estímulo (Luscombe *et al.*, 2000).

Proteínas relacionadas con la cromatina. Este grupo incluye factores que modifican covalentemente las histonas (como acetilasas y desacetilasas de histonas) y complejos de remodelación que hidrolizan el ATP para reorganizar la estructura de la cromatina (Riechmann, 2002).

1.1.2. Hormonas vegetales

Las hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos naturales producidos en las plantas y son las que definen en buena medida el desarrollo. Se sintetizan en una parte u órgano de la planta a concentraciones muy bajas (< 1 ppm) y actúan en ese sitio o se translocan a otro en donde regulan eventos fisiológicos definidos (estimulan, inhiben o modifican el desarrollo) (Díaz, 2017).

Las hormonas influyen muchos procesos de desarrollo. Cada fase del desarrollo de la planta desde la embriogénesis hasta la senescencia está controlada por hormonas. Auxinas (AUX), citocininas (CK), giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA) y etileno (ET) se consideran hormonas vegetales clásicas. Mientras que, brasinoesteroides (BR), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), poliaminas (PA) strigolactonas (SL) y óxido nítrico (NO) se clasifican en la clase de “nuevas hormonas vegetales” (Santner *et al.*, 2009).

Citocininas. Las citocininas (CK) son una clase de fitohormona derivadas de la adenina, recibieron su nombre por su capacidad para promover la citocinesis (Miller *et al.*, 1955). Basándose en su cadena lateral, las citocininas naturales se dividen en dos grupos; aquellas con derivados del isopreno en sus cadenas laterales (predominantes en plantas) y aquellas con cadenas laterales aromáticas (Sakakibara, 2006). Investigaciones han demostrado que las citocininas desempeñan un papel fundamental en las plantas, incluido el control de células madre, diferenciación vascular, biogénesis de cloroplasto, desarrollo de frutos y la semilla, crecimiento y ramificación de la raíz, desarrollo de la inflorescencia y de las flores, senescencia de la hoja, equilibrio de nutrientes y tolerancia al estrés (Bartrina *et al.*, 2011; Marsch-Martinez *et al.*, 2012; Muller y Sheen, 2007; Prerostova *et al.*, 2018; Reyes-Olalde *et al.*, 2017; Zuñiga-Mayo *et al.*, 2018; Zhang y Guo, 2018; Zhang *et al.*, 2017; Zubo *et al.*, 2017).

En *Arabidopsis thaliana* el sistema de señalización de citocininas está mediado por un sistema de dos componentes que es similar al sistema de señalización de dos componentes (TCS) encontrado en bacterias y levaduras. En general el sistema se compone de sensores de cinasas, proteínas fosfotransferasas de histidina (AHP) y

reguladores de respuesta. Las citocininas interactúan con otras hormonas durante la señalización. Especialmente con auxinas, con quienes actúa de manera antagónica o sinérgica dependiendo del lugar, desempeñando un papel crucial en el desarrollo de la planta (Coenen y Lomax, 1997; Muraro *et al.*, 2001; Schaller *et al.*, 2015; Reyes-Olalde *et al.*, 2017). Durante algunos años se pensó que las citocininas se sintetizaban solo en las raíces y de ahí se transportaban a otros lugares en la planta. Recientemente se ha demostrado que los genes *ISOPENTENIL TRANSFERASA (IPT)* y *LONELY GUY (LOG)* (involucrado en la biosíntesis) se expresan en diversos tejidos de *Arabidopsis* (Sakakibara, 2006; Kudo *et al.*, 2010). Por ello, actualmente se sugiere que las citocininas se pueden producir en varios tejidos de la planta, incluyendo los aéreos.

Auxinas. Las auxinas juegan un papel indispensable en muchas etapas del crecimiento y procesos de desarrollo de plantas tales como división celular, elongación y diferenciación celular, formación de raíces, dominancia apical, tropismo, senescencia, embriogénesis y la formación de órganos postembriogénesis (Guilfoyle *et al.*, 1998; Leyser, 2008). Los tejidos en crecimiento activo tales como el primordio de la hoja, meristemo apical, semillas en desarrollo, hojas jóvenes, frutos y polen en crecimiento son los principales sitios para síntesis de auxinas. Además, juegan un papel importante en la dominancia apical (Romano *et al.*, 1991). Una de las características más sobresalientes de esta fitohormona es que está distribuida diferencialmente entre células y tejidos; en algunos casos se acumula localmente en una célula o un grupo de células, en otros cambia su distribución entre células y, finalmente, también puede tener una distribución diferencial en los tejidos vegetales. Este gradiente de concentraciones de auxinas afecta diferentes procesos morfogénicos, por lo que a esta hormona se le ha considerado como un "morfógeno" (Vanneste y Friml, 2009).

Hay dos vías principales de síntesis: una dependiente de triptófano (Trp) que tiene cuatro ramificaciones cuyos nombres se derivan de uno de los intermediarios más importantes de cada una de las vías: el 3-indol acetamida (IAM), el 3-indol acetaldoxima (IAOx), la triptamina (TAM), y la del ácido 3-indol pirúvico (IPA) y otra

independiente de triptófano pero que se deriva de un precursor del mismo (Ljung, 2013; Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010; Woodward y Bartel, 2005). La regulación de estas vías sintéticas depende de estímulos externos como son la luz, los nutrientes, la sequía, el frío o heridas (Woodward y Bartel, 2005; Tao *et al.*, 2008) y de otros factores internos como lo son otras hormonas (Stepanova *et al.*, 2008).

1.2. *Arabidopsis thaliana*

1.2.1. Morfología y taxonomía

Arabidopsis thaliana es una brassicácea distribuida por todos los continentes; de tamaño pequeño (permite siembras de hasta 1.000 plantas/m²); anual y con un ciclo vital relativamente corto (unas 8 semanas); muy prolífica (capaz de producir 10.000 semillas por planta) y sus semillas son viables varios años; autógena (capaz de auto-fecundarse), fácil de cruzar y de genoma pequeño (157 Mbps), pero con las características típicas de las otras angiospermas en cuanto a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente (AGI, 2000; Meinke *et al.*, 1998).

Esta planta desarrolla sus hojas en forma de roseta (Figura 1), la roseta llega a su tamaño máximo a los 30 días y empieza la transición a floración. Las hojas de roseta son de 1.5 a 5 cm de largo y de 2 a 10 mm de ancho con serraciones, están cubiertas con pequeños pelos unicelulares llamados tricomas. El tallo floral llega a crecer hasta 30 cm de largo y las flores miden 3 mm de diámetro. La silicua (fruto) es de 20 mm de largo y contiene hasta 50 semillas por fruto. Las flores se conforman de cuatro verticilos concéntricos de órganos florales: cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y un pistilo formado por la fusión de dos carpelos.

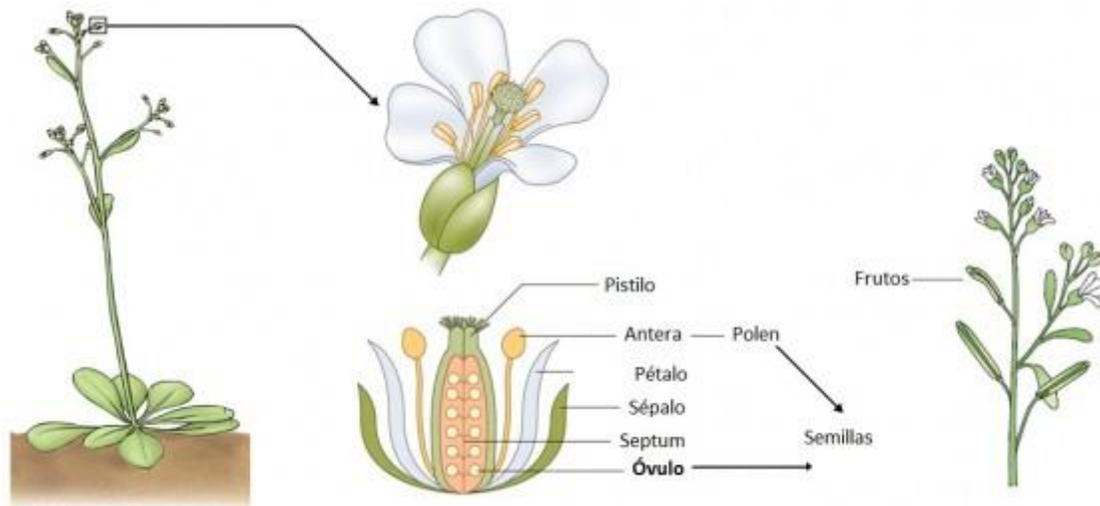


Figura 1. Planta, flor y fruto de *Arabidopsis thaliana*. Diagrama de una planta de *Arabidopsis thaliana* (planta modelo) y de la morfología de su flor y fruto (extraído y modificado de los libros Biochemistry & Molecular Biology of Plants de Bob B. Buchanan, 2015; Plant Physiology & Development de Lincoln Taiz, 2015).

Su clasificación taxonómica se encuentra descrita de la siguiente forma:

<i>Reino:</i>	Plantae
<i>División:</i>	Magnoliophyta
<i>Clase:</i>	Magnoliopsida
<i>Subclase:</i>	Dilleniidae
<i>Orden:</i>	Capparales
<i>Familia:</i>	Brassicaceae
<i>Género:</i>	<i>Arabidopsis</i>
<i>Especie:</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>

1.2.2. Modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es un importante sistema modelo para identificar genes y determinar sus funciones. Al ser la primera secuencia completa del genoma de una planta proporcionó los cimientos para una comparación más completa de los procesos conservados en todos los eucariotas, identificando una amplia gama de funciones génicas específicas de la planta y estableciendo formas rápidas sistemáticas para identificar genes para la mejora de cultivos cultivo (AGI, 2000).

1.3. El desarrollo de la flor y el gineceo

Las flores de *Arabidopsis thaliana* se forman en los flancos del meristemo apical del brote después de la transición vegetativa a reproductiva. La flor se compone de cuatro tipos de órganos que se desarrollan en distintos verticilos florales: cuatro sépalos verdes que surgen en posiciones precisas en el primer verticilo, cuatro pétalos blancos en el segundo, seis estambres productores de polen en el tercero y dos carpelos fusionados en el cuarto que forman el gineceo (Smyth *et al.*, 1990).

Se han descrito 20 etapas del desarrollo de la flor al fruto (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010):

Durante la etapa 1 (Figura 2) se observan las primeras señales de la formación de un primordio floral a partir del meristemo de inflorescencia, en esta etapa hay una intensa actividad mitótica hasta la formación del primordio. Para la etapa 2 el primordio se delimita completamente del meristemo de inflorescencia y continúa creciendo rápidamente en todas direcciones. En la etapa 3 el primordio de la flor sigue creciendo horizontal y verticalmente, además se observa la aparición de los primordios de los sépalos. Durante la etapa 4 el pedicelo continúa alargándose, se observa la aparición de los otros dos sépalos y los primeros han cubierto la mitad de meristemo floral. En la etapa 5 los primordios de los pétalos y estambres comienzan a ser visibles flanqueando el domo central del meristemo floral. En la etapa 6 los sépalos han cubierto por completo el meristemo floral, los primordios de pétalos y estambres, se observa que los estambres continúan elongándose,

mientras que los primordios de los pétalos crecen un poco pero aún están relativamente pequeños y se puede apreciar un borde alrededor de la cúpula central del primordio de la flor que comienza a crecer hacia arriba para producir un tubo ovalado que se convertirá en el gineceo. En la etapa 7 los estambres continúan elongándose dando origen a los filamentos y anteras, los primordios de los pétalos se vuelven hemisféricos, pero aún son relativamente pequeños y el gineceo que se observa como un tubo hueco continua su desarrollo.

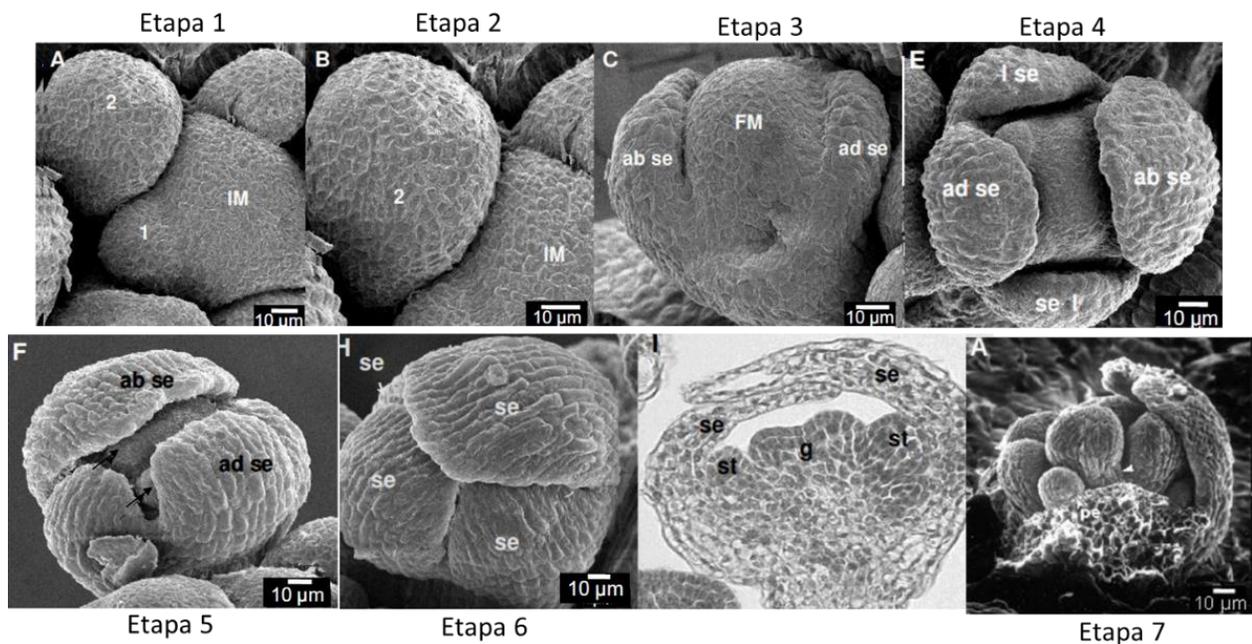


Figura 2. Desarrollo de la flor en *Arabidopsis thaliana*. Etapas 1 a 7 del desarrollo de la flor en planta silvestre ecotipo Columbia-0. Imagen tomada y editada de Alvarez-Buylla *et al.*, 2010.

A partir de la etapa 8, en el gineceo comienzan a diferenciarse las estructuras que posteriormente permitirán un adecuado desarrollo del fruto, el meristemo del margen del carpelo o CMM comienza a ser claramente visible, el CMM es el tejido meristemático que dará origen a los tejidos marginales del carpelo como son la placenta, óvulos, tracto de transmisión, estilo y estigma. Conforme el desarrollo avanza hasta la etapa 9 los dos CMM se unen formando el septum, al mismo tiempo

en los flancos del CMM se forma el tejido placentario que empieza la producción de primordios de los óvulos. En la etapa 10 continua el desarrollo de los carpelos y el estigma comienza a formarse en la parte apical del gineceo. Para la etapa 11 los óvulos están completamente formado, se cierra el gineceo y las papilas estigmáticas cubren el estigma. En la etapa 12 se diferencian el estilo y el tracto de transmisión además las valvas y los márgenes de las valvas comienzan a ser morfológicamente distintos. En la etapa 13 tenemos un gineceo completamente desarrollado y ocurre la antesis y la auto-polinización, después la flor se abre (Reyes-Olalde *et al.*, 2013).

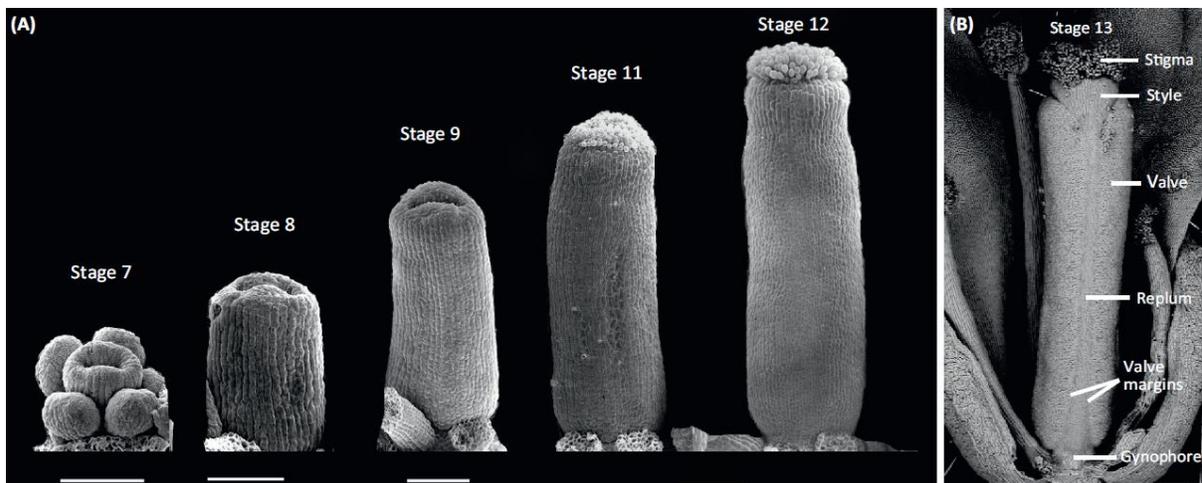


Figura 3. Desarrollo del gineceo en *Arabidopsis thaliana*. Etapas 7 a 13 del desarrollo del gineceo en *Arabidopsis thaliana*. Imagen tomada de Reyes-Olalde *et al.*, 2013.

