



**Biotecnología de Plantas**  
Posgrado



**Cinvestav**  
Unidad Irapuato

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

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

**“Localización de Citocininas en el Gineceo”**

**Tesis que presenta:**

**I.Q. Héctor Rogelio Nájera González**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Con especialidad en

**Biotecnología de Plantas**

Directores de Tesis

**Dr. Stefan de Folter y Dr. José Juan Ordaz-Ortiz**

**Irapuato, Guanajuato**

**Julio, 2018**

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas y Metabolómica, que pertenecen al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, bajo la dirección de los Doctores Stefan de Folter y José Juan Ordaz-Ortiz, así como la asesoría de la Dra. Nayelli Marsch Martínez y el Dr. Robert Winkler.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No. 455156 para poder completar los estudios de posgrado.

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

Al Dr. Stefan de Folter por proponer un proyecto retador que me mantuvo siempre motivado y emocionado. También por todo su apoyo siempre que fue necesario y por las palabras de ánimo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. José Ordaz por aceptarme en su laboratorio y permitirme hacer uso de los equipos de espectrometría de masas.

A la Dra. Nayelli Marsch por ser “un co-director más”, participando activamente en las propuestas y discusiones que acompañaron esta tesis.

Al Dr. Robert Winkler por sus valiosos consejos, sugerencias y comentarios con respecto al proyecto realizado.

Gracias a las auxiliares del laboratorio de Metabolómica y del Laboratorio 8 de la Unidad de Genómica Avanzada, M.C. Ana Laura Guzmán Ortiz y M.C. Karla Lorena González por mantener las cosas funcionando. También un agradecimiento especial al Post Doc David Gómez-Zepeda y al Doctor Humberto Herrera-Ubaldo por sus consejos y aportes al desarrollo de este proyecto; así como a la M.C. Roberta Rossi por su apoyo en la última etapa de este proyecto.

A mis amigos: Vincent, Felipe, Jaime, Alejandra y Aurora por todo su apoyo y por los buenos momentos vividos.

## DEDICATORIA

*A mis Padres...*

## RESUMEN

El proceso de desarrollo de las flores, incluyendo su órgano central, el gineceo, requiere de la acción coordinada de diversos factores genéticos y hormonales. Estudiar el patrón de localización de estos factores es indispensable para entender mejor su función y cómo interactúan unos con otros. Se ha reportado que las citocininas tienen una función vital en muchos procesos importantes de las plantas, y la formación del gineceo no es la excepción. Estas moléculas son derivados de adenina a los que se ha adicionado una cadena isoprenoide por la acción de la familia de enzimas isopenteniltransferasa o IPT. Las citocininas son responsables de procesos como la división y diferenciación celular, y se sabe que pueden tener interferencia sobre otras fitohormonas (crosstalk). Se ha estudiado su función en el gineceo por medio de un gen reportero sintético denominado *TCS* (por Two-Component Output Sensor). Este reportero aprovecha el sistema de señalización de fosforelevo que tienen las citocininas, semejante al sistema de dos componentes de bacterias, para mostrar la respuesta transcripcional a la señalización de citocininas. Utilizando este reportero se ha encontrado señal en la región media del gineceo en desarrollo, en áreas específicas como el tracto de transmisión, el séptum y el réplum. Sin embargo, no se presenta señal en las valvas. Un estudio más detallado mostró que en las valvas se expresa el gen represor de la señal de citocininas *AHP6* el cual podría estar reprimiendo la señal de *TCS*. En el presente trabajo se exploraron metodologías para la localización directa de moléculas de citocininas *in planta* aplicables al gineceo. A pesar de que las metodologías tradicionales de extracción y cuantificación por U-HPLC-MS/MS han tenido mejorías sustanciales en los últimos años, como aumento de la eficiencia en la extracción y en los límites de detección, un estudio a nivel de órganos específicos del gineceo de *Arabidopsis* sería muy complicado, si es que acaso posible. Por esta razón, se desarrolló una metodología de inmunohistoquímica para la detección y localización de citocininas en cortes

de gineceo de *A. thaliana* usando anticuerpos policlonales y un anticuerpo secundario unido a GFP. También se exploró la técnica de MALDI-MSI (Imágenes por espectrometría de masas con desorción/ionización por láser asistida por una matriz), para la generación de imágenes moleculares de gineceos de Tomate (*Solanum lycopersicum*). El MALDI-MSI utiliza un láser para la desorción de moléculas directamente de la superficie del tejido para luego analizarlas por espectrometría de masas y generar imágenes de los iones seleccionados. Los resultados para ambas técnicas indican que las citocininas se encuentran distribuidas ubicuamente en el gineceo y no necesariamente donde se localiza la señal de TCS. Ambas metodologías están listas para ser aplicadas a futuros experimentos biológicos.

## ABSTRACT

The process of flower development, including the central organ, the gynoecium, requires coordinated action of several genetic and hormonal factors. The study of the localization pattern of these factors is necessary to better understand their function and how they interact with each other. It has been reported that cytokinins have a vital role in many important plant processes- and the formation of the gynoecium is not an exception. These molecules are adenine derivatives which have been added with an isoprenoid side chain by the action of a family of enzymes called isopentenyltransferase or IPT. Cytokinins are responsible of processes like cell division and differentiation, and it is known that there exists crosstalk with other phytohormones. Their functional role in the gynoecium has been studied using the synthetic reporter gene called *TCS* (Two-Component Output Sensor). This reporter makes use of the cytokinin phosphor relay signaling pathway, which is very similar to the two-component system in bacteria, to show transcriptional response to cytokinin signaling. Using this reporter, it has been found that there is cytokinin signal in the medial region of the developing gynoecium, especially in areas like the transmitting tract, septum and replum. Nevertheless, there is no signal in the valves. Further studies showed that there is expression of the cytokinin signaling repressing gene *AHP6* in the valves which could be repressing *TCS* signal. In this work we explored two methodologies for the direct localization of cytokinin molecules *in planta* to be used in gynoecium. Even when the traditional methodologies of extraction and quantification by U-HPLC-MS/MS have had substantial improvements in the last years, such as more efficient extraction and better detection limits, a study at the level of specific Arabidopsis gynoecium organs would be very complicated to undertake. To overcome this, an immunohistochemistry method was developed to detect and localize cytokinins in sections of *A. thaliana* gynoecium using polyclonal antibodies against *t*-zeatin and a secondary antibody conjugated with GFP. We also, explored the MALDI-MSI