Cada diferente etapa de desarrollo está caracterizada por la diferenciación, 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 (Ferrández *et al.*, 2010; Reyes-Olalde *et al.*, 2013; Marsch-Martinez y de Folter, 2016).

1.3.1. Las hormonas en el desarrollo del gineceo

Como ya se mencionó antes, las hormonas vegetales desempeñan un papel importante durante el proceso de desarrollo de la planta, esto incluye al gineceo. Se ha descrito que la señalización de citocininas (mediante la línea marcadora de respuesta a citocininas *TCS::GFP*, Two Component System) está presente durante el desarrollo del gineceo desde estadios muy tempranos hasta la formación del fruto. Se ha reportado que las citocininas en el gineceo ejercen su función favoreciendo la actividad meristemática del meristemo marginal del carpelo (CMM en inglés) y en el fruto son necesarias para la correcta diferenciación del margen de las valvas, siendo en estos tejidos donde se observa la mayor señal de la línea marcadora *TCS::GFP* (Marsch-Martínez *et al.*, 2012; Reyes-Olalde *et al.*, 2017a). Cuando se afecta la concentración de citocininas de manera endógena en el gineceo y fruto de *Arabidopsis*, el réplum se afecta en tamaño y número de células; se ha observado incluso la proliferación de tejido del réplum con la aplicación exógenas de citocininas (Marsch-Martínez *et al.*, 2012; Reyes-Olalde *et al.*, 2017a). Las auxinas por otro lado, se ha demostrado que 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; Reyes-Olalde *et al.*, 2017a; Müller *et al.*, 2017).

1.3.2. Regulación genética en el desarrollo del gineceo

Durante los últimos años, se han identificado varias mutaciones que afectan el desarrollo del gineceo en *Arabidopsis*. Algunos de ellos causaron principalmente la pérdida de la identidad del carpelo, mientras que otros afectaron la diferenciación de tejidos específicos dentro del gineceo (Balanzá, *et al.*, 2006; Reyes-Olalde *et al.*, 2013). Por ejemplo, la dehiscencia de *Arabidopsis* está bloqueada en mutantes del factor de transcripción *ALCATRAZ* (*ALC*) debido a la incorrecta diferenciación de la capa de separación en el margen de la valva (Rajani y Sundaresan, 2001). *INDEHISCENT* (*IND*) es un factor primordial para la especificación de las capas de

lignificación y de separación de los márgenes de la valva y mutaciones en este gen también afecta la dehiscencia del fruto de *Arabidopsis* (Liljegren *et al.*, 2004). Mutaciones en el gen de *FRUITFULL* (*FUL*) dan frutos compactos y pequeños que no logran elongar después de la fecundación ya que las células de las valvas no llegan a expandirse (Gu *et al.*, 1998). Las mutantes de *REPLUMLESS* (*RPL*) pierden la capacidad de diferenciar las células del réplum y en su lugar adoptan características de las células del margen de la valva (Roeder *et al.*, 2003). *SPATULA* (*SPT*) es otro factor de transcripción que participa en el desarrollo del gineceo, tiene un papel en el desarrollo del tracto de transmisión y los tejidos medios (Heisler *et al.*, 2001).

1.4. SPATULA (SPT)

En *Arabidopsis*, el gen *SPT* desempeña un papel en el desarrollo de todos los tejidos que surgen de los márgenes de los carpelos, codifica para un factor de transcripción que es miembro de la gran familia *basic-helix-loop-helix* (bHLH) (Bailey *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). La mutante *spt* tiene afectada la fusión de la parte apical de los márgenes del carpelo lo que afecta el estilo y estigma en tamaño y abundancia, también se afecta la fusión del séptum, la formación del tejido del tracto de transmisión y la cantidad de semillas del fruto (Figura 4) (Alvarez y Smyth, 1999, 2002).

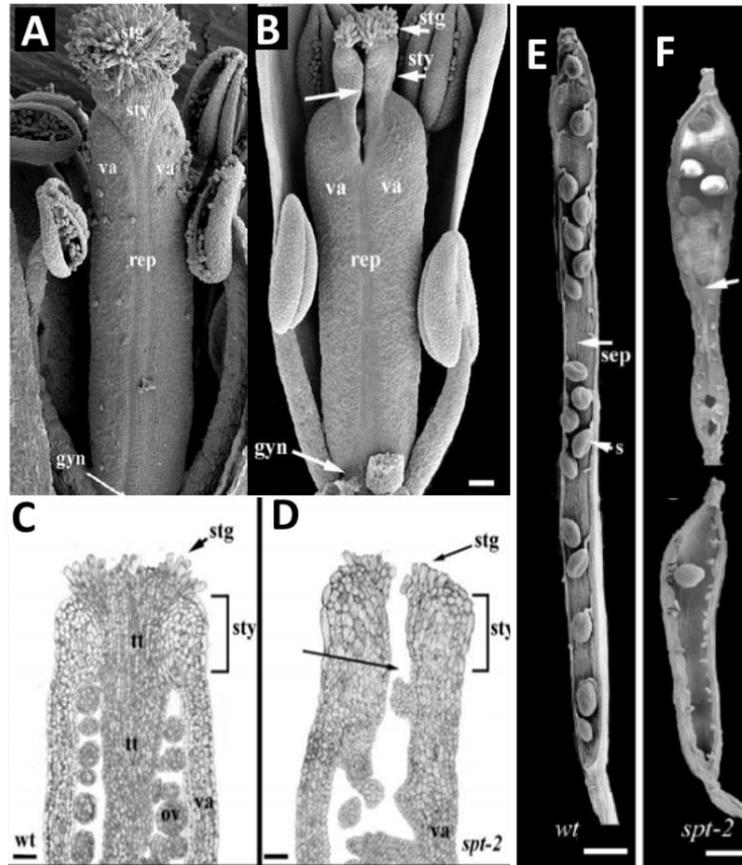


Figura 4. Fenotipos en gineceo y fruto de la mutante *spt*. (A, C) Fenotipo de un gineceo silvestre donde se observa el correcto desarrollo del gineceo, en el corte longitudinal se muestra el tejido correspondiente al tracto de transmisión. (B, D). Fenotipo de un gineceo de la mutante *spt*, se observa la fusión incorrecta de los márgenes del carpelo en la parte apical, el corte longitudinal muestra la ausencia de tejido donde debería estar el tracto de transmisión (tt). (E) Fruto (silicua) de una planta silvestre. (F) Frutos de la mutante *spt* donde se observa una diferencia significativa en la cantidad de semillas en comparación con el fruto de la planta silvestre (figura tomada y editada de Alvarez y Smyth, 1999, 2002).

1.4.1. Patrón de expresión y región promotora de *SPT*

El gineceo no es el único lugar donde se encuentra expresado *SPT*, en esta figura de Groszmann y colaboradores del 2010 se observa su expresión en otros tejidos como el embrión, el meristemo de raíz, hojas, meristemo de inflorescencia y en tejidos del gineceo como el tracto de transmisión lo que nos dice que este factor de

transcripción es importante durante el desarrollo de la planta en sus diferentes etapas.

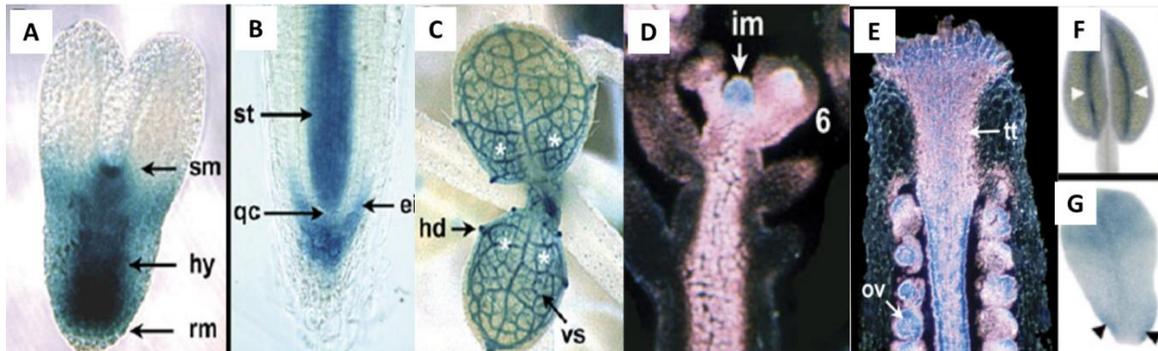


Figura 5. Patrón de expresión de *SPT* en *Arabidopsis*. Se muestran el patrón de expresión del gen reportero GUS clonado bajo el control de la región promotora del gen *SPT*, el cual se observa en diferentes tejidos. (A) Embrión. (B) Meristemo de raíz. (C) Hoja. (D) Meristemo de inflorescencia. (E) Gineceo. (F) Estambre. (G) Pétalo. (figura tomada y editada de Groszmann *et al.*, 2002)

El análisis de la región promotora de *SPT* desde -1 hasta -6253 pb ha mostrado que la región que comprende desde -1 hasta -2217 pb río arriba del codón de inicio es primordial para conservar el patrón de expresión de *SPT*, se han determinado las regiones que intervienen en el silenciamiento específico de tejidos como el ápice del estambre, la epidermis de las hojas y de las raíces maduras, así como la región relacionada a “enhancers” tejido-específicos entre los que se encuentra el gineceo y se estableció que los primeros 221 pb río arriba del codón de inicio son esenciales para el inicio de la transcripción y donde se encuentran enhancers para tejidos del gineceo (Figura 6) (Groszmann *et al.*, 2010).

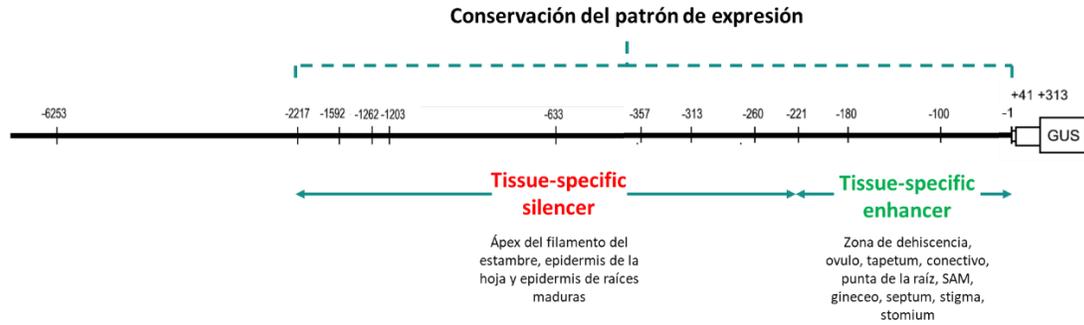


Figura 6. Análisis de la región promotora de *SPT*. Las primeras 2217 pb río arriba son esenciales para conservar el patrón de expresión (figura elaborada con datos de Groszmann *et al.*, 2010).

1.4.2. Factores de transcripción que afectan a *SPT*

Los factores de transcripción que se han determinado que tienen una regulación sobre *SPT* son *INDEHISCENT (IND)* y *MONOPTEROS (MP)*.

IND afecta positivamente la expresión de *SPT*, esto fue demostrado en 2012 por Girin y colaboradores, sus experimentos demostraron que la sobreexpresión ectópica del gen *IND* bajo el control del promotor 35S condujo a una fuerte inducción de una construcción reportera *pSPT::GUS* (b-glucuronidasa) en la mayoría de los tejidos de la inflorescencia (Figura 7).

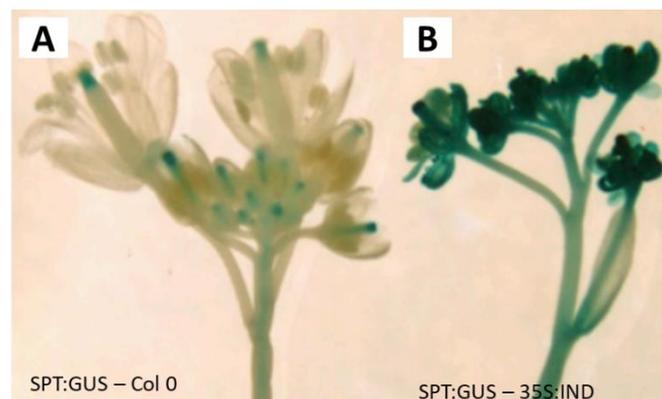


Figura 7. La expresión de *SPT* es inducida por *IND*. (A) Patrón de expresión de *SPT* en la línea marcadora *pSPT::GUS* en un fondo silvestre. (B) Patrón de expresión de *SPT* en la línea marcadora *pSPT::GUS* en un fondo de sobreexpresión de *IND* (*35S::IND*) (Imagen tomada de Girin *et al.*, 2012).

Estudios recientes en embrión de *Arabidopsis* reportan que en la mutante *mp* la señal de la línea marcadora de *pSPT::GFP* está severamente afectada, sugiriendo que *MP*, que también se llama *AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (ARF5)*, es necesario para la correcta expresión de *SPT* en tejidos del embrión (Figura 8).

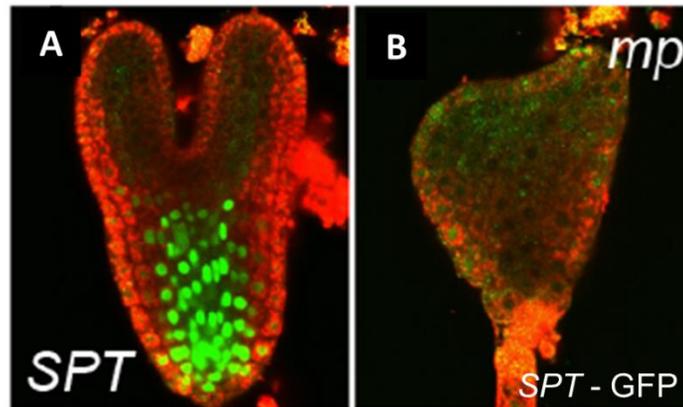


Figura 8. El patrón de expresión de *SPT* es dependiente de *MP* en embrión de *Arabidopsis*.

(A) Patrón de expresión de *SPT* en embrión de *Arabidopsis* en fondo silvestre. (B) Patrón de expresión de *SPT* notablemente afectado en embrión de la mutante *mp* (Imagen tomada de Moller *et al.*, 2017).

Hasta el momento se conoce poco acerca de la regulación genética de *SPT* a nivel transcripcional por lo que más estudios al respecto son necesarios.

1.4.3. *SPATULA* y las hormonas vegetales

La función del gen *SPT* ha sido relacionada, de una u otra forma, con las hormonas auxinas y citocininas. El fenotipo característico de la mutante *spt* (Figura 9A) es recuperado parcialmente (Figura 9B) cuando se aplica ácido N-1-naphthylphthalamico (NPA por sus siglas en inglés), una molécula caracterizada como un inhibidor del transporte de auxinas (Nemhauser *et al.*, 2000).

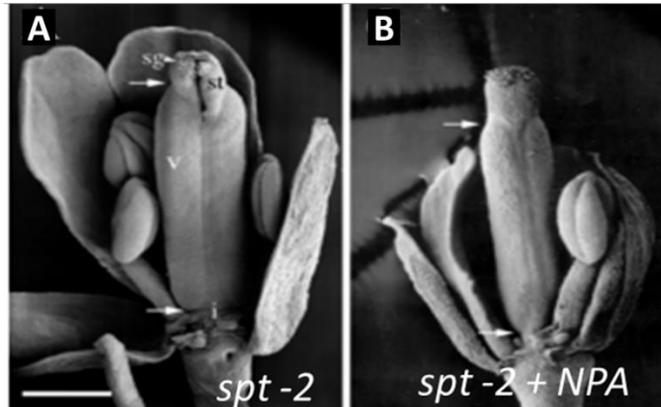


Figura 9. Efecto de la aplicación de NPA sobre la línea mutante *spt-2*. (A) Gineceo de la mutante *spt-2* en *Arabidopsis*. (B) Gineceo de la mutante *spt-2* después de NPA (figura tomada de Nemhauser *et al.*, 2000).

Por otro lado, cuando se afecta la concentración de citocininas, los diferentes tejidos del gineceo se afectan en tamaño y número de células, se ha observado que la aplicación exógena prolongada de citocininas provoca la proliferación de tejido del réplum denominado como crestas (Figura 10), en cambio este fenotipo no se observa de la misma manera en la mutante *spt*. Esto sugiere que *SPT* es un factor de transcripción importante para la respuesta a citocininas en gineceo (Reyes-Olalde *et al.*, 2017a).

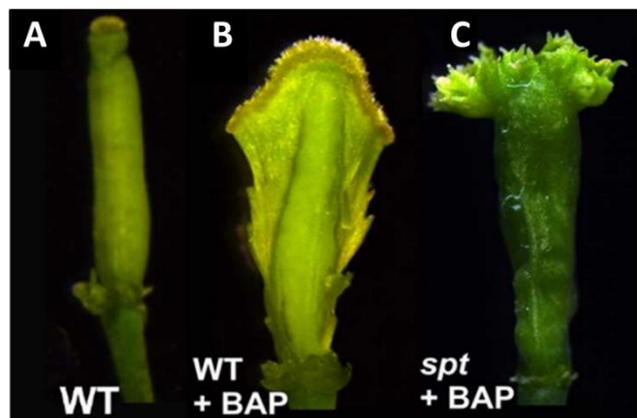


Figura 10. Efecto de la aplicación exógena prolongada de citocininas en el gineceo de *Arabidopsis*. (A) Gineceo de planta silvestre de *Arabidopsis* tratado con la solución mock. (B) Gineceo de planta silvestre de *Arabidopsis* bajo tratamiento de citocininas. (C) Gineceo de la mutante *spt-2* con tratamiento de citocininas (figura tomada de Reyes-Olalde *et al.*, 2017a).

2. HIPÓTESIS

La regulación de la transcripción del gen *SPATULA* requiere de distintas hormonas y factores de transcripción para su correcta expresión.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Identificar los factores de transcripción y hormonas que afectan la transcripción de *SPATULA* en *Arabidopsis thaliana*.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar factores de transcripción que se unen a la región promotora de *SPATULA*.
- Evaluar el patrón de expresión de *SPATULA* en el meristemo floral y gineceo ante estímulos hormonales.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

La línea marcadora del promotor *SPT*, (*pSPT::GFP*) para el análisis de patrones de expresión fue obtenida del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Wageningen a cargo del Dr. Dolf Weijers, esta línea incluye un fragmento de 2 kb río arriba del codón de inicio del gen *SPT* y un triple reportero nuclear sensible fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) (Möller *et al.*, 2017). El ADN y cADN utilizado para la obtención de los fragmentos promotores de *SPT* y el gen *LEAFY* (*LFY*), necesarios para la prueba de un híbrido en levadura fueron obtenidos de plantas de *Arabidopsis* silvestre ecotipo Columbia, estas semillas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Genómica Funcional para el Desarrollo de Plantas del Cinvestav Irapuato.

Todas las semillas fueron germinadas en sustrato preparado para *Arabidopsis* (vermiculita, perlita y suelo orgánico, 1:1:3), en cámara de crecimiento bajo condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a 22°C. 14 días después de la germinación las plantas fueron transferidas a invernadero creciendo en condiciones de luz natural con un rango de temperatura de 22 a 28°C.

4.2. Análisis *in silico* de la región promotora de *SPATULA* y conservación en otras especies

4.2.1. Análisis de la región promotora de *SPT*

La región promotora (región intergénica río arriba del codón de inicio de un gen excluyendo la región codificante del gen anterior) de *SPT* fue obtenida de la base de datos de TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). Para este análisis se consideró una región desde +45 pb hasta -2000 pb y se utilizó la herramienta “Gene Analysis” de AthaMap (<http://www.athamap.de>) que arroja una predicción de los sitios de unión correspondientes a factores de transcripción de 33 familias.

4.2.2. Análisis de la región promotora de especies filogenéticamente cercanas

Se obtuvo la secuencia de la región promotora de 8 especies filogenéticamente cercanas a *Arabidopsis thaliana* de la base de datos de Phytozome 12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Para obtener estas secuencias, se buscó los genes homólogos de *SPT* en las 8 especies y se obtuvo la región de -1 a -2000 pb río arriba de cada gen. El análisis de conservación de secuencia para las 8 regiones promotoras fue realizado por medio de la página VISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/>) para encontrar las secuencias de aquellas regiones con un 50% de conservación o más, los sitios de unión de factores de transcripción en estas secuencias fueron obtenidos por medio de la herramienta “TF prediction” de la página PlantRegMap (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>).

4.3. Clonación de los fragmentos promotores de *SPATULA* y de los genes *LFY*, *TOE3* y *MP*

La secuencia de la región promotora de *SPT* y de los genes *LFY*, *TOE* y *MP* fueron obtenidas de la base de datos de TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). Para la región promotora de *SPT* se consideró una región desde +45 pb hasta -2000 pb dividida en dos fragmentos, el primero de ellos desde +45 a -1,008 (1053 pb) y el segundo de -769 a -2000 (1231 pb) con un traslape de 239 pb (ver Figura 11).

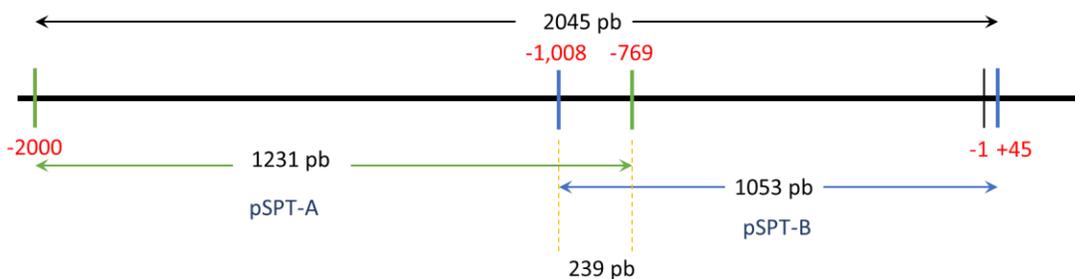


Figura 11. Fragmentación de la región promotora de *SPT* para el análisis de interacción ADN-PROTEINA.

La amplificación de los fragmentos de la región promotora de *SPT* se realizó a partir de ADN genómico extraído por el protocolo *Shorty Buffer* (Edwards *et al.*, 1991). Para la amplificación del gen *LFY* se utilizó como templado el cADN sintetizado a partir de RNA total extraído mediante el kit E.Z.N.A.® Plant RNA (OMEGA Bio-tek, R6827-02). Ambos ácidos nucleicos fueron extraídos de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia. Las especificaciones de cada par de oligonucleótidos fueron consideradas para encontrar las mejores condiciones de amplificación. La temperatura adecuada de alineamiento para cada juego de oligonucleótidos fue establecida mediante un gradiente de temperatura. La Tabla 1 muestra las características de cada par de oligonucleótidos. Las condiciones generales de amplificación se describen a continuación: 94°C, 5 minutos (1 ciclo); 94°C, 30 segundos, temperatura correspondiente al par de oligonucleótidos (Tabla 1), 30 segundos y 72°C, 1 minuto por cada kb a amplificar (Tabla 1) (30 ciclos); 72°C durante 5 minutos (1 ciclo). Cada amplificación realizada se analizó en geles de agarosa 0.8%, en TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 1. Características generales de amplificación para los oligonucleótidos.

Producto	Oligo directo (5'- 3')	Oligo reverso (5'- 3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)
<i>pSPT-A</i>	CAC CTG CAT ATG TAT TAC GGA AAC TTT GG	CAA CTA TAT ACC TCG TTC GTA TGC	55	1231
<i>pSPT-B</i>	CAC CGA TGC TGC TGT CTG CAC AG	CAC TCT CTG CTT CTT CTC TTC TC	57	1053
<i>LFY</i>	CAC CAT GGA TCC TGA AGG TTT CAC GAG	CTA GAA ACG CAA GTC GTC GC	58	1263
<i>TOE3</i>	CAC CAT GTG GAA CCT TAA CGA CTC ACC C	TCA GGG ACG AGA GAA GTG GAA G	57	1059
<i>MP</i>	CAC CAT GAT GGC TTC ATT GTC TTG TG	TTA TGA AAC AGA AGT CTT AAG ATC G	55	2709

Los fragmentos promotores y el gen amplificado (*LFY*) se purificaron con el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research, Cat. No. D4004); la concentración fue cuantificada por espectrofotometría en NanoDrop. Se llevó a cabo la ligación al vector de entrada p-ENTR™ D-TOPO® en una reacción con una proporción molar 2:1 del producto de PCR: vector TOPO® en reacciones de 3 ul. Las reacciones de ligación fueron utilizadas para transformar bacterias *E. coli* DH5α químicamente competentes bajo el protocolo correspondiente y se plaquearon en medio LB con kanamicina (50 µg/mL). Las colonias de bacterias transformadas se analizaron por PCR previa extracción de ADN plasmídico mediante el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH, Cat. No. D4019), de esta forma también se obtuvo el vector de entrada con el fragmento promotor o gen correspondiente. Cada muestra de vector 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 fragmento promotor y gen. Las secuencias resultantes se alinearon con las secuencias molde mediante el uso de la herramienta *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para corroborar la identidad del fragmento clonado.

Los vectores de entrada corroborados positivamente en el alineamiento fueron recombinados con los vectores destino CZN1018 (pAbAi de Clontech con el sitio Gateway) (Danisman *et al.*, 2012) para los fragmentos promotores y pDEST™22 (Invitrogen) para los genes. El vector CZN1018 confiere resistencia a ampicilina en *E. coli* y resistencia al antibiótico Aureobasidina A (AbA) en levaduras cuando hay interacción positiva con la proteína evaluada. El vector pDEST22 confiere resistencia a ampicilina en *E. coli* y resistencia a medio sin TRIPTOFANO (TRP) en levadura. La recombinación se realizó bajo el principio de la tecnología Gateway® (Invitrogen) mediante reacciones simples de recombinación LR (150 ng de vector de Destino; 150 ng de vector de entrada; 2 µl de LR clonasa MIX) en 10 µl para cada vector de entrada con los dos vectores destino. Cada reacción fue incubada una hora a temperatura ambiente y la enzima LR clonasa fue desactivada con 1 µl de proteinasa K incubando a 37°C por 10 min. Las reacciones obtenidas se utilizaron para transformar *E. coli* (DH5α) quimio-competentes siguiendo el

protocolo correspondiente y se plaquearon en medio con antibiótico de acuerdo al vector destino utilizado (Ampicilina 50 µg/mL para CZN1018 y Ampicilina 100 µg/mL para pDEST22).

Las colonias bacterianas obtenidas de la transformación de cada reacción LR fueron analizadas por PCR y digestión de enzimas previa extracción de ADN plasmídico.

4.4 Ensayo de un híbrido en levadura para la detección de interacciones ADN-proteína.

El material plasmídico que resultó positivo a la presencia del respectivo fragmento promotor o gen fue utilizado para la transformación en 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 el caso del vector CZN1018 con los fragmentos promotores y el protocolo “*quick and easy*” para el vector pDEST22 con los genes.

Para realizar la integración al genoma se linealizó cada muestra de plásmido del vector CZN1018 con los fragmentos promotores. La linealización se hizo con la enzima *Bsp119I* (Thermo Scientific™, Cat. No. ER0121), esta enzima tiene un solo sitio de corte que se encuentra en la región *URA-3* del plásmido CZN1018. De esta manera la levadura solo es capaz de sintetizar el URA cuando el plásmido linealizado ha sido integrado en el genoma de la levadura, debido a que en el genoma se vuelve a completar la región *URA-3*. En cada reacción de digestión se utilizó 5 µg de cada plásmido y se incubó por 4 horas a 37°C. La digestión total fue corroborada en un gel de agarosa 0.8% TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio. El vector pDEST22 fue utilizado tal cual se obtuvo de la extracción.

El protocolo de transformación de levadura se realizó de la siguiente manera para cada vector: se cultivó por separado la cepa PJ69-4α para el plásmido CZN1018 y la cepa PJ69-4A para el plásmido pDEST22 en 10 ml de medio rico YPAD en un matraz de 50 ml a 30°C, 200 rpm toda la noche. Al día siguiente, este pre-cultivo se diluyó en medio rico YPAD en proporción 1:5 y se incubó a 30°C hasta alcanzar una

OD₆₀₀ de 0.4-0.6. Se centrifugó 2 ml del medio con levadura por 10 segundos a máxima velocidad, se resuspendió el pellet en 1 ml de LiAc 100 mM y se centrifugó nuevamente por 10 segundos a máxima velocidad, se removió el sobrenadante y se resuspendió en 240 µl de PEG 50%. Posteriormente, se agregó 36 µl de LiAc 1 M, 5 µl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) precalentado a temperatura de ebullición del agua, 3 µl del plásmido linealizado (CZN1018) o normal (pDEST22) según correspondiera a la cepa y 67 µl de agua MQ. La mezcla se agitó en vortex durante un minuto y se incubó a 42°C por 40 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó 10 segundos a máxima velocidad se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 50 µl de agua MQ; se plaqueó en medio de selección SD-Ura (CZN1018) o SD-Trp (pDEST22) y se incubó por 2 días a 30°C.

Una vez que se transformó la levadura, se aislaron 10 colonias individuales de cada construcción en el medio selectivo correspondiente.

Las colonias con los fragmentos promotores en CZN1018 fueron evaluadas bajo un ensayo de auto-activación. Cada fragmento está clonado río arriba del gen *AbA'*, gen que confiere resistencia al antibiótico Aureobasidina A (AbA), si el sitio en donde se incorporó el plásmido es muy activo o el fragmento incorporado en sí mismo tiene una alta interacción con los componentes propios de la levadura puede que la resistencia a AbA se active automáticamente generando falsos positivos. Debido a esto, fue necesario llevar a cabo el ensayo de auto-activación donde se estandarizó la concentración de AbA para cada construcción.

Para el ensayo de auto-activación fueron seleccionadas siete colonias independientes de cada construcción en medio SD-Ura con diferentes concentraciones de AbA. Se utilizaron las concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ng/ml. Una vez sembradas, se incubaron a 30°C por 5 días y se monitoreó su crecimiento. La concentración utilizada en el ensayo Y1H para cada construcción fue la mínima en la que las colonias presentaron crecimiento nulo o casi nulo. Finalmente, 3 colonias fueron seleccionadas para llevar a cabo el experimento, considerando cada colonia como una réplica biológica.

5.4.1. Ensayo de un híbrido en levadura para la detección de interacciones ADN-proteína.

Se realizó la cruce (‘mating’ en inglés) de las levaduras que contenían los diferentes fragmentos de la región promotora de *SPT* (en cepa PJ69-4 α) con las que contenían la colección de clonas AD del laboratorio (Herrera-Ubaldo *et al.*, no publicado). Como primer paso de este procedimiento, se realizó el inóculo de las colonias a utilizar en medio SD sólido –Ura para los fragmentos promotores *pSPT-A* y *pSPT-B* y medio SD –Trp para los AD de la colección y se incubaron durante toda la noche a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo, cada colonia de AD se colocó en medio rico YPAD sólido utilizando un replicador y sobre el mismo inóculo se colocó cada una de las colonias correspondientes a las 3 réplicas biológicas. Se incubó a 30°C por 24 h y cada nueva colonia producto de la cruce se resembró en medio selectivo SD –Ura y –Trp para seleccionar colonias de levaduras diploides, es decir, seleccionar las levaduras que tenían los fragmentos correspondientes del promotor y el AD.

Una vez que se obtuvieron las colonias diploides, se sembraron en medio selectivo SD –Ura, -Trp con la concentración necesaria de AbA para cada fragmento promotor (100 ng/ml para el fragmento *pSPT-A* y 300 ng/ml para el fragmento *pSPT-B*) y se incubaron a 30°C por 5 días. Como control positivo se utilizó una cepa diploide que contenía la región promotora del gen *ISOPENTENIL TRANSFERASA 6* (obtenido en trabajos recientes en este laboratorio por el M.C. Vincent Cerbantez) y AD el factor de transcripción *SHOOT MERISTEMLESS* fusionado al dominio de activación (AD por sus siglas en inglés). Las colonias con crecimiento óptimo en presencia de AbA, indicaron interacción positiva.

5.5. Análisis del patrón de expresión en línea marcadora *pSPT-GFP*

5.5.1. Tratamientos exógenos de citocininas y auxinas

Se aplicó un tratamiento exógeno de fitohormonas de la siguiente manera: Para el primer tratamiento, inflorescencias de 7 días después del inicio de la floración de la línea marcadora *pSPT::GFP* fueron empapadas por goteo con una solución de BAP o IAA, ambas a una concentración de 100 μ M (Marsch-Martínez *et al.*, 2012). 4 hrs después de la aplicación, las inflorescencias fueron disectadas para obtener el meristemo de inflorescencia y meristemas florales en etapa 1 a 5. Cada muestra disectada de meristemas de inflorescencia y meristemas florales fue colocada en una solución de yoduro de propilo (IP) 1 μ g/ml durante 1 minuto y después colocados en un recipiente rectangular (30 mm x 56 mm x 22 mm) con agarosa al 1% hasta la mitad y sumergidos en agua destilada para su observación. Las imágenes fueron obtenidas por medio de un microscopio confocal Zeiss LSM800, los parámetros de excitación y emisión para GFP e IP fueron 488/500-550 y 488/620-680 respectivamente, las imágenes de un plano fueron tomadas en el máximo de intensidad observado y las reconstrucciones 3D se obtuvieron a partir de la suma de imágenes obtenidas por “*Z-stack*”.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis de la región promotora de SPT

A pesar de que se han descrito funciones para el gen *SPATULA* en distintas partes de la planta, actualmente se sabe poco acerca de los factores de transcripción que regulan a este gen. Por esta razón, en este trabajo se decidió identificar qué factores de transcripción se unen a la región promotora del gen *SPT*.