technique (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging), for the generation of molecular images of gynoecium of tomato (*Solanum lycopersicum*). MALDI-MSI uses a laser to desorb and ionize molecules directly from the tissue surface to be subsequently analyzed in a mass spectrometer and generate images of the localization of selected ions. The results with both techniques indicate that cytokinins are ubiquitously distributed in the gynoecium and not necessarily where *TCS* signal was found. Both methodologies are ready to be applied to future biological experiments.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Angiospermas: Plantas con flores .....	1
1.2 Modelo de estudio .....	1
1.2.1 Arabidopsis thaliana .....	1
1.2.2 El Tomate (Solanum lycopersicum) .....	2
1.3 Desarrollo del gineceo.....	3
1.3.1 Desarrollo del gineceo de Arabidopsis .....	3
1.3.2 Desarrollo del gineceo de Tomate .....	5
1.4 Citocininas.....	5
1.4.1 Biosíntesis de Citocininas .....	6
1.4.2 Percepción y transducción de señales de citocininas.....	6
1.4.3 Transporte .....	8
1.4.4 Metabolismo .....	8
1.5 Función de las citocininas en el gineceo .....	9
1.6 Metodologías para la localización de citocininas in planta .....	11
1.6.1 Cromatografía con Detección por Espectrometría de Masas .....	11
1.6.2 Inmunohistoquímica.....	12
1.6.3 Localización indirecta .....	13
2. HIPÓTESIS .....	16
3. OBJETIVOS .....	17
3.1 Objetivo General .....	17
3.2 Objetivos Específicos .....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
4.1 Material vegetal .....	18
4.2 MALDI-MS Imaging.....	18
4.2.1 Preparación de Muestras de Gineceo de Tomate .....	18

4.2.2	Aplicación de Matriz.....	20
4.2.3	Adquisición de Espectros de Masas en modo MALDI-Imaging .....	21
4.2.4	Visualización de Datos MALDI-MS Imaging .....	22
4.3	Inmunolocalización de citocininas .....	23
4.3.1	Fijado.....	23
4.3.2	Deshidratación y Preparación de Bloques.....	23
4.3.3	Cortes e Incubación con Anticuerpos .....	24
4.3.4	Microscopía .....	25
5.	RESULTADOS.....	27
5.1	Imágenes por Espectrometría de Masas con MALDI .....	27
5.1.1	Determinación de la mejor matriz para citocininas .....	27
5.1.2	Límite de detección de Citocininas .....	29
5.1.3	Métodos de Aplicación de Matriz .....	30
5.1.4	Obtención de Muestras de Gineceo de Tomate .....	31
5.1.5	Generación de Imágenes de MALDI-MS .....	34
5.2	Inmunolocalización de Citocininas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	39
5.2.1	Variedades silvestres Col-0 y Ler .....	39
5.2.2	Inmunolocalización t-zeatina en 35S::AHP6.....	41
5.2.3	Inmunolocalización de t-Zeatina en <i>ahp6</i> .....	42
5.2.4	Inmunolocalización t-zeatina en 35S::SPT .....	43
5.2.5	Inmunolocalización de t-zeatina en la mutante <i>spt-2</i> .....	44
6.	DISCUSIÓN .....	46
6.1	MALDI-MS Imaging.....	47
6.1.1	Imágenes de MALDI-MS de Tomate silvestre (Micro-Tom).....	48
6.1.2	Imágenes de MALDI-MS de Tomate 35S::CKX2.....	50
6.2	Inmunolocalización de t-zeatina en <i>A. thaliana</i> .....	51
6.2.1	Inmunolocalización de t-zeatina en <i>Arabidopsis</i> .....	52
6.2.2	Inmunolocalización de t-zeatina en 35S::AHP6 y <i>ahp6</i> .....	53