Como primer paso, se realizó un análisis *in silico* de la región promotora de *SPT* en el sitio web: AthaMap. Esta es una página que mediante su herramienta “Gene Analysis” proporciona un mapa de potenciales sitios de unión a factores de transcripción (FTs) en *Arabidopsis thaliana*. Dichos datos se basan en sitios de unión a factores de transcripción publicados como matrices de alineación o determinados experimentalmente. El análisis en esta base de datos para la región promotora de *SPT* desde +45 a -2000 pb arrojó una predicción de 477 sitios de unión a factores de transcripción (secuencias únicas) correspondientes a 24 familias (Figura 12).

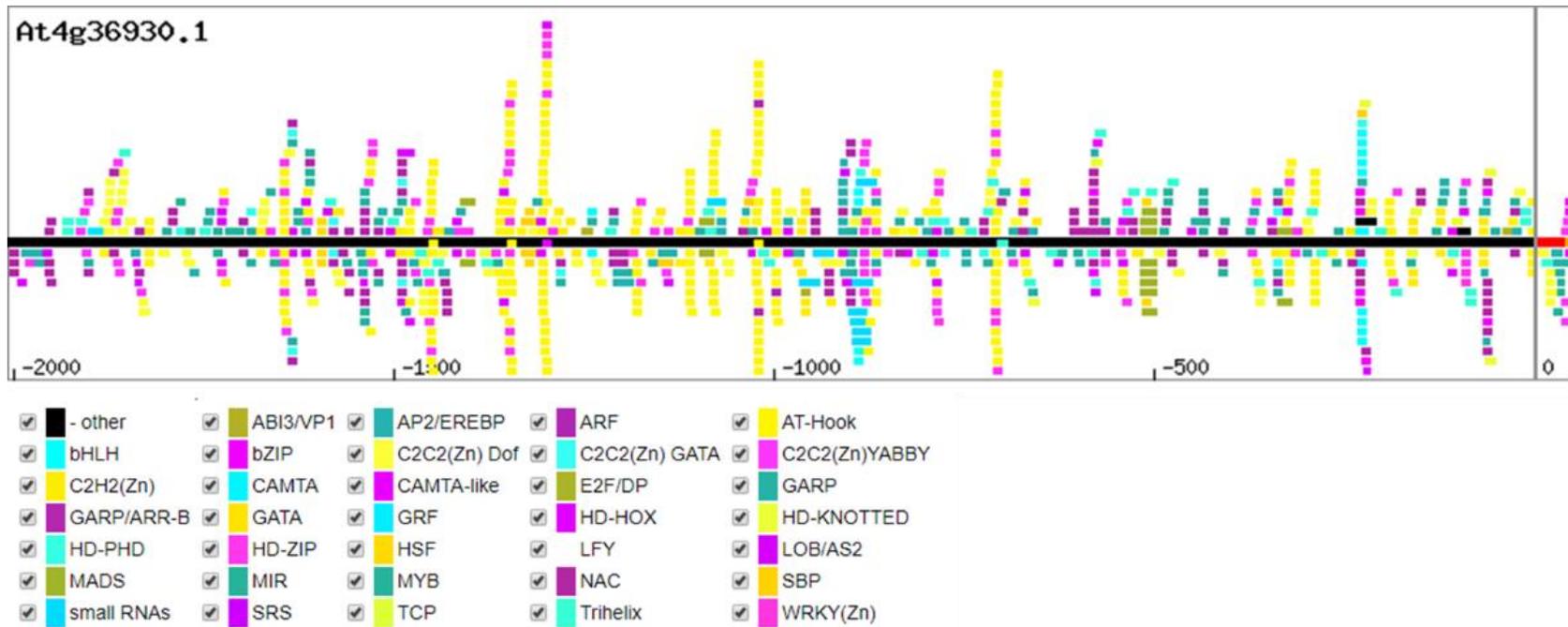


Figura 12. Predicción de sitios de unión en la región promotora de *SPT* desde -45 a -2000 pb. El análisis mostró la predicción 477 sitios de unión.

Para cada familia, se obtuvo la predicción de al menos un sitio de unión (Tabla 2). De la cantidad total de sitios de unión encontrados casi una tercera parte (28%) corresponde a sitios de unión AT-Hook.

Tabla 2. Número de sitios de unión correspondientes a cada familia de factores de transcripción.

CANT.	Familia o motivo	CANT.	Familia o motivo	CANT.	Familia o motivo
262	AT-Hook	42	C2H2(Zn)	8	HSF
67	C2C2(Zn) Dof	41	Trihelix	6	LOB/AS2
63	C2C2(Zn)YABBY	32	GARP	5	SBP
60	NAC	17	bHLH	5	HD-PHD
54	GARP/ARR-B	14	MADS	3	ABI3/VP1
52	MYB	13	bZIP	3	other
52	AP2/EREBP	12	C2C2(Zn) GATA	1	MIR2933
47	HD-ZIP	10	HD-KNOTTED	1	LFY
46	HD-HOX	9	small RNAs		

Estos sitios de unión corresponden a 83 factores de transcripción y algunos ARNs pequeños (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de transcripción obtenidos de la predicción en AthaMap.

AG	AtMYB61	KAN1	REM1
AGL1	AtSPL3	LBD16	RRTF1
AGL2	AtSPL8	LFY	RVE1
AGL3	bZIP60	MIR2933A/B	smallRNA
AGL15	bZIP_DOE	MYB46	SPL7
AHL12	CBF	MYB52	TaNAC69
AHL20	CCA1	MYB55	TEIL
AHL25	DAG2	MYB83	TGA1a
ALFIN1	DEAR3	MYB98	TGA2
ANAC46	DOF2	MYC2	TOE1
ANAC55	DOF5.7	MYC3	TOE2
ANAC58	GAMYB	MYC4	TSS
ARF1	GATA12	ERF2	WOX13
ARR11	GLK1	YAB1	YAB5
ARR14	GT1	ZAT18	ZAT6
At4g35610	ZAT14	ZAT2	
ATGT2L	HSFB2a	PIF4	
ATHB1	HSFC1	PIF5	

ATHB12	HVH21	RAP2.3	
ATHB51	ICU4	RAP2.6	
AtLEC2	ID1	RAV1	

Estos análisis muestran una variedad de factores de transcripción correspondientes a diversas familias, esto sugiere que diversos factores de transcripción podrían estar involucrados en la regulación de *SPT*.

5.2 Análisis de conservación en miembros de la *Brassicaceae*

Una vez identificados los sitios de unión a FTs en la región promotora de *SPT* en *Arabidopsis*, se realizó un análisis para identificar las regiones conservadas en los promotores de los genes ortólogos de *SPT* en especies filogenéticamente cercanas a *Arabidopsis thaliana*. El análisis se realizó con el programa VISTA, se incluyó las siguientes especies: *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis halleri*, *Boechera stricta*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica rapa*, *Capsella rubella*, *Capsella grandiflora* y *Eutrema salsugineum*. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos de Phytozome. El programa arrojó la siguiente relación filogenética con base en el análisis de sus promotores (Figura 13B), la cual difiere de la relación filogenética si se tomara de referencia la secuencia del gen (Figura 13A).

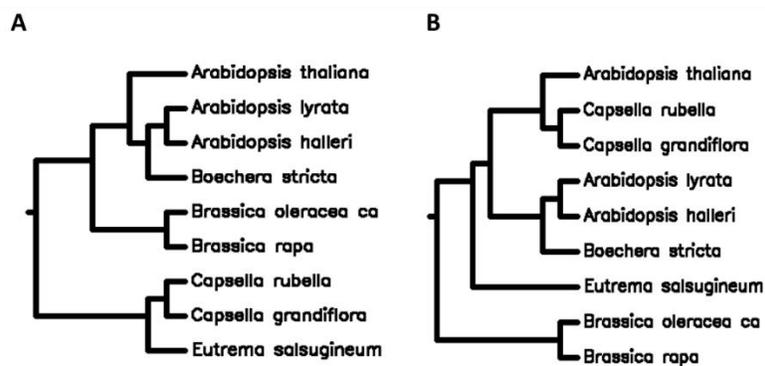


Figura 13. Relación filogenética de gen *SPT* y región promotora de *Arabidopsis thaliana* y otras especies. (A) Relación filogenética con base en la secuencia del gen *SPT*. (B) Relación filogenética con base en la secuencia promotora del gen *SPT* en diversas especies.

El análisis de las regiones promotoras en mVISTA dio como resultado el siguiente diagrama de conservación (Figura 14).

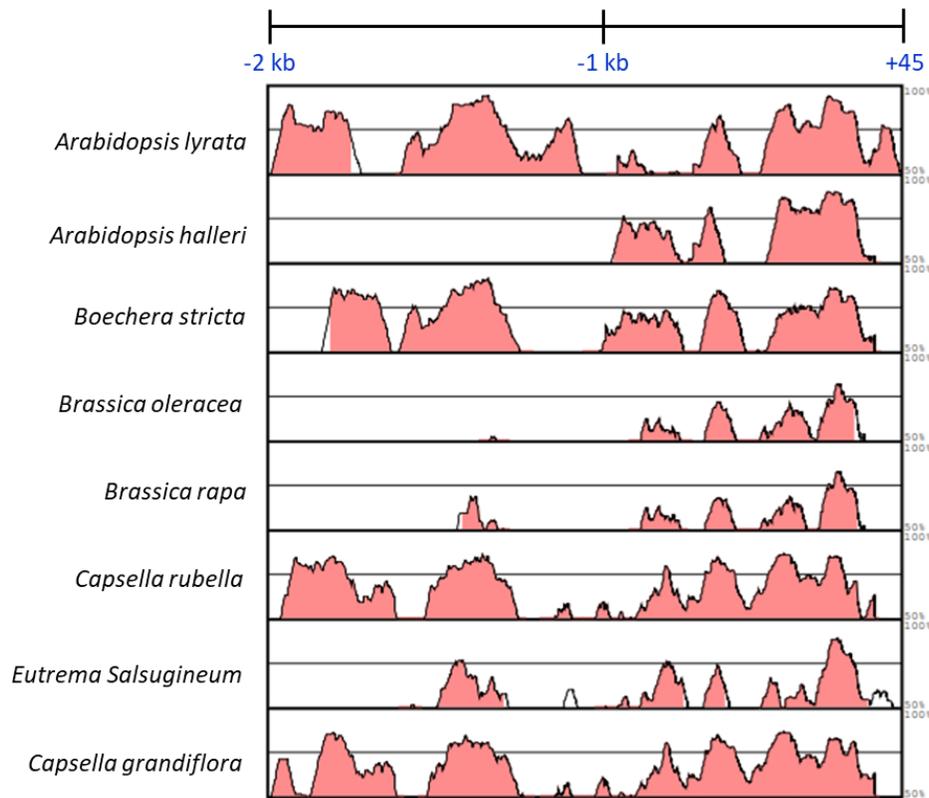


Figura 14. Regiones conservadas en las secuencias promotoras de los ortólogos de *SPT* en otras especies. El diagrama muestra las regiones conservadas en las secuencias promotoras con un 50% de conservación o más.

La Figura 14 muestra las regiones conservadas de cada especie tomando como referencia la secuencia promotora desde -1 hasta -2000 pb de *Arabidopsis thaliana*. En todas las especies se encontró al menos una región conservada pero claramente la región de los 1000 pb cercanos al inicio de la transcripción muestra un mayor número de zonas conservadas, esto muestra un indicio de que en esta zona cercana al inicio de la transcripción podrían encontrarse una mayor cantidad de elementos regulatorios importantes.

De cada región conservada se obtuvo su secuencia para el análisis de sitios de unión para factores de transcripción en PlantRegMap. Para el análisis de conservación se delimitaron 3 zonas (Figura 15).

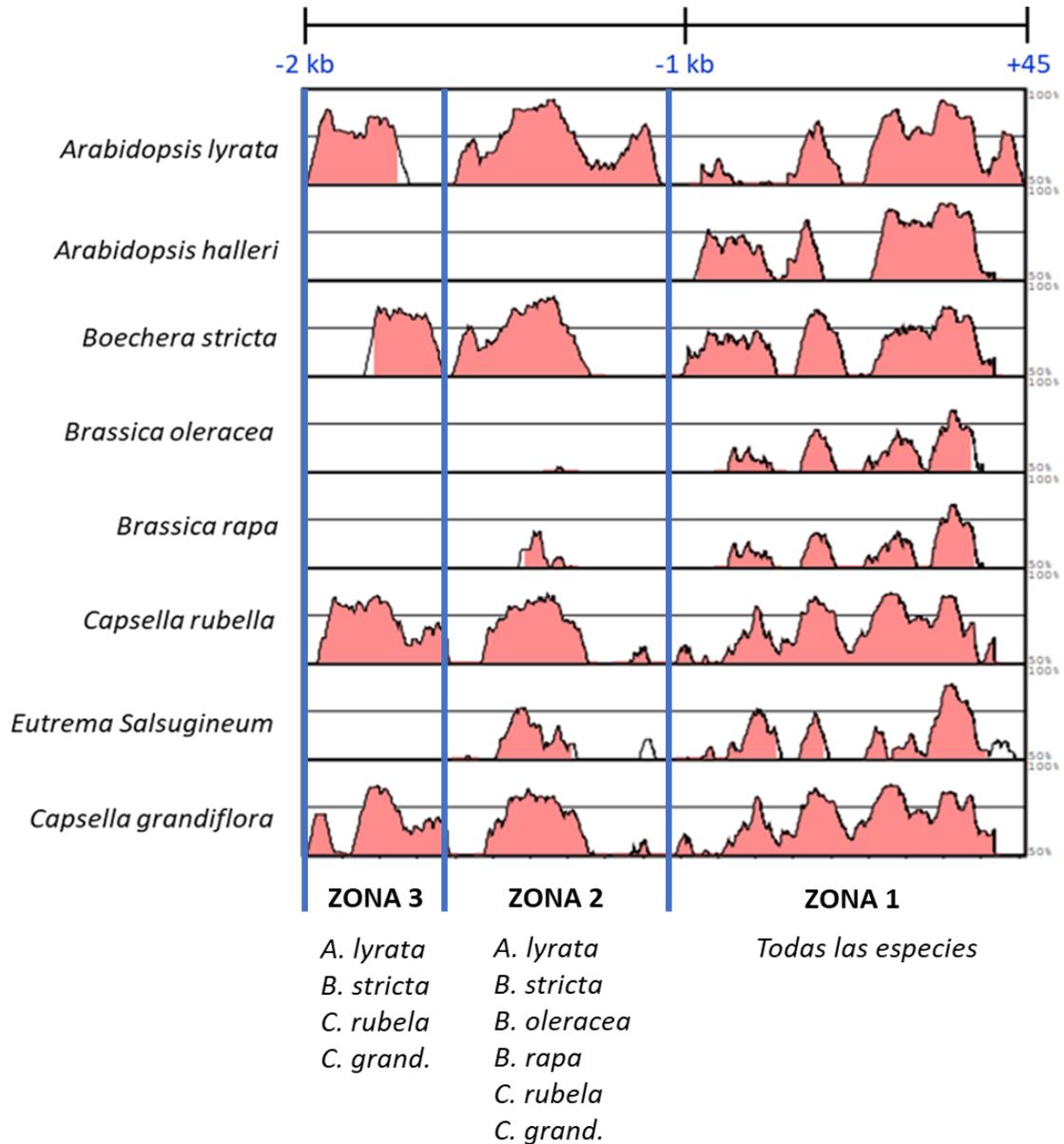


Figura 15. Delimitación de zonas para el análisis de conservación. La zona 3 incluye las secuencias de regiones conservadas correspondientes a *A. lyrata*, *B. stricta*, *C. rubela* y *C. grandiflora*. La zona 3 corresponde a la secuencia de las regiones conservadas correspondientes a *A. lyrata*, *B. stricta*, *B. oleracea*, *B. rapa*, *C. rubela* y *C. grandiflora*. En la zona 1 se encuentran secuencias de regiones conservadas correspondientes a todas las especies incluidas en este análisis.

En la Tabla 4 se muestran las familias a las que corresponden los sitios de unión de los factores de transcripción encontrados en estas regiones conservadas de cada especie.

Tabla 4. Familias de factores de transcripción con sitios de unión en las regiones conservadas de cada especie.

		At	Al	Ah	Bs	Bo	Br	Cr	Es	Cg	Total
ZONA 3	C2H2	10	3	-	9	-	-	7	-	7	36
ZONA 2	AP2	2	-	-	1	-	1	3	-	3	10
ZONA 1	B3	16	11	3	1	8	5	4	9	4	61
	BES1	66	9	1	1	9	9	8	10	8	121
	bHLH	44	49	33	32	36	40	46	52	46	378
	bZIP	6	6	2	6	6	6	7	7	7	53
	C2H2	15	14	8	6	3	2	4	5	4	61
	DOF	10	17	8	5	2	2	2	1	2	49
	ERF	1	15	3	5	6	1	2	19	2	54
	FAR1	4	4	2	2	4	4	5	5	5	35
	MYB	5	5	4	1	1	3	1	4	1	25
	Trihelix	3	2	1	1	4	1	2	3	2	19

- *Arabidopsis thaliana* (At), *Arabidopsis lyrata* (Al), *Arabidopsis halleri* (Ah), *Boechera stricta* (Bs), *Brassica oleracea capitata* (Bo), *Brassica rapa* (Br), *Capsella rubella* (Cr), *Capsella grandiflora* (Cg) y *Eutrema salsugineum* (Es).