6.2.3	Inmunolocalización de t-zeatina en 35S::SPT y spt.....	53
7.	CONCLUSIONES .....	55
8.	PERSPECTIVAS.....	56
9.	ANEXOS .....	57
9.1	Anexo 1.....	57
9.2	Anexo 2.....	57
9.3	Anexo 3. Protocolo de Inmunohistoquímica.....	58
9.4	Anexo 4. Protocolo de MALDI-MS Imaging.....	63
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Inflorescencia de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	2
<b>Figura 2.</b> Flor y gineceo de tomate.....	3
<b>Figura 3.</b> Desarrollo del gineceo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
<b>Figura 4.</b> Modelo propuesto para la transducción de señales de citocininas.....	8
<b>Figura 5.</b> Señal de la zeatina.....	28
<b>Figura 6.</b> Cristales de CHCA vistos al microscopio.....	31
<b>Figura 7.</b> Fenotipo de la línea sobre-expresante de <i>35S::CKX2</i> para degradación de citocininas (izquierda) y variedad Micro-Tom (derecha).....	32
<b>Figura 8.</b> Crio-sección de Gineceos de Tomate.....	33
<b>Figura 9.</b> Fotografías de gineceos de tomate antes (izquierda) y después (derecha) de aplicar matriz para MALDI (CHCA). ....	34
<b>Figura 10.</b> Ion 365 positivo mostrando localización tejido-específica. ....	35
<b>Figura 11.</b> Localización del ion 220 positivo en dos muestras de gineceo de tomate. ....	36
<b>Figura 12.</b> Imagen del ion 136 positivo en un análisis MS/MS sobre una muestra de gineceo de tomate.....	37
<b>Figura 13.</b> Imagen del ion $m/z=220$ positivo en las muestras <i>35S::CKX2</i> de gineceos de tomate.....	38
<b>Figura 14.</b> Señal del ion 136.08 en una análisis MS/MS de una muestra de gineceo de tomate <i>35S::CKX2</i> .....	39
<b>Figura 15.</b> Inmunolocalización de <i>t</i> -Zeatina en <i>A. thaliana</i> (Col-0).....	40
<b>Figura 16.</b> Inmunolocalización de <i>t</i> -Zeatina en <i>A. thaliana</i> (Ler).....	41
<b>Figura 17.</b> Inmunolocalización de <i>t</i> -Zeatina en <i>35S::AHP6</i> .....	42
<b>Figura 18.</b> Inmunolocalización de <i>t</i> -Zeatina en <i>ahp6</i> .....	43
<b>Figura 19.</b> Inmunolocalización de <i>t</i> -Zeatina en <i>35S::SPT</i> .....	44
<b>Figura 20.</b> Inmunolocalización de <i>t</i> -Zeatina en la mutante <i>spt-2</i> .....	45
<b>Figura 21.</b> Comparación entre la localización de <i>TCS</i> y MALDI-Imaging.....	50
<b>Figura 22.</b> Comparación entre la señal de inmunolocalización de <i>t</i> -zeatina, <i>TCS</i> e hibridación <i>in situ</i> .....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Condiciones de Operación del Espectrómetro de Masas Synapt G1..... 34

**Tabla 2.** Intensidad de señal de *t*-zeatina en MALDI-MS con diferentes matrices.40

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Angiospermas: Plantas con flores

Las angiospermas, del griego *angíon*- vaso y *sperma*- semilla, son plantas vasculares que se caracterizan por poseer estructuras reproductivas llamadas flores. Las flores contienen los órganos reproductores femenino, masculino o ambos en un arreglo hermoso y complejo a la vez. El órgano reproductor femenino, también llamado gineceo contiene los óvulos, que una vez fecundados se convierten en semillas. Así mismo, el gineceo maduro forma el fruto que encapsula las semillas protegiéndolas y auxiliando a su posterior dispersión.

Con más de 350,000 especies, las angiospermas son el grupo más grande y diverso dentro del reino *Plantae* correspondiendo aproximadamente al 80% de todas las plantas verdes que se conocen en la actualidad. No es casualidad entonces que la mayor parte del alimento del ser humano, así como de otros seres vivos esté conformado por distintos órganos de estas plantas: desde los tejidos vegetativos, hasta flores y frutos sirven de alimento para un sinnúmero de individuos (<http://www.theplantlist.org/browse/A/>).

Particularmente, la formación y desarrollo del ovario o gineceo, que después dará lugar al fruto ha sido objeto de diversos estudios. Tal es el caso del presente documento en donde se pretende analizar cómo la presencia de las moléculas de las fitohormonas citocininas (en particular la *trans*-zeatina) influye en el desarrollo del gineceo.

### 1.2 Modelo de estudio

#### 1.2.1 *Arabidopsis thaliana*

La planta *Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia de las brasicáceas o crucíferas. A pesar de que no presenta ningún beneficio económico importante, se ha utilizado desde hace más de 50 años como modelo de

estudio genético por presentar diversas características que la hacen propia para este fin (Provart et al. 2015). Además, los hallazgos realizados en *Arabidopsis* pueden ser luego extrapolados y aplicados a diversos cultivos. El fruto de *Arabidopsis* se denomina silicua y contiene un elevado número de semillas: cerca de 50. La silicua y semillas se desarrollan a partir de un gineceo que consiste en dos carpelos fusionados congénitamente en el centro de una flor perfecta. A grandes rasgos la flor de *Arabidopsis* está formada de cuatro verticilos; de fuera hacia adentro se encuentran los sépalos (4), pétalos (4), estambres (6) y pistilo o gineceo (1). Las flores se localizan en inflorescencias que constan de un racimo de alrededor de unas 10 flores (Irish 2010).



**Figura 1. Inflorescencia de *Arabidopsis thaliana*.** Fotografía de Alberto Salguero Quiles.

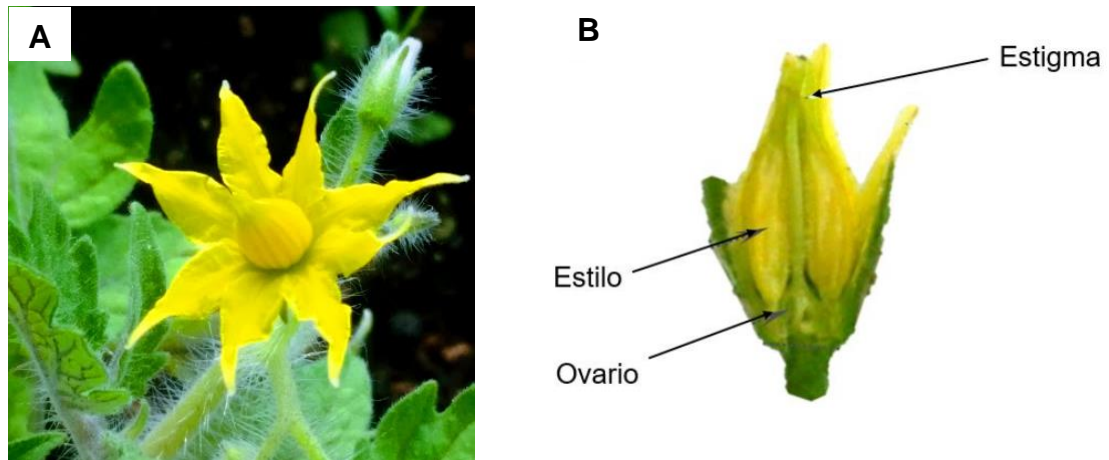
### **1.2.2 El Tomate (*Solanum lycopersicum*)**