Como se esperaba del análisis de conservación, en la zona 1, que corresponde a las regiones más cercanas al inicio de la transcripción (1000 pb río arriba) se encontró un mayor número de motivos de unión a ADN correspondientes a diversas familias, esto sugiere que en esta zona podrían estar uniéndose un mayor número de factores de transcripción necesarios para la regulación de *SPT*.

Por otro lado, se observa que la familia bHLH tiene la mayor representación en estos resultados. El análisis de conservación realizado para esta familia en cada especie muestra 3 tipos de cajas conservadas en los sitios de unión correspondientes a los factores de transcripción (Tabla 5).

Tabla 5. Cajas conservadas correspondientes a los motivos de unión de los factores de transcripción de la familia bHLH en todas las especies. Se muestra en número de veces que se repite cada caja en los motivos de unión correspondientes a la familia bHLH.

	At	Al	Ah	Bs	Bo	Br	Cr	Es	Cg
CACGTG	13	13	12	13	12	13	13	12	13
CGCGTG	2	3	3	0	2	2	2	3	2
CACGCG	2	4	3	0	1	1	2	1	2
TOTAL	17	20	18	13	15	16	17	16	17

- *Arabidopsis thaliana* (At), *Arabidopsis lyrata* (Al), *Arabidopsis halleri* (Ah), *Boechera stricta* (Bs), *Brassica oleracea capitata* (Bo), *Brassica rapa* (Br), *Capsella rubella* (Cr), *Capsella grandiflora* (Cg) y *Eutrema salsugineum* (Es).

Algunos de los sitios de unión encontrados corresponden a SPATULA (AT4G36930), para este FT en específico solo se encontraron 2 cajas diferentes en los motivos de unión de este FT (Tabla 6).

Tabla 6. Cajas conservadas en los motivos de unión de SPT en cada especie. Se muestra en número de veces que se repite cada caja en los motivos de unión correspondientes de SPT.

	At	Al	Ah	Bs	Bo	Br	Cr	Es	Cg
CACGTG	2	2	1	0	2	2	2	2	2
CGCGTG	1	1	1	2	1	1	1	1	1
TOTAL	3	3	2	2	3	3	3	3	3

- *Arabidopsis thaliana* (At), *Arabidopsis lyrata* (Al), *Arabidopsis halleri* (Ah), *Boechera stricta* (Bs), *Brassica oleracea capitata* (Bo), *Brassica rapa* (Br), *Capsella rubella* (Cr), *Capsella grandiflora* (Cg) y *Eutrema salsugineum* (Es).

La abundante presencia de sitios de unión de la familia bHLH, misma familia a la que pertenece SPT, sugiere que factores de transcripción de esta familia son importantes en su regulación, además encontrar sitios de unión que corresponden a SPT dentro su mismo promotor es indicio de una posible auto-regulación.

Otra familia con un importante número de sitios de unión en el promotor de *SPT* encontrada en este análisis de conservación es la familia BES1 ("Brassinosteroid

signaling positive regulator” por sus siglas en inglés). El análisis de conservación realizado para esta familia en cada especie muestra 3 tipos de cajas conservadas (Tabla 7).

Tabla 7. Cajas conservadas correspondientes a los motivos de unión de los factores de transcripción de la familia BES1 en todas las especies. Se muestra en número de veces que se repite cada caja en los motivos de unión correspondientes a factores de transcripción de la familia BES1.

	At	Al	Ah	Bs	Bo	Br	Cr	Es	Cg
CACGTG	5	6	6	5	6	6	5	6	6
CGCGTG	1	1	1	0	1	1	0	1	0
CACGCG	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TOTAL	7	8	8	6	8	8	6	8	7

- *Arabidopsis thaliana* (At), *Arabidopsis lyrata* (Al), *Arabidopsis halleri* (Ah), *Boechera stricta* (Bs), *Brassica oleracea capitata* (Bo), *Brassica rapa* (Br), *Capsella rubella* (Cr), *Capsella grandiflora* (Cg) y *Eutrema salsugineum* (Es).

Estos resultados sugieren que los brasinoesteroides (BR), compuestos hormonales que actúan como reguladores del crecimiento vegetal y cuyo efecto en la regulación de *SPT* no ha sido descrita hasta ahora, podrían estar influyendo en la regulación de *SPT* a nivel transcripcional.

Dentro de los propósitos de este proyecto se encuentra elucidar cómo las auxinas podrían estar afectando la regulación transcripcional de *SPT*, los antecedentes señalan que el patrón de expresión de *SPT* es dependiente de *MONOPTEROS* (MP) en embrión de *Arabidopsis* (Möller *et al.*, 2017). MP es un factor de transcripción de la familia ARF-B (“Auxin Response Factor” por sus siglas en inglés), por ello se realizó una búsqueda manual de sitios de unión de MP en todas las secuencias promotoras de las especies incluidas en este análisis, el resultado muestra posibles sitios de unión en todos los promotores (Figura 16).

5.3. Interacción de factores de transcripción con la región promotora de *SPATULA*

5.3.1. Clonación de fragmentos de la región promotora y gen *LEAFY*

Con el fin de conocer cuáles factores de transcripción son capaces de unirse a la región promotora de *SPT* se llevó a cabo el ensayo de un híbrido en levadura. Una vez delimitada la región promotora de *SPT* que se analizó *in silico* (+45 a -2000), para el ensayo de un híbrido en levadura (Y1H) se decidió utilizar dicha región. Por motivos técnicos esta región promotora se dividió en dos fragmentos *pSPT-A* que va desde -2000 hasta -769 y *pSPT-B* que comprende de -1008 a +45. También se trabajó con el gen *LEAFY* (*LFY*) para anexarlo a la lista de FTs que se probarán en el ensayo, esto debido a que el análisis *in silico* identificó un sitio de unión para este FT en la región promotora de *SPT*. Los genes *MP* y *TOE3* no pudieron ser clonados exitosamente por problemas de amplificación y de ligación respectivamente. Los fragmentos promotores y el gen *LFY* fueron clonados de manera exitosa en el vector de entrada p-ENTR™ D-TOPO®, las bacterias transformadas mostraron resistencia al antibiótico de selección (Kanamicina) y el tamaño de los fragmentos verificados por PCR mostraron el tamaño esperado de acuerdo con el diseño de oligos (Figura 17). Además, después la secuenciación, los resultados de alineamiento en *BLAST* mostraron un porcentaje de identidad por encima del 98% en los tres casos.

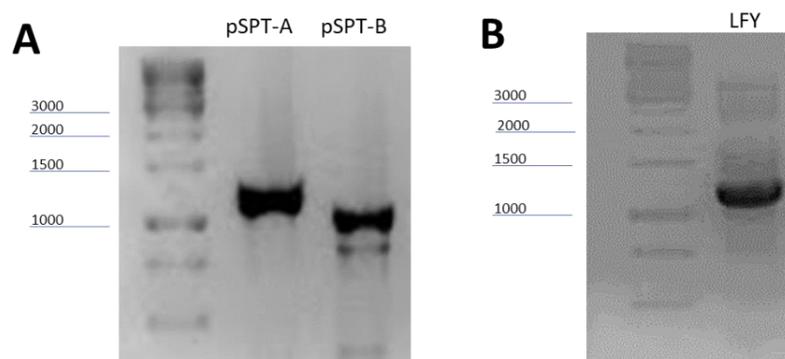


Figura 17. Bandas obtenidas al amplificar cada uno de los fragmentos promotores de *SPT* y el gen *LFY*. Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa 0.8% TBE, teñidos con bromuro de etidio. Sus tamaños en pares de bases corresponden a los esperados de acuerdo con el marcador molecular 1KbPlus: (A) *pSPT-A* 1231 pb y *pSPT-B* 1053 pb. (B) *LFY* 1263 pb.

Los vectores de expresión (CZN1018 y pDEST22 para Y1H) en la cepa de *E. coli* obtenidos luego de la recombinación, fueron corroborados por PCR de plásmido (*pSPT-A*, *pSPT-B*, *LFY*) dando el tamaño del fragmento esperado y por digestión con enzimas de restricción (*pSPT-A* y *pSPT-B*) (Figura 18). Todos mostraron la resistencia al antibiótico de selección correspondiente.

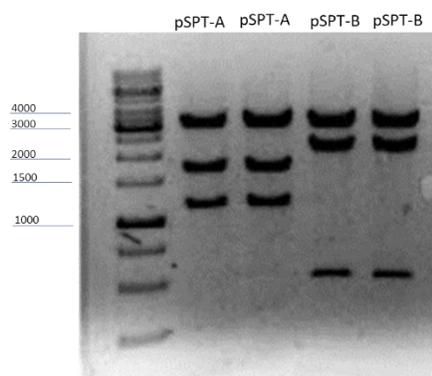


Figura 18. Bandas obtenidas después del corte con enzimas de restricción para los fragmentos promotores *pSPT-A* y *pSPT-B*. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa 0.8% TBE, teñido con bromuro de etidio. Sus tamaños en pares de bases corresponden a los esperados de acuerdo con el marcador molecular 1KbPlus: *pSPT-A* 3253 pb, 1195 pb y 2002 pb, y *pSPT-B* 3253 pb, 2210 pb y pb.

La confirmación de los fragmentos permitió continuar con la transformación de levadura para el estudio de interacción proteína-ADN.

5.3.2. Prueba de auto-activación

Una vez corroborados los fragmentos en sus respectivos vectores destino, dichos vectores fueron introducidos en levadura. Para las dos regiones promotoras de *SPT* (*pSPT-A* y *pSPT-B*) se realizó la prueba de auto-activación. Esta prueba nos permite conocer si la maquinaria endógena de la levadura es capaz de activar su sistema de transcripción sin el dominio de activación GAL4, esto con el objetivo de evitar falsos positivos al momento de probar las interacciones ADN-proteína de interés.

Diferentes concentraciones fueron probadas para 7 colonias de cada fragmento promotor (Figuras 19 y 20).

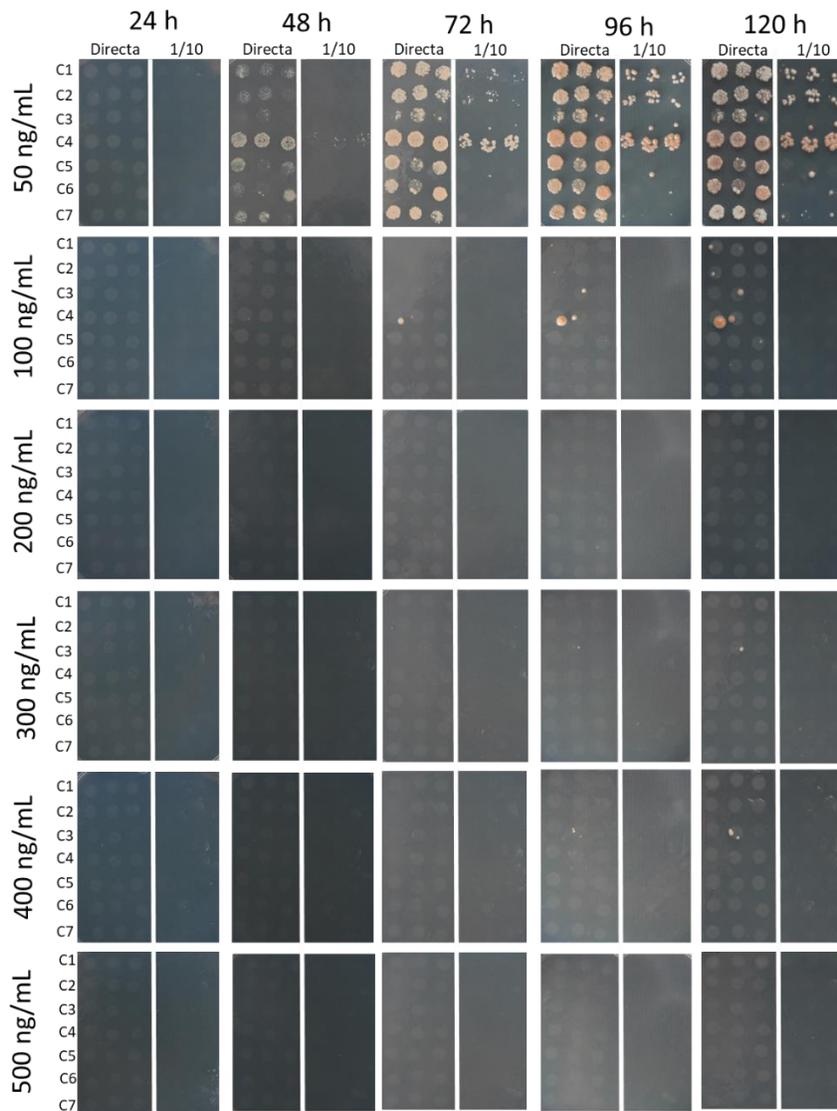


Figura 19. Esquema de auto-activación del fragmento promotor *pSPT-A*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante cinco días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA. La siembra se realizó por triplicado para la dilución directa de levadura y para la dilución 1/10 de la dilución inicial.

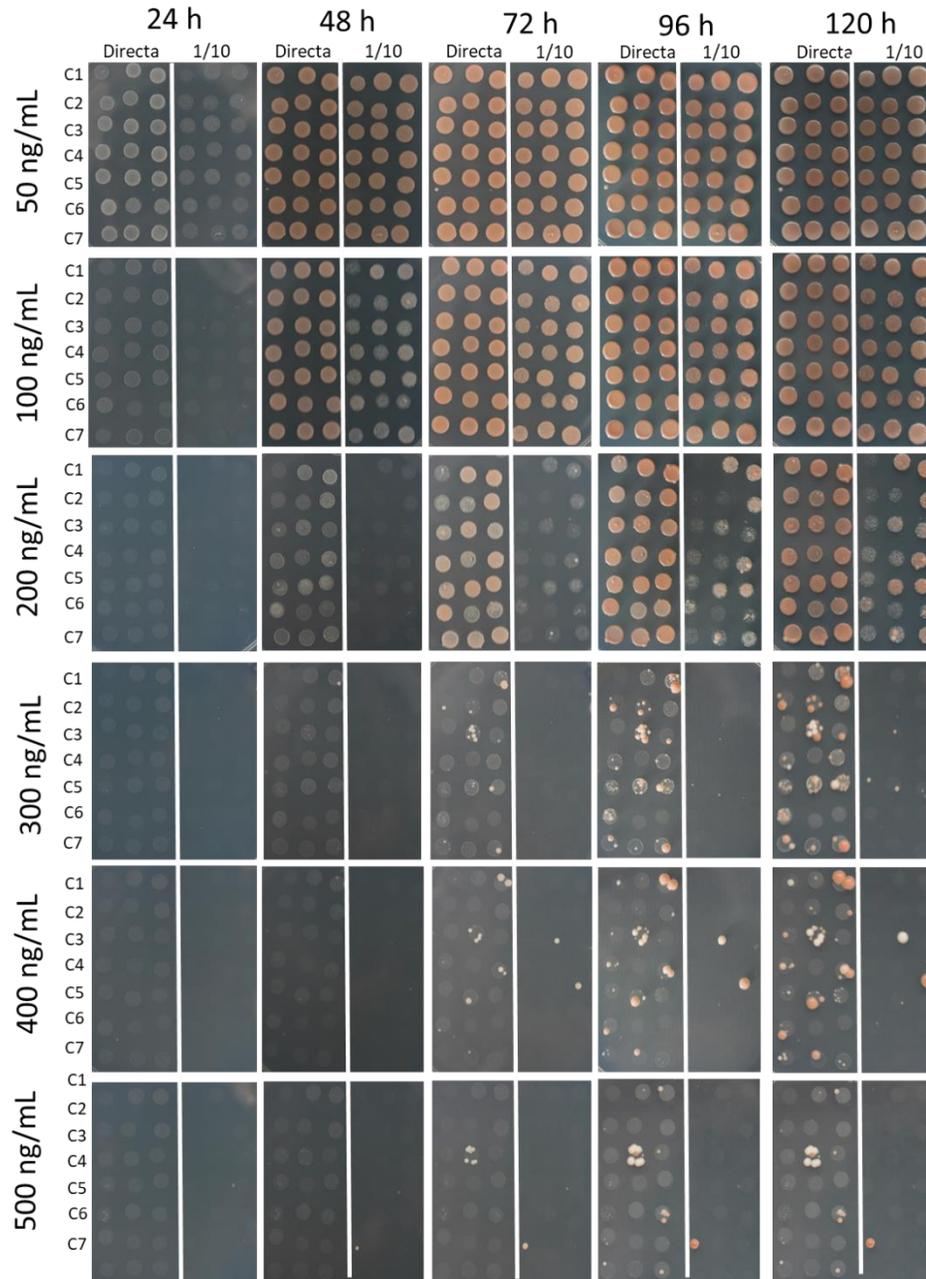


Figura 20. Esquema de auto-activación del fragmento promotor *pSPT-B*. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado durante cinco días de incubación a 30°C en seis diferentes concentraciones de AbA. La siembra se realizó por triplicado para la dilución directa de levadura y para la dilución 1/10 de la dilución inicial.