*Solanum lycopersicum* es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. Sus frutos carnosos se desarrollan a partir del gineceo después de que los óvulos han sido fecundados. A lo largo del eje apical-basal, el gineceo está conformado por estigma, estilo, ovario y ginóforo, mientras que en el eje medio-lateral del ovario se desarrollan las valvas o pericarpio, el séptum o columela, la placenta y los óvulos (Xiao et al. 2009). A diferencia de *Arabidopsis*, que produce frutos secos, el tomate no contiene



réplum ni margen de las valvas, tejidos que están involucrados en la dehiscencia.

Recientemente, el tomate ha sido utilizado como modelo de estudio del desarrollo de frutos carnosos debido, entre otras cosas, a su importancia económica, su ciclo de vida corto, alta tasa de multiplicación y autopolinización, además de que su genoma ha sido secuenciado (Lozano et al. 2009; Tomato Genome Consortium et al. 2012).



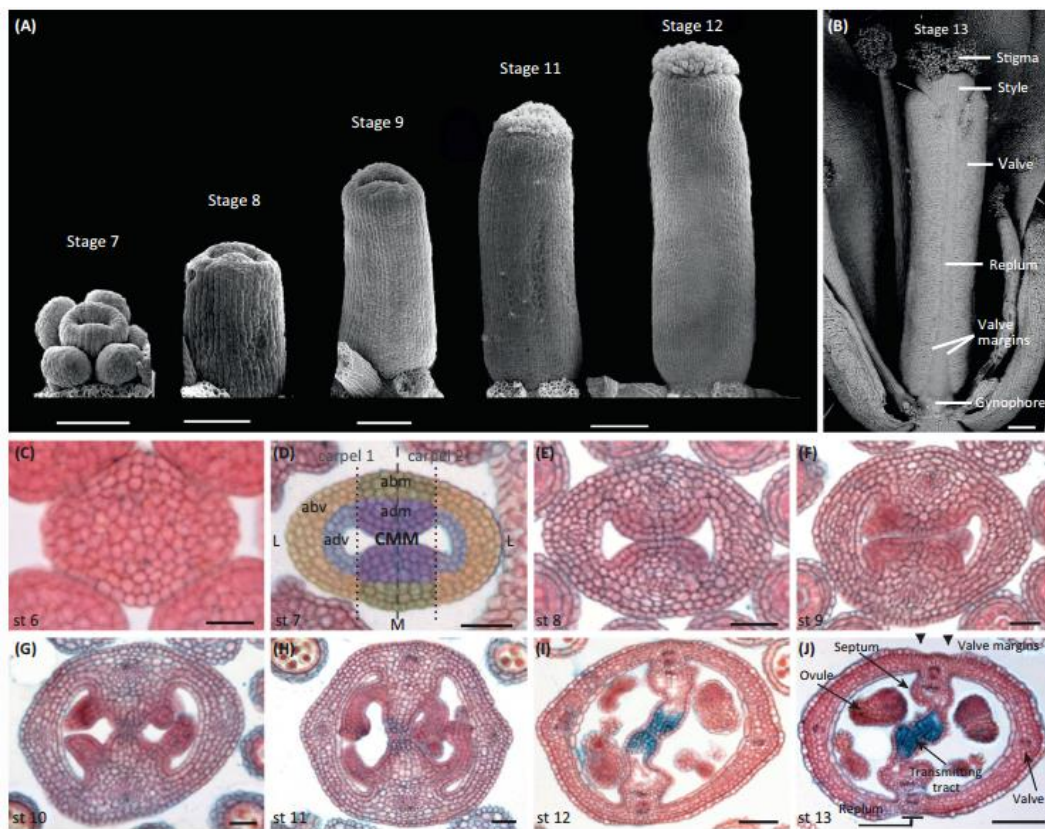
**Figura 2. Flor y gineceo de tomate.** En A se puede observar una flor de tomate en anthesis con los pétalos extendidos y los estambres envolviendo al gineceo. B es un corte longitudinal de la flor donde se puede observar el gineceo (B tomado de Celso-Espinoza & de Folter, sin publicar).

### 1.3 Desarrollo del gineceo

#### 1.3.1 Desarrollo del gineceo de Arabidopsis

Se han descrito 20 etapas durante el desarrollo de la flor de Arabidopsis: desde la formación del primordio floral en la etapa 1 hasta la dispersión de las semillas en la etapa 20 (Alvarez-Buylla et al. 2010). Particularmente el gineceo comienza a formarse en la etapa 6 como un tubo hueco que se elonga y desarrolla internamente diversos órganos a partir de una zona meristemática conocida como el Meristemo Marginal del Carpel o CMM por

sus siglas en inglés (Figura 3). Los tejidos internos comienzan como un par de crestas que crecen una hacia la otra; en la etapa 9 aparecen los primordios de óvulos mientras el gineceo se sigue elongando externamente. Las dos crestas internas se adelgazan y se unen para formar el séptum internamente y el réplum en el exterior. El CMM produce la placenta y los óvulos, conectados al séptum por medio de los funículos. Mientras tanto, en la parte externa aparece el estilo y se comienzan a formar el estigma con las papilas estigmáticas que recibirán el polen en la etapa 13 cuando se ha formado el tracto de transmisión y los óvulos estén maduros, listos para ser polinizados y fecundados. El correcto desarrollo del gineceo es fundamental para la formación del fruto (Alvarez-Buylla et al. 2010; Marsch-Martínez et al. 2012).



**Figura 3. Desarrollo del gineceo de *Arabidopsis thaliana*.** A y B son imágenes de microscopía electrónica de barrido y muestran el desarrollo externo del gineceo. C-J son

cortes transversales de gineceo teñidos para observar los distintos órganos. Tomado de Reyes-Olalde et al., 2013.

### **1.3.2 Desarrollo del gineceo de Tomate**

Se sabe que las plantas que producen frutos secos son antecesoras a las que producen frutos carnosos, por lo que no es extraño que el mecanismo de desarrollo del gineceo contenga elementos conservados en ambos tipos de plantas (Knapp 2002). Para tomate, se han descrito en total 20 etapas desde la aparición del meristemo de inflorescencia hasta el fruto maduro, 40 días después de anthesis o dpa (Xiao et al. 2009). Estas etapas difieren ligeramente de las que se han descrito para *Arabidopsis*, ya que en tomate, se empieza a formar el gineceo en la etapa 5 cuando se observa la aparición de los primordios de los carpelos y termina en la etapa 10 cuando los órganos reproductores están maduros y sucede la anthesis (Xiao et al. 2009).

Se sabe que el proceso de desarrollo del gineceo y del fruto está regulado por diversos factores que se expresan de una manera específica espacial y temporalmente (Gillaspy, Ben-David, y Gruissem 1993). Por ejemplo, se sabe que la correcta expresión del gen *SPATULA* permite el desarrollo de los tejidos medios, como séptum y tracto de transmisión, así como el estigma y la fusión de los carpelos (Alvarez y Smyth 2002). También se ha analizado el rol que juegan diversas fitohormonas, principalmente citocininas y auxinas en el desarrollo de este importante órgano, tanto en *Arabidopsis* como en tomate (Marsch-Martinez y de Folter 2016; Pattison y Catalá 2012).

### **1.4 Citocininas**

Las citocininas naturales son moléculas derivadas de adenina, sustituida en el nitrógeno  $N^6$  por una cadena isoprenoide o aromática. Fueron descubiertas en 1957 cuando Miller y Skoog buscaban identificar una sustancia que

promovía la división y diferenciación celular en cultivo de tejido vegetal. Ellos lograron aislar la 6-furfurilaminopurina, a la que llamaron kinetina ya que promovía la citoquinesis. Sin embargo, este compuesto provenía de someter esperma de arenque a temperatura y presión en una autoclave, así que dejaron abierta la posibilidad de que en la naturaleza otros compuestos similares fueran los responsables de este fenómeno (Miller C.O. et al. 1956). En efecto, posteriormente se identificó un compuesto con actividad biológica similar en endospermo inmaduro de maíz: la *trans*-zeatina, que ha sido corroborada como una de las citocininas más comúnmente encontradas en plantas (Kieber y Schaller 2014; Letham 1973).

#### **1.4.1 Biosíntesis de Citocininas**

A pesar de su descubrimiento hace más de 50 años, fue hasta 2002 que se identificaron genes endógenos que codifican enzimas de síntesis de citocininas activas en plantas (Zubko et al. 2002). De hecho, se pensaba que estas podían provenir de la degradación del t-RNA. Hoy se sabe que existe una familia de genes que codifican enzimas isopenteniltransferasas (*IPT1-9*) en *Arabidopsis* (Miyawaki, Matsumoto-Kitano, y Kakimoto 2004). Estas enzimas son responsables de catalizar la reacción de adición de la cadena isoprenoide (iP) proveniente de un dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) al N<sup>6</sup> de los adenosin-5'-fosfatos (AMP, ADP o ATP). Esto produce un iP ribonucleótido que puede ser convertido al ribonucleótido de *t*-zeatina por hidroxilación de su cadena isoprenoide mediante la acción de una enzima citocromo P450. Finalmente, la acción de una familia de enzimas codificada por los genes *LONELY GUY* (*LOG*) separa la base nitrogenada de la ribosa fosfato llegando así a la forma activa de la *t*-zeatina (Kieber y Schaller 2014).

#### **1.4.2 Percepción y transducción de señales de citocininas**

El sistema de señalización de las citocininas es muy semejante al sistema de dos componentes que se presenta en bacterias. Estos sistemas consisten en un sensor transmembranal que es una proteína histidin-cinasa que se auto fosforila en un residuo conservado de histidina cuando percibe un estímulo específico (Parkinson 1993). En el caso de Arabidopsis, el sensado sucede por las proteínas AHK2, AHK3 y AHK4 (esta última también llamada CRE1 o WOL1). Las proteínas AHK perciben las moléculas de citocininas por medio de un Sensor Extracelular Asociado a Ciclasas Histidin-cinasas (CHASE, por sus siglas en inglés). También se sabe que conforman un sensor híbrido, que no sólo contiene el residuo de histidina sino también un aspartato para formar lo que se conoce como un fosforrelevo (Figura 4). En el siguiente paso del proceso de señalización, el fosfato es transferido a una proteína que sirve como un intermediario de la señalización entre las histidin-cinasas híbridas y los reguladores de respuestas. El genoma de Arabidopsis codifica cinco de estas proteínas: AHP1 al 5. AHP6 es considerada una pseudo AHP y un regulador negativo de la señalización de citocininas ya que secuestra al fosfato pero no lo transfiere (Suzuki et al. 2000). Las proteínas AHP tienen la capacidad de entrar y salir del núcleo, en donde transfieren el fosfato a los reguladores de respuesta tipo B (ARR-tipo B) que poseen un motivo de unión a DNA y activan la transcripción de diversos genes de respuesta a citocininas. Entre estos genes de respuesta están los reguladores de respuesta tipo A (ARR-tipo A) que también pueden ser fosforilados por las AHP y compiten por el fosfato creando un ciclo de auto-regulación (Schaller et al. 2002; El Showk et al. 2013).