En este ensayo se observó un crecimiento diferencial de la levadura en función a la concentración de antibiótico (AbA) y el fragmento promotor presente. La autoactivación en la construcción con el fragmento promotor *pSPT-B* fue mayor, por lo que se requirió de una mayor concentración de AbA. Las réplicas biológicas mostraron poca diferencia de crecimiento entre ellas, al final fueron seleccionadas aquellas con crecimiento similar en presencia del antibiótico. En el caso el fragmento promotor *pSPT-A* la concentración determinada fue de 100 ng/ml y en el caso del fragmento promotor *pSPT-B* fue de 300 ng/ml.

Las tres colonias elegidas como replicas biológicas y la obtenida con el gen *LFY* fueron corroboradas exitosamente por PCR con ADN genómico (*pSPT-A* y *pSPT-B*) y ADN plasmídico (*LFY*), en ambos casos se obtuvo el resultado esperado (Figura 21).

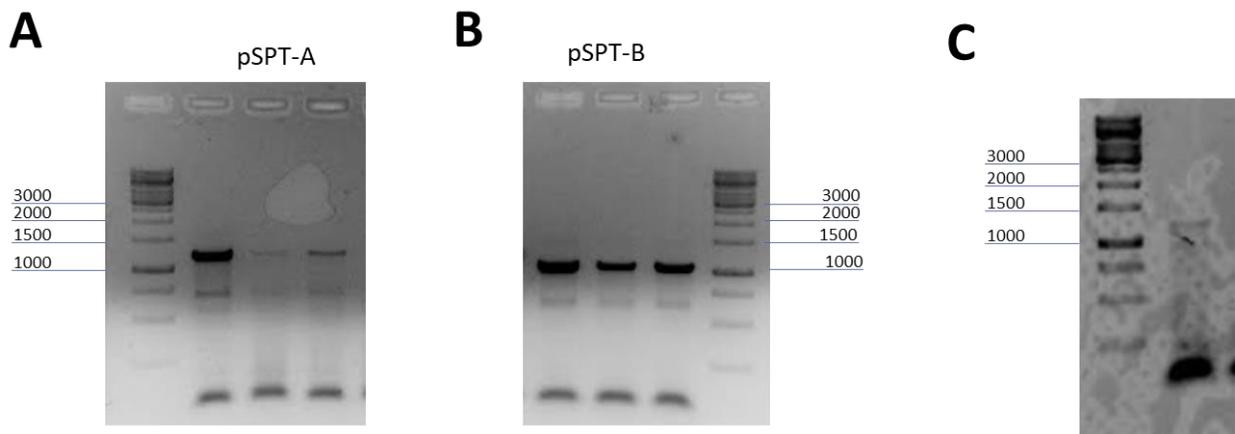


Figura 21. Bandas obtenidas al amplificar cada uno de los fragmentos promotores de *SPT* y gen *LFY*. Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa 0.8% TBE, teñidos con bromuro de etidio. Sus tamaños en pares de bases corresponden a los esperados de acuerdo con el marcador molecular 1KbPlus: (A) *pSPT-A* 1231 pb, (B) *pSPT-B* 1053 pb y (C) *LFY* 1263 pb.

La confirmación de colonias con los fragmentos promotores permitió continuar con la cruce de estas y la colección de clonas AD del laboratorio (incluido el gen *LFY*) para obtener colonias diploides y continuar con el análisis de unión ADN-proteína.

5.3.3. Ensayos de un Híbrido (Y1H)

En el ensayo de un híbrido en levadura (Y1H) para el fragmento de la región promotora *pSPT-A* se obtuvo crecimiento óptimo en presencia de AbA para diferentes factores de transcripción (Figura 22). Esto indica que el factor de transcripción evaluado (en el plásmido AD) se está uniendo a algún sitio de unión al ADN en el fragmento del promotor *pSPT-A*.

Las colonias con crecimiento óptimo en presencia de AbA en al menos 2 de las 3 réplicas biológicas en un periodo de 3 días, indicaron interacción positiva. Se evaluó un total de 74 factores de transcripción de los cuales se identificó una interacción positiva para 70 FTs con el fragmento promotor *pSPT-A*. En el Y1H con el fragmento *pSPT-B*, se obtuvo crecimiento para únicamente una combinación (Figura 23).

Los factores de transcripción con una interacción positiva para el fragmento promotor *pSPT-A* pertenecen a diferentes familias de FTs, los cuales son nombrados a continuación: familia **AP2** (*AINTEGUMENTA* [*ANT*]), familia **ARF** (*Auxin Response Factor 1* [*ARF1*], *Auxin Response Factor 17* [*ARF17*], *Auxin Response Factor 18* [*ARF18*], *Auxin Response Factor 19* [*ARF19*], *Auxin Response Factor 4* [*ARF4*], *Auxin Response Factor 8* [*ARF8*], *Auxin Response Factor 17* [*ARF17*], *Auxin Response Factor 18* [*ARF18*], *ETTIN* [*ETT*]), familia **ARR-B** (*Arabidopsis Response Regulator 10* [*ARR10*], *Arabidopsis Response Regulator 12* [*ARR12*], *Arabidopsis Response Regulator 14* [*ARR14*]), familia **ARR-A** (*Arabidopsis Response Regulator 15* [*ARR15*], *Arabidopsis Response Regulator 4* [*ARR4*]), familia **AUX/IAA** (*INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 27* [*IAA27*]), familia **B3** (*NGATHA1* [*NGA1*], *NGATHA2* [*NGA2*], *NGATHA3* [*NGA3*]), familia **bHLH** (*ALCATRAZ* [*ALC*], [*BHL14*], *HECATE1* [*HEC1*], *HECATE2* [*HEC2*], *HECATE3* [*HEC3*]), familia **C2H2** (*WIP DOMAIN PROTEIN 3* [*WIP3*], *WIP DOMAIN PROTEIN 6* [*WIP6*]), familia **ERF/AP2** (*DORNROSCHE* [*DRM*], *LEAFY PETIOLE* [*LEP*]), familia **G2LIKE** (*KANADI 1* [*KAN1*], *KANADI 2* [*KAN2*]), familia **HD-ZIP/HB** (*JAIBA C* [*JABC*], *JAIBA L* [*JABL*], *JAIBA M* [*JABM*], *PHABULOSA* [*PHB*], *PHAVOLUTA* [*PHV*]), *JAIBA* [*HAT1*]), familia **LBD** (*ASYMMETRIC LEAVES 2* [*AS2*]), familia **LFY**

(*LEAFY* [*LFY*]), familia **LUG** (*LEUNIG* [*LUG*]), familia **MADS** (*AGAMOUS* [*AG*], *AGAMOUS LIKE 14* [*AGL14*], *AGAMOUS LIKE 63* [*AGL63*], *FRUITFULL* [*FUL*], *SEPALLATA3* [*SEP3*], *SHATTERPROOF 1* [*SHP1*], *SHATTERPROOF 2* [*SHP2*], *SEEDSTICK* [*STK*]), familia **MYB** (*ASYMMETRIC LEAVES 1* [*AS1*]), familia **NAC** (*CUP-SHAPED COTYLEDON1* [*CUC1*], *CUP-SHAPED COTYLEDON2* [*CUC2*]), familia **SRS** (*STYLISH 1* [*STY1*], *STYLISH 2* [*STY2*]), familia **TALE** (*BELL1* [*BEL1*], *BREVIPEDICELLUS* [*BP*], *POUND-FOOLISH* [*PNF*], *REPLUMLESS* [*RPL*], *SHOOTMERISTEMLESS* [*STM*]), familia **TCP** (*TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF 15* [*TCP15*]), familia **WD40** (*TOPLESS* [*TPL*]), familia **WOX** (*WUSCHEL 1* [*WUS1*]), familia **YABBY** (*CRABS CLAW* [*CRC*], *YABBY1* [*YAB1*], *YABBY2* [*YAB2*], *YABBY3* [*YAB3*]) y los FTS *GIANT KILLER* (*GIK*), *NINJA* (*NIN*), (*pmWIP*), (*REM13*), (*SCR1*) y *SEUSS* (*SEU*). De estos factores de transcripción las familias NAC, MYB, AP2, LFY, YABBY, bHLH, C2H2, MADS coinciden con los resultados de la predicción de AthaMap.



Figura 22. Interacción ADN-PROTEINA del fragmento *pSPT-A*. Las colonias con crecimiento óptimo en presencia de AbA en al menos 2 de las 3 réplicas biológicas en un periodo de 3 días, indicaron interacción positiva. En color amarillo se recalcan las interacciones negativas.

En el caso del fragmento de la región promotora *pSPT-B* se obtuvo crecimiento óptimo en presencia de AbA (Figura 23) sólo para *ANT*, un factor de transcripción de la familia **AP2**.

AP2	ANT				ERF/AP2	DRN				MADS	AG				
	ARF1					LEP					AGL14				
	ARF19					G2LIKE	KAN1					AGL63			
ARF4				KAN2					FUL						
ARF	ARF8				HD-ZIP/HB	JABC				SEP3					
	ARF17					HAT1				SHP1					
	ARF18					REV				SHP2					
	ETT					JABL				STK					
ARR-A	ARR4				LBD	JABM				TCP	TCP15				
	ARR15					PHB				WD40	TPL				
ARR-B	ARR10				B3	PHV				WOX	WUS1				
	ARR12					AS2				SRS	STY1				
	ARR14					NGA1				STY2					
AUX/AA	ARR7				MYB	NGA2				YABBY	CRC				
	ARR16					NGA3					YAB1				
	IAA27					AS1					YAB3				
bHLH	ALC				NAC	CUC1				OTRO	GIK				
	BHL14					CUC2					NIN				
	HEC1					TALE	BEL1					pmWIP			
	HEC2						BP					REM13			
HEC3				PNF					SCR1						
C2H2	WIP3				ERF/AP2	RPL				BEE1					
	WIP6					LEP				SEU					
BZIP	ZIP30				ERF/AP2	KNAT2				MADS	AG				
LFY	LFY					KNAT6									

Figura 23. Interacción ADN-PROTEINA del fragmento *pSPT-B*. Las colonias con crecimiento óptimo en presencia de AbA en al menos 2 de las 3 réplicas biológicas en un periodo de 3 días, indicaron interacción positiva. Se resalta en amarillo las interacciones negativas.

La obtención de crecimiento en una gran variedad de familias y factores de transcripción para el fragmento promotor *pSPT-A*, demuestra lo que el análisis de predicción especulaba: múltiples factores de transcripción se unen a la región promotora de *SPT* y podrían estar regulando su expresión a nivel transcripcional, estos resultados permiten establecer bases para un posterior análisis más detallado acerca de cómo se está llevando a cabo este proceso de regulación y si estos factores de transcripción reprimen o inducen la expresión de *SPT*. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba de acuerdo a lo obtenido en el análisis de conservación, el mayor número de interacciones positivas se observó en el fragmento promotor más lejano al inicio de la transcripción *pSPT-A* que va desde -2000 hasta -769, esto no descarta que existan otros factores de transcripción no incluidos en este análisis que podrían unirse a la región más cercana al inicio de la transcripción correspondiente al fragmento promotor *pSPT-B* que comprende de -1008 a +45.

5.4. Cambios en el patrón de expresión de *SPATULA* en tratamientos exógenos de citocininas y auxinas

La regulación transcripcional de un determinado gen depende de muchos factores, uno de estos factores son las hormonas. Para el caso particular de *SPT*, además, de los FTs, en el laboratorio estamos interesados en estudiar si las hormonas citocininas y auxinas son capaces de modular su transcripción.

Lo primero que se realizó fue la caracterización del patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* para corroborar su patrón de expresión en meristemo floral, meristemo de inflorescencia y gineceo (Figura 24).

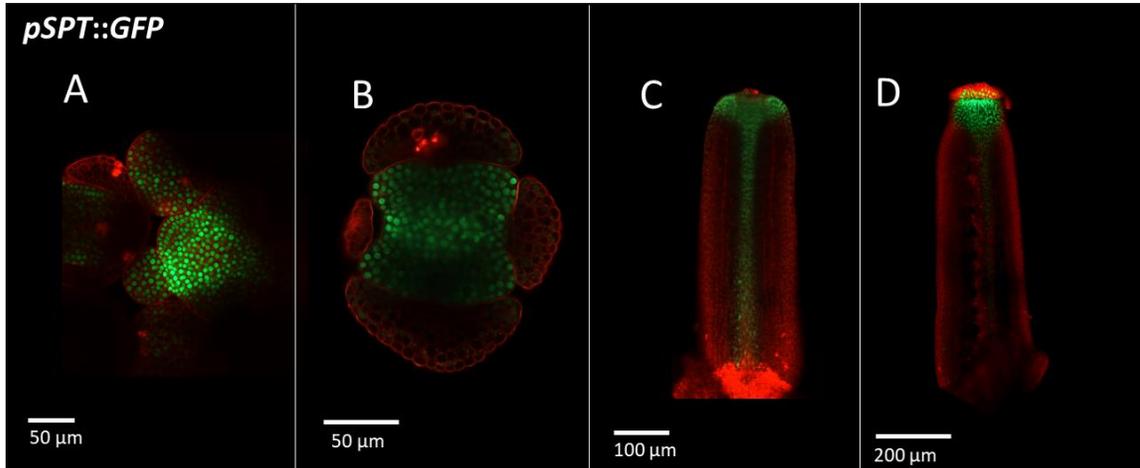


Figura 24. Patrón de expresión en línea marcadora *pSPT::GFP*. Se observa el patrón de expresión esperado en (A) meristemo floral, (B) meristemo de inflorescencia, (C) tracto de transmisión en gineceo y (D) estilo.

Posteriormente, se realizó la aplicación exógena de citocininas (BAP) y auxinas (IAA) a una concentración de 100 μ M para ambas hormonas. Su posible efecto fue analizado 4 y 48 hrs después del tratamiento. A las 4 hrs, no se observó diferencia significativa en el patrón de expresión (lugar e intensidad) del promotor de *SPT* en meristemas florales (Figura 25).

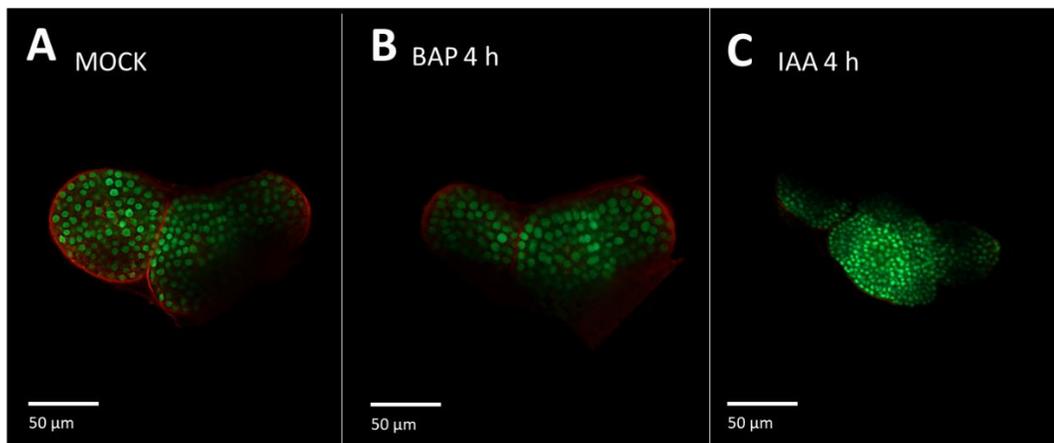


Figura 25. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas. Se muestran meristemas de inflorescencia con aplicación exógena de BAP, IAA y control, las imágenes han sido obtenidas 4 h después de la aplicación. (A) Meristemo de

inflorescencia con tratamiento control. (B) Meristemo de inflorescencia con aplicación de 100 μM BAP. (C) Meristemo de inflorescencia con aplicación de 100 μM IAA.

En la observación de los mismos tratamientos para meristemos florales se obtuvieron resultados similares. No se observa diferencia significativa en el patrón de expresión tanto en intensidad como en lugar (Figura 26).

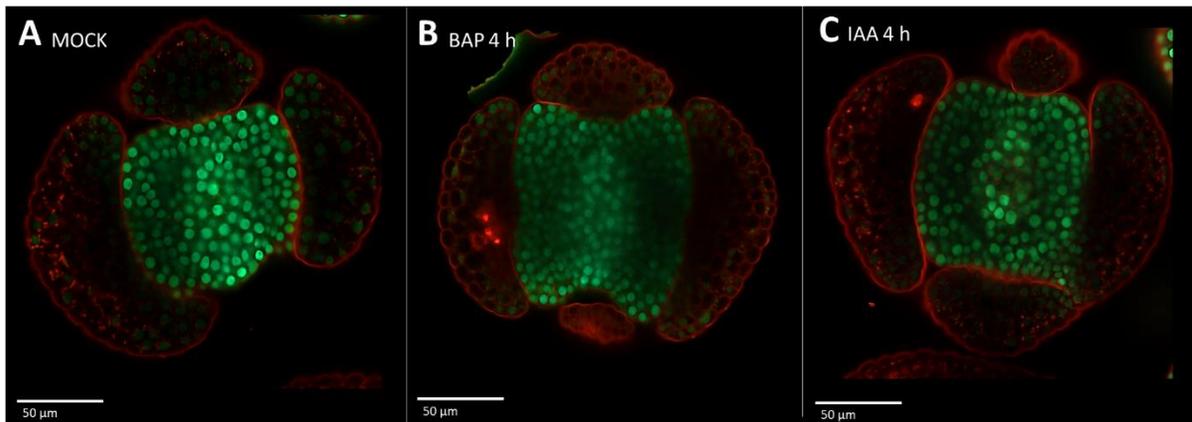


Figura 26. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas. Se muestran meristemos florales con aplicación exógena de BAP, IAA y control, las imágenes han sido obtenidas 4 h después de la aplicación. (A) Meristemo floral con tratamiento control. (B) Meristemo floral con aplicación de 100 μM BAP. (C) Meristemo floral con aplicación de 100 μM IAA.