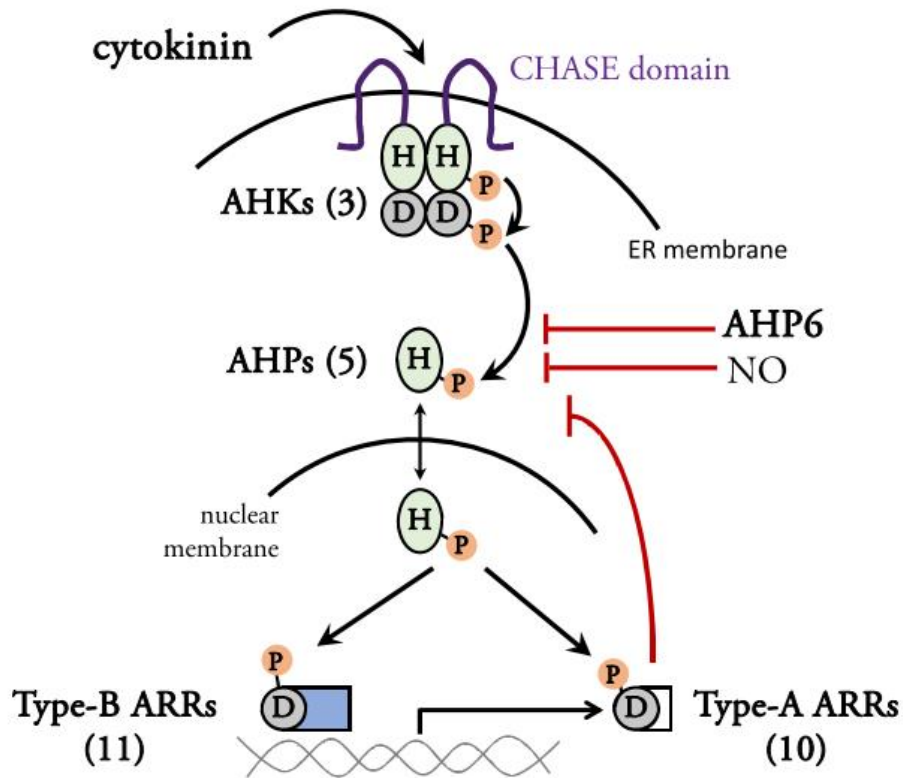


Figura 4 Modelo propuesto para la transducción de señales de citocininas. Imagen tomada de El-Showk et al., 2013.

### 1.4.3 Transporte

Se sabe que la mayoría de las citocininas se sintetizan en la raíz desde donde son transportadas en el xilema a las zonas de mayor transpiración donde aún no existe cutícula (Aloni et al. 2005). Sin embargo, recientemente se ha encontrado que existe expresión de los genes de biosíntesis de citocininas en diversos tejidos de la planta de Arabidopsis (Miyawaki, Matsumoto-Kitano, y Kakimoto 2004).

### 1.4.4 Metabolismo

La inactivación de las citocininas es llevada a cabo por las enzimas CKX, citocinin-oxidasa/deshidrogenasa en un solo paso que consiste en la separación oxidativa de la cadena isoprenoide lateral (Schmülling et al. 2003). Se ha demostrado que los procesos de degradación cumplen un papel importante en la regulación de la actividad de las citocininas (Kudo, Kiba, y Sakakibara 2010).

### **1.5 Función de las citocininas en el gineceo**

Las citocininas son fitohormonas importantes que están presentes en muchos procesos fisiológicos de las plantas y se ha encontrado que tienen una actividad muy diversa, actuando desde etapas embrionarias (Muller y Sheen 2008; Sakakibara 2006). El desarrollo de la flor y el fruto no es la excepción. Recientemente Bartrina y colaboradores (2011) trabajaron con la doble mutante de *ckx3 ckx5* de *Arabidopsis* y observaron varios efectos muy interesantes. Las enzimas CKX, como se mencionó anteriormente, son responsables de la degradación de las citocininas por lo que la doble mutante, en efecto, presentó una concentración de *t*-zeatina y sus derivados significativamente mayor a la de la planta silvestre (Bartrina et al. 2011). Esto tuvo como consecuencia un aumento en el tamaño de los meristemos reproductivos, así como un incremento en el número de óvulos, flores y frutos. Todos estos factores tuvieron como resultado un incremento de aproximadamente 55% en el rendimiento de semillas (Bartrina et al. 2011).

Uno de los estudios más importantes para descifrar la función de las citocininas en el gineceo fue realizado por Marsch-Martínez y colaboradores en 2012. En este estudio, se analizó el patrón de localización de la señalización de citocininas durante el desarrollo del gineceo utilizando el marcador sintético *TCS::GFP* (Marsch-Martínez et al. 2012). La construcción *TCS* (Two-Component-output-Sensor) consiste en un repetido del motivo de unión al DNA de los ARR tipo-B y un promotor mínimo 35S que permiten

visualizar *in vivo* la respuesta transcripcional a citocininas (Muller y Sheen 2008). La respuesta a citocininas es notoria desde las primeras etapas de la formación del gineceo de *Arabidopsis* cuando se observa señal fluorescente en la región media que coincide con la zona meristemática donde se forman diversos órganos como la placenta y los óvulos. Esto coincide con la conocida función de las citocininas en cuanto a la proliferación y diferenciación celular. Sorprendentemente, también se encontró señal marcadora de señalización de citocininas en etapas tardías del desarrollo como lo son las etapas 13 y 14, cuando se empieza a desarrollar el fruto. La señalización se encuentra muy marcadamente en el margen de las valvas, donde las citocininas podrían estar cumpliendo un rol en el proceso de la correcta formación del margen de las valvas para la apropiada dehiscencia del fruto (Marsch-Martínez et al. 2012). En este mismo estudio se observó que la aplicación exógena de 6-benzilaminopurina o BAP, una citocinina aromática, restaura los fenotipos perdidos de mutantes que carecen de margen de las valvas o son indehiscentes (*shp1*, *shp2* e *ind*).

En tomate, las citocininas son encontradas en el pericarpio, donde son asociadas con procesos de división celular (Gillaspy, Ben-David, and Gruissem 1993). También se ha observado que los niveles de citocininas en ovario incrementan después de la polinización, sugiriendo que su participación se requiere para el adecuado crecimiento del fruto (Mcatee et al. 2013). En un reciente trabajo del laboratorio (Celso-Espinoza & de Folter, sin publicar), se investigó la función de las citocininas durante el desarrollo del gineceo de tomate utilizando la línea reportera sintética *TCS::VENUS* para visualizar la respuesta transcripcional a esta hormona. Se encontró señal en placenta y óvulos. Resultados similares se observaron en la línea *ARR5::GUS* (un ARR tipo-A), cuya expresión durante el desarrollo del ovario fue específica en placenta.



Por lo expuesto anteriormente, podemos decir que es importante conocer el patrón espaciotemporal de la localización de las moléculas de hormonas específicas, así como la expresión de genes involucrados en el desarrollo y que pudieran estar interactuando para formar un complejo mecanismo regulatorio que controle la división, crecimiento y diferenciación de células vegetales en la formación del fruto.

## **1.6 Metodologías para la localización de citocininas *in planta***

La investigación respecto al rol de las fitohormonas en el proceso de floración requiere de técnicas exactas que revelen su distribución y concentración a nivel celular y de tejido (Dewitte 1999). El estudio de las citocininas endógenas en tejido vegetal presenta la dificultad de que estas moléculas (y las fitohormonas en general) se encuentran en muy bajas concentraciones *in planta*. Tradicionalmente, se han adoptado principalmente dos estrategias para estudiar fitohormonas: la primera consiste en la mejora constante de los procesos de extracción y purificación de las mismas, así como de los límites de detección y la especificidad de las técnicas de química analítica usadas para la cuantificación de los niveles de hormonas endógenas (Li et al. 2017). La segunda se enfoca en la elaboración de técnicas para la localización *in situ* de fitohormonas (Pasternak, Tietz, y Palme 2015; Zavala y Brandon 1983). A continuación, se describen algunas técnicas utilizadas.

### **1.6.1 Cromatografía con Detección por Espectrometría de Masas**

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (U-HPLC-MS/MS) ha demostrado ser una excelente técnica para la detección y cuantificación de fitohormonas, permitiendo análisis a nivel de ng de citocininas en tiempos cromatográficos cortos, menores a los 10 min (Albacete 2017; Ordaz-Ortiz, Foukaraki, y Terry 2015). Recientemente, desarrollos en la metodología de preparación de muestras como lo son el uso

de inmunosorbentes micromagnéticos o citometría de flujo han logrado cuantificar citocininas en secciones de raíz de hasta 0.1 mg peso húmedo y también desarrollar perfiles de localización de fitohormonas a nivel celular en raíces de Arabidopsis (Plačková et al. 2017; Bishopp et al. 2011; Pencik et al. 2013).

Una aplicación reciente de la técnica de espectrometría de masas que busca la detección y cuantificación de moléculas *in situ* es la realización de Imágenes con Espectrometría de Masas con Desorción/Ionización por Láser Asistida por una Matriz (MALDI-MS Imaging). MALDI-MS Imaging ha probado ser una técnica útil para la localización *in situ* de un amplio grupo de moléculas; desde proteínas hasta metabolitos de bajo peso molecular (Boughton et al. 2016). Esta tecnología involucra el uso de una fuente de ionización suave para la generación e introducción de iones a un espectrómetro de masas. Hacer esto en un arreglo bidimensional a lo largo y ancho de una muestra biológica, genera una serie de espectros de masas individuales para cada coordenada (x,y), que es luego convertida en un pixel para la generación de una imagen al graficar la intensidad relativa de iones individuales. En plantas, la técnica se ha utilizado con éxito para el estudio de semillas (Sturtevant et al. 2017), hojas (Annangudi et al. 2015), raíces (Takahashi et al. 2015; Shiono et al. 2017); entre otros varios tejidos (Lee et al. 2012). Una de las principales ventajas de hacer imágenes moleculares por medio de espectrometría de masas es la capacidad de realizar un análisis no dirigido sin necesidad de marcadores específicos. Esto, aunado a la alta sensibilidad y resolución de los equipos espectrometría de masas (que además mejora cada día) hacen de la técnica una herramienta muy poderosa para el análisis de muestras biológicas de todo tipo (Baker, Han, y Borchers 2017).