De igual manera, después de 48 h de los tratamientos de citocininas y auxinas, no se observó diferencia significativa en el patrón de expresión (lugar e intensidad) del promotor de *SPT* en meristemos de inflorescencia (Figura 27).

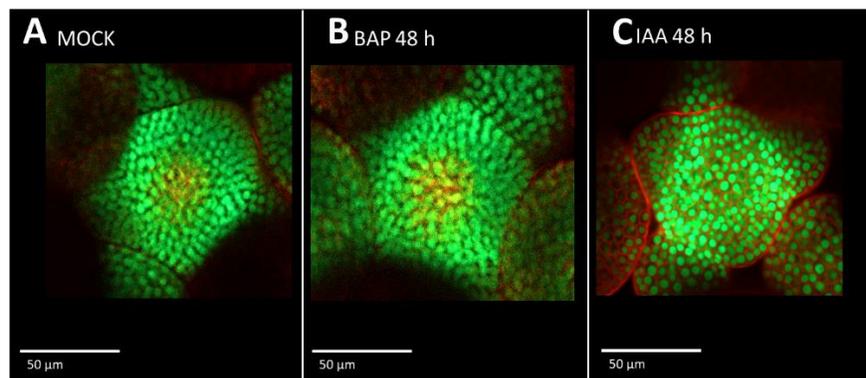


Figura 27. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas. Se muestran botones florales con aplicación exógena de BAP, IAA y control, las imágenes han sido obtenidas en el tratamiento prolongado de 48 h con dos aplicaciones. (A) Meristemo de inflorescencia con tratamiento control. (B) Meristemo de inflorescencia con aplicación de BAP. (C) Meristemo de inflorescencia con aplicación de IAA.

Por otro lado, para este mismo tratamiento, en botones florales entre las etapas 6 y 7, se observó un cambio en la intensidad de señal GFP. Ambos tratamientos hormonales (BAP e IAA) muestran un aumento de la intensidad de la señal en la región donde se está desarrollando el gineceo (Figura 28). Estas diferencias se observan con respecto al control pero no entre tratamientos.

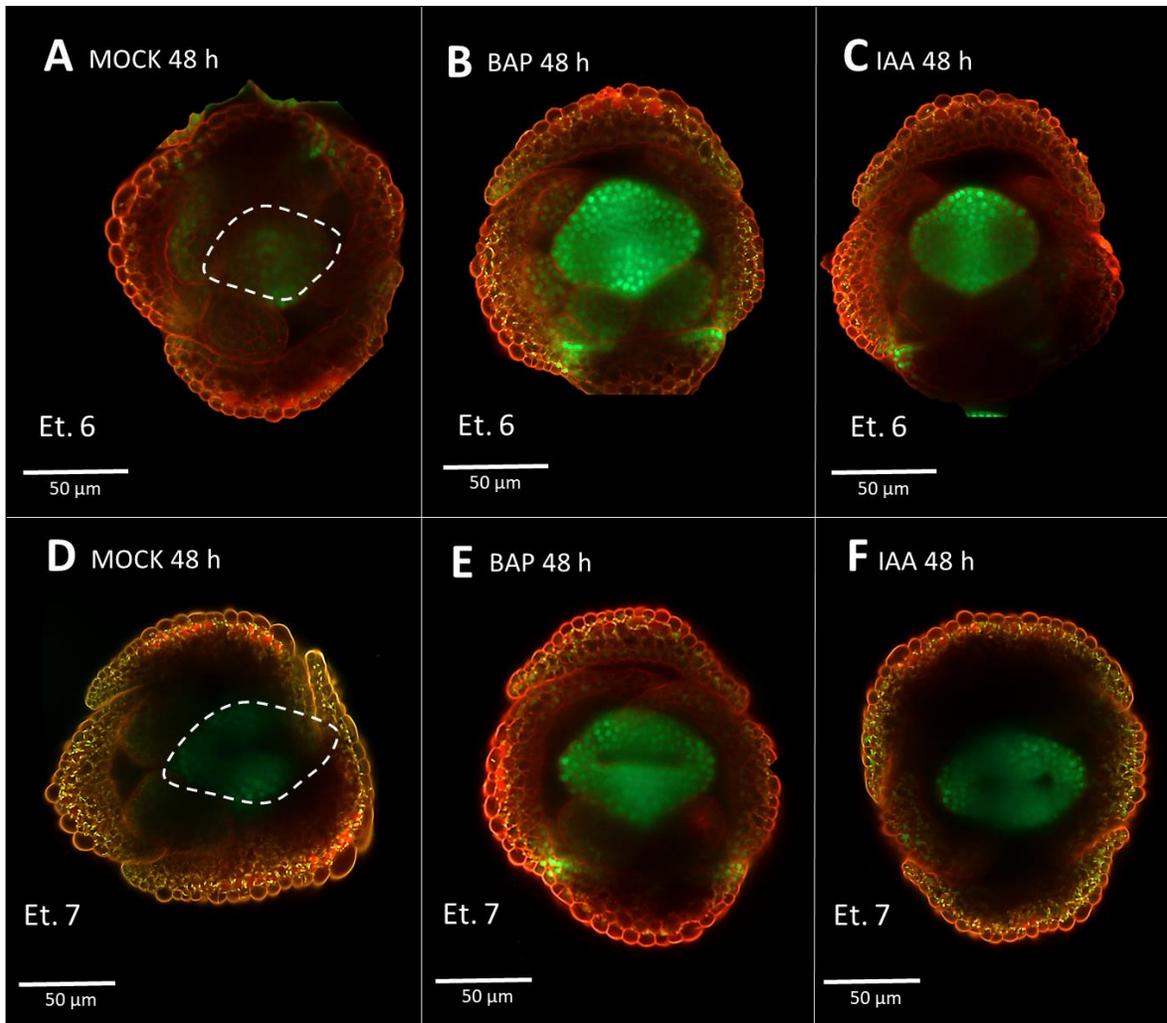


Figura 28. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas. Se muestran botones florales en etapa 6 y 7 (Et. 6 y Et. 7) con aplicación exógena de BAP, IAA y control, las imágenes han sido obtenidas en el tratamiento prolongado de 48 h con dos aplicaciones. (A) Botón florales en etapa 6 con tratamiento control. (B) Botón floral en etapa 6

con aplicación de BAP (C) Botón floral etapa 6 con aplicación de IAA. (D) Botón florales en etapa 7 con tratamiento control. (E) Botón floral en etapa 7 con aplicación de BAP (F) Botón floral etapa 7 con aplicación de IAA.

En el análisis 3D de botones florales bajo tratamiento prolongado de hormonas (Figura 29), también se observaron cambios con respecto al control, las reconstrucciones obtenidas por herramienta “z-stack” en el microscopio confocal muestran diferencia de intensidad entre tratamientos y con respecto al control.

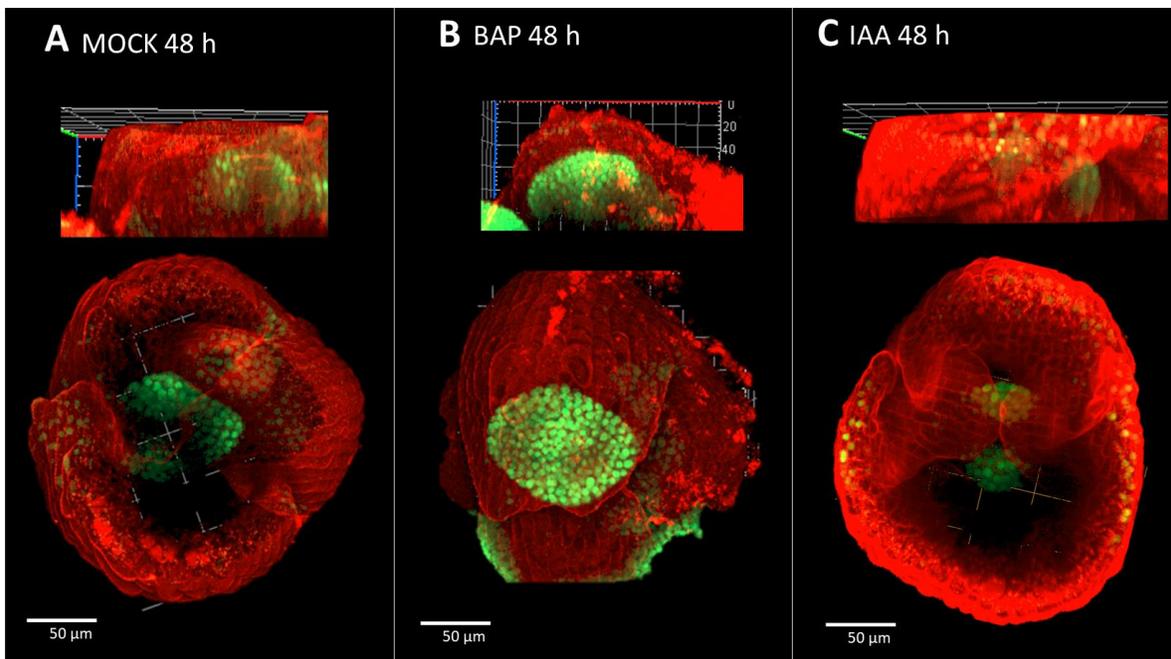


Figura 29. Patrón de expresión de la línea marcadora *pSPT::GFP* bajo tratamiento exógeno de hormonas en reconstrucción 3D. Se muestran botones florales con aplicación exógena de BAP, IAA y control, las imágenes han sido obtenidas en el tratamiento prolongado de 48 h con dos aplicaciones. (A) Botón floral con tratamiento control. (A) Botón floral con aplicación de BAP. (C) Botón floral con aplicación de IAA.

Los resultados obtenidos sugieren que el patrón de expresión de *SPT* es afectado por la aplicación de tratamientos hormonales en tiempos prolongados, auxinas y citocininas modifican la intensidad del patrón de expresión en un tiempo de 48 h, las imágenes 2D muestran que ambas hormonas, de forma similar, inducen la

expresión de *SPT* en la región donde se desarrolla el gineceo, sin embargo en la reconstrucción 3D de botones florales, realizado con 79 fotos para cada botón y 2 botones de diferentes plantas analizados por tratamiento, si se observa una diferencia entre el tratamiento de citocininas y el tratamiento de auxinas, esta diferencia podría deberse a un cambio en la profundidad del patrón de expresión de *SPT* a lo largo de la región longitudinal del gineceo para cada hormona, que al ser procesada por el programa de análisis del confocal y hacer la reconstrucción por medio de la suma de imágenes resulta en una diferencia de intensidad perceptible en la reconstrucción 3D pero no en las imágenes 2D.

6. DISCUSIÓN

6.1 Análisis *in silico* de la región promotora de *SPT*

Hasta el momento se conoce poco acerca de la regulación genética de *SPT* a nivel transcripcional por lo que en este trabajo se decidió identificar qué factores de transcripción se unen a la región promotora del gen *SPT*. Se sabe que la regulación de la expresión génica en plantas implica la coordinación de múltiples proteínas (regulación combinatoria). Esta regulación implica la unión de factores de transcripción a elementos de ADN localizados en regiones promotoras (Reményi *et al.*, 2004).

El análisis *in silico* realizado en este trabajo, mostró la presencia de potenciales sitios de unión de factores de transcripción de una gran variedad de familias en la región promotora de *SPT*. En otros organismos eucariotas se ha demostrado que los genes que muestran múltiples sitios de unión en su promotor exhiben un patrón de expresión más variable. Además, el número de sitios de unión que aparecen en el promotor de un gen puede servir como una medida plausible del grado de regulación combinatoria (Bilu y Barkai, 2013). De esta manera los datos *in silico* sugieren que en la regulación transcripcional de *SPT* intervienen diversos factores de transcripción. Además, dicha regulación podría depender de la acción combinatoria de diferentes factores de transcripción dependiendo del tejido y/o etapa de desarrollo.

6.2 Conservación de regiones promotoras en miembros de la familia *Brassicaceae*

El análisis filogenético del gen *SPT* y sus ortólogos en otras especies, así como el de sus respectivas regiones promotoras, mostró una discrepancia en cuanto a cercanía de especies si se toma en cuenta el gen o sus regiones promotoras.

La familia *Brassicaceae* está marcada por la poliploidización recurrente, variación en el tamaño del genoma, variabilidad en el historial de vida / sistema de reproducción, y una gran disparidad en hábitat y ecología (Windsor *et al.*, 2006). La secuencia de un gen que cumple la misma función suele conservarse entre especies cercanas (Beltrán-Porter *et al.*, 2003). Sin embargo, la secuencia de la región promotora de un gen puede sufrir modificaciones durante eventos evolutivos para adaptar los elementos regulatorios a nuevas conformaciones de la cromatina (Windsor *et al.*, 2006), esto podría explicar la discrepancia observada en este análisis para la secuencia de los genes o sus promotores.

La conservación de regiones promotoras puede indicar la conservación de elementos regulatorios (Groszmann *et al.*, 2010). En este estudio se encontraron diversas regiones conservadas para 9 miembros de la familia *Brassicaceae* (incluyendo a *Arabidopsis thaliana*). La región promotora analizada para todas las especies fue de -1 a -2000 pb. Los sitios de unión de factores de transcripción conservados en las regiones de -1000 a -2000 pb pertenecen a las familias de dedos de zinc de tipo C2H2 y AP2. Ambas familias de factores de transcripción han sido descritas con dominios de unión a ADN (Chung *et al.*, 2002; Bateman *et al.*, 2004; Riechmann y Meyerowitz, 1998).

Además, factores de transcripción de las familias C2H2 y AP2 han mostrado expresión en tejidos como meristemo de inflorescencia, raíces, semillas, hipocótilos y cotiledones (Okamuro *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2015; Würschum *et al.*, 2006; Díaz-Manzano *et al.*, 2018). Estos datos coinciden con los estudios realizados por Groszmann a la región promotora de *SPT* donde se demostró que en la región de -1262 a -2217 pb se encuentran elementos que afectan el patrón de expresión de *SPT* durante el desarrollo del hipocótilo y cotiledones, así como silenciadores tejido-específicos del ápice del estambre (Groszmann *et al.*, 2010).

La región más cercana al inicio de la transcripción (1000 pb río arriba) tiene un mayor número de sitios de unión de FTs conservados correspondientes a 5 familias: bHLH, bZIP, BES1, C2H2 y FAR1. Las primeras -221 pb de bases de esta región han sido descritas como esenciales para el inicio de la transcripción (Groszmann *et*

al., 2010), esto podría estar relacionado a una mayor cantidad de elementos regulatorios en esta zona del promotor de *SPT*.

La mayoría de los sitios de unión encontrados en el promotor de *SPT* en las diferentes especies analizadas corresponden a la familia bHLH. Ésta familia de factores de transcripción es funcionalmente diversa, se le han descrito funciones en la biosíntesis de antocianinas, señalización fitocromática, expresión de globulinas, dehiscencia de frutos, y desarrollo de carpelos (Heim *et al.*, 2003).

En este análisis tres secuencias consenso fueron encontradas en los sitios de unión correspondientes a esta familia de FTs: CACGTG, CGCGTG, CACGCG. Éstas secuencias corresponden a variaciones de la secuencia palindrómica de hexanucleótidos CANNTG conocida como motivo E-box. La variante G-Box (CACGTG) es la secuencia más recurrente, mientras que las otras dos variaciones: CGCGTG y CACGCG en la cadena sentido y anti-sentido respectivamente son menos comunes (Heim *et al.*, 2003; Groszmann *et al.*, 2010). La conservación de estas tres variantes de E-box nos sugiere que la regulación transcripcional del gen *SPT* dependiente de FTs de la familia bHLH como *IND* (Girin *et al.*, 2011), podría estar conservada al menos en la familia de las brassicáceas. Uno de los factores de transcripción que se obtuvieron en este análisis con posibles sitios de unión de la familia bHLH es *SPT* misma, esto sugiere la existencia de una posible auto-regulación de este factor de transcripción, que hasta ahora no ha sido reportada.

Las proteínas bHLH se unen a sus sitios de reconocimiento de ADN como dímeros y la mayoría reconocen el sitio simétrico E-box (CACGTG) (Groszmann *et al.*, 2010). En el promotor de *SPT*, además de los sitios simétricos también se identificó un sitio E-box asimétrico (CGCGTG). La presencia de variantes simétricas y no simétricas del sitio E-box sugiere que *SPT* puede estar regulado por homo y/o heterodímeros de FTs de la familia bHLH (Groszmann *et al.*, 2010).

Otra familia de la que se obtuvo un número significativo de potenciales sitios de unión es la familia BES1. *BES1* desempeña un papel central en la expresión génica

regulada por la hormona BR. Se ha reportado que *BES1* es capaz de unirse a las secuencias de la E-box (CANNTG), ya sea como homodímero o heterodímero al interactuar con proteínas basic Hélix-Loop-Helix y de esta manera regula genes de respuesta a BR (Yin *et al.*, 2005). Las dos principales moléculas activas de brasinoesteroides en *Arabidopsis* son la castasterona (CS) y la brassinolida (BL). Mutaciones dobles en genes involucrados en la síntesis de brassinolida (*SEU* y *CYP85A2*) afectan el desarrollo del tejido medio y óvulos en gineceo de *Arabidopsis* (Nole-Wilson *et al.*, 2010) y los óvulos forman parte de la lista de tejidos que abarcan el patrón de expresión de *SPT*. Estos datos sugieren que *SPT* podría estar regulado por brassinosteroides, por lo que resulta interesante analizar si esta hormona es capaz de influir en su patrón de expresión.

Otro sitio de unión conservado que se encuentra presente al menos una vez en todas las especies del análisis es el sitio de unión de los FTs de la familia ARF. Se ha reportado que la función del gen *MP*, que pertenece a la familia ARF, es necesaria para la correcta expresión de *SPT*, en el embrión (Möller *et al.*, 2017). Estos datos sugieren que esta regulación de *MP* sobre *SPT*, podría ser directa y estar conservada en la familia de las brassicaceas.

6.3 Interacción de diversos factores de transcripción con la región promotora de *SPT*

El análisis *in silico* mostró que ambas regiones del promotor de *SPT* (*pSPT-A* y *pSPT-B*) contienen sitios de unión de FTs pertenecientes a diferentes familias. Sin embargo, en el ensayo de un híbrido en levadura (Y1H) se obtuvo una mayor cantidad de interacciones positivas de los factores de transcripción evaluados en el fragmento de la región promotora más lejano al inicio de la transcripción (*pSPT-A*) en comparación con el fragmento de la región más cercana (*pSPT-B*). La discrepancia entre estos dos resultados se puede deber a la diferencia en las concentraciones de antibiótico que se usaron en el ensayo. Por lo que es necesario probar las interacciones a diferentes concentraciones de antibiótico para corroborar los resultados obtenidos.

Por otro lado, AINTEGUMENTA (*ANT*) es el único factor de transcripción del que se obtuvieron interacciones positivas en ambos fragmentos. El gen *ANT* es un factor de transcripción de la familia APETALA2 en *Arabidopsis* que participa en el crecimiento de la planta mediante la activación de la señalización de auxinas. El tamaño de órganos laterales se correlaciona positivamente con la expresión de *ANT* en *Arabidopsis* (Manchado-Rojo *et al.*, 2014). Hasta ahora ninguna relación regulatoria ha sido descrita entre *ANT* y *SPT*, pero *LEUNIG* (factor de transcripción que también resulto con interacción positiva del fragmento *pSPT-A*) y *ANT* son dos reguladores críticos del desarrollo de tejido marginal del carpelo. La mutante doble *leu ant* no desarrolla placenta óvulos, septos, estigma y estilo (Liu *et al.*, 2000), tejidos donde se expresa y actúa *SPT* (Groszmann *et al.*, 2010). *ANT* muestra una fuerte interacción con la región promotora de *SPT*, sin embargo, se desconoce si esta interacción tiene algún efecto regulatorio con relevancia biológica, por lo que estudios posteriores sería necesarios.

6.4 Efecto de las hormonas auxinas y citocininas en el patrón de expresión de *SPT* en gineceo.

En etapas tempranas de desarrollo del gineceo se observó un aumento en la intensidad de señal de la línea marcadora *pSPT::GFP* después de la aplicación exógena de citocininas y auxinas en tiempos prolongados, esto indica que dichas hormonas inducen la expresión de *SPT* en gineceo. Aunque debido a que ésta inducción se observó después de 48 hrs de tratamiento, la acción regulatoria de las hormonas sobre *SPT* podría ser también de manera indirecta.

Por otro lado, en el tejido del meristemo de inflorescencia ningún tratamiento en tiempo corto o largo mostró diferencia de señal de GFP. Estos resultados sugieren que factores de transcripción tejido-específicos podrían estar involucrados en el efecto que tienen ambas hormonas en el cambio del patrón de expresión de *SPT*. Las auxinas y citocininas se han denominado el “yin y yang” en el desarrollo de la planta, ya que suele considerarse que tienen funciones opuestas, pero actúan sinérgicamente, de esta forma el resultado es la suma de sus acciones

independientes (Schaller *et al.*, 2015). Reportes previos han demostrado que *SPT* es un factor de transcripción importante en la respuesta a citocininas en gineceo (Reyes-Olalde *et al.*, 2017a). También se ha demostrado que *SPT* y las citocininas, promueven la expresión de los genes *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1)* y *PIN FORMED 3 (PIN3)* que participan en la síntesis y transporte polar de auxinas respectivamente (Reyes-Olalde *et al.*, 2017a). En estudios recientes se ha demostrado también, que las citocininas y auxinas tienen una relación sinérgica en el dominio medio durante el desarrollo del gineceo y que *SPT* es importante para esta interacción (Reyes-Olalde *et al.*, 2017b). Estos antecedentes, los resultados obtenidos de interacciones positivas en el Y1H de factores de transcripción de respuesta a auxinas y citocininas, además del efecto de inducción observado en la aplicación exógena de ambas hormonas, sugiere que la relación entre *SPT* y las hormonas citocininas y auxinas puede ocurrir a diferentes niveles, ya sea de manera directa o indirecta. Los datos también sugieren que al menos parte de esta relación podría estar conservada en la familia de las brassicáceas, basado en análisis bioinformáticos. Sin embargo, es importante realizar estudios más detallados del efecto de las hormonas en cada etapa de desarrollo del gineceo e inclusive incluir otras hormonas como los brasinoesteroides.

7. CONCLUSIONES

Los datos del análisis *in silico* junto con el ensayo de un híbrido en levadura indican que factores de transcripción pertenecientes a diferentes familias son capaces de unirse a la región promotora de *SPT*, sugiriendo que la regulación transcripcional de este gen podría darse a través de la acción combinatoria de diferente FTs.

Existen sitios de unión de factores de transcripción conservados en las regiones promotoras de *SPT* en 9 especies de la familia *Brassicaceae*, sugiriendo que, al menos, parte de la regulación transcripcional de *SPT* podría estar conservada en dicha familia.

La familia bHLH muestra una gran cantidad de sitios de unión conservados, incluyendo sitios correspondientes a *SPT* por lo que una auto-regulación de este FT es posible.

La aplicación exógena de citocinina (BAP) y auxina (IAA) en tiempos largos (48 h) induce la expresión de *SPT* en gineceo. Ambas hormonas podrían estar actuando sinérgicamente en la regulación transcripcional de *SPT*.

8. PERSPECTIVAS

- Probar la fuerza de interacción de los factores de transcripción que resultaron positivos para el fragmento promotor *pSPT-A* a concentraciones más altas de antibiótico y probar los factores de transcripción que resultaron negativos para el fragmento promotor *pSPT-B* a concentraciones más bajas de antibiótico.
- Evaluar la interacción de la región promotora de *SPT* con otros genes no incluidos en este estudio y podrían ser de interés en el desarrollo del gineceo como MP.
- Realizar un análisis de interacciones genética a través de cruzas entre la línea marcadora *pSPT::GFP* y líneas de ganancia y pérdida de función de FTs que interaccionan con la región promotora de *SPT*, para determinar si dicha interacción podría tener alguna relevancia biológica.

7 REFERENCIAS

1. AGI. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796–815.
2. Reményi A., Schöler H.R., Wilmanns M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 812–815.
3. Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H., Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Weisshaar, B. (2003). Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 15, 2497–2501.
4. Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M., Ferrándiz, C. (2006). Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3457–3469.
5. Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E., Studholme, D.J., Yeats, C., Eddy, S.R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, database issue: D138-D141, doi: 10.1093/nar/gkr1065.
6. Beltrán, J., García, F., Puigdoménech, P. (2003). Plantas transgénicas. 57
7. Chung, H.R., Schäfer, U., Jäckle, H., Böhm, S. (2002). Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C2H2 zinc-finger genes in Drosophila. *EMBO reports*, 3, 1158-1162.
8. Coenen, C., Lomax, T.L. (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci.*, 2, 351-356.
9. Cramer, P., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science*, 19, 19.
10. Díaz, M. D. 2017. Las Hormonas Vegetales en las Plantas. *Nutrición Vegetal*. 88, 4.
11. Díaz-Manzano, F.E., Cabrera, J., Ripoll, J.J., Del Olmo, I., Andrés, M.F., Silva, A.C., Barcala, M., Sánchez, M., Ruíz-Ferrer, V., de Almeida-Engler, J., Yanofsky, M.F., Piñeiro, M., Jarillo, J.A., Fenoll, C., Escobar, C. (2018). A role for the gene

- regulatory module microRNA172/TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 1/FLOWERING LOCUS T (miRNA172/TOE1/FT) in the feeding sites induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 217, 813-827.
12. Ferrandiz, C., Fourquin, C., Prunet, N., Scutt, C., Sundberg, E., Trehin, C., Vialette-Guiraud, A. (2010). Carpel development. *Advances in Botanical Research*, 55, 1-73.
 13. Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., Martienssen, R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development*, 125, 1509 – 1517.
 14. Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., Murfett, J. (1998). How does auxin turn on genes? *Plant Physiol.*, 118, 341-347.
 15. Hampsey, M., y Reinberg, D. (1999). RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9, 132-139.
 16. Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., Bailey, P.C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.*, 20: 735-47.
 17. Heisler, M.G.B., Atkinson, A., Bylstra, Y.H., Walsh, R., Smyth, D.R. (2001). *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development*, 128, 1089–1098.
 18. Ito, K., Chung, K.F., Adcock, I.M. (2006). Acción de los glucocorticoides y resistencia. *Alergia Clínica Inmonológica*, 117, 522-43.
 19. Kudo, T., Kiba, T., Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J Integr Plant Biol*, 52, 53-60.
 20. Larsson, E., Roberts, C.J., Claes, A.R., Franks, R.G., Sundberg, E. (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.
 21. Leyser, O. (2011). Auxin, self-organisation, and the colonial nature of plants. *Curr. Biol.*, 21, 331-337.

22. Li, L., Deng, X.W. (2005). It runs in the family: regulation of brassinosteroid signaling by the BZR1-BES1 class of transcription factors. *Trends Plant Sci.*, 10, 266-268.
23. Liljegren, S.J., Roeder, A.H.K., Kempin, S.A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, K.D., y Yanofsky, M.F. (2004). Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT. *Cell*, 116, 843– 853.
24. Liu, Z., Franks, R.G., Klink, V.P. (2000). Regulation of gynoecium marginal tissue formation by LEUNIG and AINTEGUMENTA. *Plant Cell*. 12: 1879-1892.
25. Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943-950.
26. Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M., Thornton, J.M. (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* 1, DOI: 10.1186/gb-2000-1-1-reviews001.
27. Manchado-Rojo, M., Weiss, J., Egea-Cortines, M. (2014). Validation of *AINTEGUMENTA* as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnol*, 12: 1053-1065.
28. Marsch-Martínez, N., Ramos-Cruz, D., Reyes-Olalde, J.I., Lozano-Sotomayor, P., Zúñiga-Mayo, V.M., de Folter, S. (2012). The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant Journal*, 72, 222-234.
29. Marsch-Martínez, N., de Folter, S. (2016). Hormonal control of the development of the gynoecium. *Curr Opin Plant Biol*, 29, 104-114.
30. Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282, 662– 665.
31. Miller, C.O., Skoog, F., von Saltza, M.H., Strong, F.M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1329-1334
32. Muller, B., Sheen, J. (2007). Advances in cytokinin signalling. *Science*, 318, 68-69.

33. Muraro, D., Byrne, H., King, J., Bennett, M. (2013). The role of auxin and cytokinin signalling in specifying the root architecture of *Arabidopsis thaliana*. *J Theor Biol.*, 21, 71-86.
34. Okamoto, J. K., Caster, B., Villarroel, R., Van Montagu, M., Jofuku, K. D. (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94, 7076-7088.
35. Pimienta, E., Muñoz, A., Ramírez, B., Méndez, L. (2006). Desarrollo vegetal. Universidad de Guadalajara. ISBN 970-27-0923-7.
36. Prerostova, S., Dobrev, P.I., Gaudinova, A., Knirsch, V., Körber, N., Pieruschka, R., Fiorani, F., Brzobohatý, B., Černý, M., Spichal, L., Humplik, J., Vanek, T., Schurr, U., Vankova, R. (2018). Cytokinins: Their Impact on Molecular and Growth Responses to Drought Stress and Recovery in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 22, 9:655.
37. Rajani, S., Sundaresan, V. (2001). The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Current Biology*, 11, 1914–1922.
38. Reyes-Olalde J. I., Zuñiga-Mayo, V. M., Serwatowska, J., Chavez-Montes, R. A., Lozano-Sotomayor, P., Herrera-Ubaldo, H., Gonzalez-Aguilera, K. L., Ripoll, J. J., Ezquer, I., Paolo, D., Heyl, A., Colombo, L., Yanofsky, M. F., Ferrandiz, C., Marsch-Martínez, N., de Folter, S. (2017a). 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, doi: 10.1371/journal.pgen.1006726.
39. Reyes-Olalde, J.I., Zuñiga-Mayo, V.M., Marsch-Martínez, N., de Folter, S. (2017b). Synergistic relationship between auxin and cytokinin in the ovary and the participation of the transcription factor SPATULA. *Plant Signaling & Behavior*, 12, doi: 10.1080/15592324.2017.1376158.
40. Reyes-Olalde, J.I., Zuñiga-Mayo, V. M., Chavez Montes, R. A., Marsch-Martínez, N., de Folter, S. (2013). Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends Plant Sci.*, 18, 644-655.

41. Riechmann, J.L. 2002. Transcriptional Regulation: a Genomic Overview. (2002). The Arabidopsis Book. Rockville, M.D.: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0085.
42. Roeder, A.H.K., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F. (2003). The role of the REPLUMLESS homeodomain protein in patterning the Arabidopsis fruit. *Current Biology*, 13, 1630–1635.
43. Romano, C.P., Hein, M.B., Klee, H.J. (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.*, 5, 438-446.
44. Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.
45. Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A., Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.*, 5, 301-307.
46. Schaller, G., Bishopp, A., Kieber, J. (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *The Plant Cell*, 27, 44-63.
47. Sehra, B., Franks, R.G. (2015). Auxin and cytokinin act during gynoecial patterning and the development of ovules from the meristematic medial domain. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.*, 4, 555-571.
48. Smyth, D.R., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2, 755–767.
49. Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., Alonso, J.M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, 133, 177-191.
50. Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballare, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P., Chory, J. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133, 164-176.

51. Toledo-Ortiz, G., Huq, E., Quail, P.H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*, 15, 1749–1770.
52. Tromas, A., Perrot-Rechenmann, C. (2010). Recent progress in auxin biology. *C R Biol*, 333, 297-306.
53. Vanneste, S., Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136, 1005-1016.
54. Windsor, A., Schranz, E., Formanova, N., Gebauer-Jung, S., Bishop, J., Schnabelrauch, D., Kroymann, J., Mitchell-Olds, M. (2006). Partial Shotgun Sequencing of the *Boechera stricta* Genome Reveals Extensive Microsynteny and Promoter Conservation with Arabidopsis. *Plant Physiology*, 140, 1169–1182.
55. Woodward, A.W., Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*, 95, 707-735.
56. Würschum, T., Gross-Hardt, R., Laux, T. (2006). APETALA2 regulates the stem cell niche in the Arabidopsis shoot meristem. *Plant Cell*. 18, 295-307.
57. Yamaguchi, N., Wu, M.F., Winter, C.M., Berns, M.C., Nole-Wilson, S., Yamaguchi, A., Coupland, G., Krizek, B.A., Wagner, D. (2013). A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Dev Cell*, 24, 271-282.
58. Zhang, F., May, A., Irish, V.F. (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS Directly Activate WUSCHEL. *Trends Plant Sci*, 22, 815-817.
59. Zhang, Z., Guo, Y. (2018). Hormone Treatments in Studying Leaf Senescence. *Methods Mol Biol*. 1744, 125-132.
60. Zhang, B., Wang, L., Zeng, L., Zhang, C., Ma, H. (2015). Arabidopsis TOE proteins convey a photoperiodic signal to antagonize CONSTANS and regulate flowering time. *Genes and Development*, 29, 975-987.
61. Zubo, Y.O., Blakley, I.C., Yamburenko, M.V., Worthen, J.M., Street, I.H., Franco-Zorrilla, J.M., Zhang, W., Hill, K., Raines, T., Solano, R., Kieber, J.J., Loraine, A.E., Schaller, G. (2017). Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114, 29, doi: 10.1073/pnas.1620749114.

62. Zuñiga-Mayo, V.M., Baños-Bayardo, C.R., Díaz-Ramírez, D., Marsch-Martínez, N., de Folter, S. (2018). Conserved and novel responses to cytokinin treatments during flower and fruit development in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 8, doi: 10.1038/s41598-018-25017-3.