### **1.6.2 Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica se basa en la habilidad de las moléculas de anticuerpos (especialmente la inmunoglobulina G, IgG) de reconocer y ligarse a los antígenos contra los cuales fueron generados en un animal experimental (Knox, Vithanageand, y Howlett 1980). Generalmente, estos anticuerpos son luego unidos a un anticuerpo secundario que está conjugado con algún señalizador, ya sea de fluorescencia o alguna enzima que genere un producto visible. Una de las ventajas de esta metodología es que tiene un excelente límite de detección. Se ha reportado un límite de detección entre 3-10 pg para diversas fitohormonas (Maldiney et al. 1986). Fue aplicada por primera vez para la localización de citocininas en 1983 por Zabala y Brandon. Ellos generaron el anticuerpo contra dihidrozeatina (DHZ) y lo etiquetaron con rodamina o partículas de oro para ser visto por microscopía de fluorescencia o electrónica, respectivamente. La especificidad de la señal fue sorprendente en el sentido de que la región no marcada correspondía morfológicamente al centro quiescente de la raíz, mientras que las células meristemáticas que lo rodean estaban fuertemente marcadas (Zavala y Brandon 1983). Otra de las ventajas de esta técnica es que permite observar incluso a nivel intracelular la localización de los antígenos, de manera que se ha observado que algunas formas de citocininas como la DHZ y la isopenteniladenina (iPA) son citoplasmáticas, mientras que la *t*-zeatina se encuentra también localizada en el núcleo (Dewitte 1999; Caboni et al. 2002).

### **1.6.3 Localización indirecta**

El estudio de la expresión de construcciones promotor-reportero de genes relacionados con citocininas ha permitido estudiar indirectamente su localización en planta. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, se ha encontrado expresión de una CK-hidroxilasa, involucrada en la biosíntesis de *t*-zeatina (*CYP735A2*), en la vasculatura (Kudo, Kiba, and Sakakibara 2010) mientras que la citocinina oxidasa/deshidrogenasa *CKX5* se expresa principalmente en el ápice de la raíz, así como en el procámbium de meristemas de

inflorescencia (Schmülling et al. 2003; Bartrina et al. 2011). Otros genes que han sido utilizados para detectar, ya sea biosíntesis, señalización o metabolismo de citocininas incluyen los *IPTs* y *ARRs* tipo A y B (Yanai et al. 2005; Jasinski et al. 2005; Aloni et al. 2005).

El desarrollo del reportero sintético *TCS*, que se mencionó anteriormente, también ha tenido un impacto profundo en el estudio de la localización de citocininas (Bar et al. 2016; Chen, Lausser, y Dresselhaus 2014; Marsch-Martinez y de Folter 2016). Sin embargo, estas son observaciones indirectas y no de las moléculas de citocininas *per se*. Dado que las citocininas son compuestos móviles y que actúan indirectamente, un análisis de expresión de genes relacionados con citocininas no siempre representa sus sitios de síntesis, acumulación o función biológica (Antoniadi et al. 2015).

Un caso de particular interés es el reportado por Reyes-Olalde y colaboradores en 2017 en el cuál se estudiaron los factores que pudieran estar definiendo el patrón de localización de la señal de citocininas durante el desarrollo del gineceo de *Arabidopsis* reportado previamente (Marsch-Martínez et al. 2012). Se encontró que el patrón de localización coincide con el patrón de expresión del gen *SPATULLA (SPT)*, un factor de transcripción de la familia bHLH (basic-Helix-Loop-Helix) que es clave en la morfogénesis temprana del gineceo ya que participa en el desarrollo del CMM, séptum y tracto de transmisión (Heisler et al. 2001; Groszmann et al. 2010). De acuerdo con varios experimentos, Reyes-Olalde *et al.* concluyeron que *SPT* está activando la señalización de citocininas en los tejidos medios, muy probablemente actuando al nivel de señalización al unirse al menos a uno de los reguladores de respuesta *ARR* tipo B, aunque también pudiera estar regulando indirectamente otros *ARR* (Reyes-Olalde et al. 2017). Además, analizando la expresión de los reguladores negativos a varios niveles de la cascada de señalización *AHP6* y *ARR16* (un *ARR* tipo A), encontraron que la expresión de estos genes es precisamente en las valvas, donde no se encuentra señal a citocininas. Esto hace pensar que la regulación se

encuentra a nivel de la señalización y no tanto de la biosíntesis; aunque no se descarta que *SPT* esté actuando a diversos niveles (Reyes-Olalde et al. 2017).

## **2. HIPÓTESIS**

El patrón de localización de la señalización de citocininas observado con el marcador sintético *TCS* en el gineceo coincide con la localización de las moléculas de estas hormonas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Obtener el patrón de localización de moléculas específicas de citocininas en el gineceo de *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Solanum lycopersicum*).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar una metodología para la localización de citocininas en el gineceo de *Arabidopsis thaliana* por medio de inmunohistoquímica.
- Desarrollar una metodología para la localización de citocininas en el gineceo de tomate por medio de MALDI-MS Imaging.
- Analizar el patrón de localización de citocininas específicas en el gineceo de muestras silvestres de *Arabidopsis* (Col-0, Ler), así como en las líneas mutantes y sobre-expresantes de los genes *SPATULA* (*spt*, *35S::SPT*) y *AHP6* (*ahp6*, *35S::AHP6*).
- Analizar el patrón de localización de citocininas específicas en el gineceo de muestras silvestres de tomate (MT, M82) y en la línea sobre-expresante del gen *CKX2* (*35S::CKX2*).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

Para los experimentos de inmunolocalización se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* accesiones Columbia (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler). Las semillas de *spt-2* provienen del Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University, Columbus); *spt-12* y *35S::SPT* de Karen Halliday y *ahp6-1* de Teva Vernoux. Todas las plantas fueron germinadas y crecidas en las mismas condiciones que se describen a continuación: las semillas fueron colocadas en charolas con sustrato sólido (vermiculita, perlita y suelo orgánico en proporción 1:1:3, respectivamente), y colocadas a 4°C por 24 horas para homogenizar la germinación. Después de este tiempo se colocaron en una cámara de crecimiento Percival® AR-41L2 a 22°C y en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Dos semanas después de la germinación, las plantas se trasladaron a invernadero con temperatura controlada entre 22-28°C y condiciones de luz solar natural reducida 50% con malla sombra.

Para las pruebas de MALDI-MS Imaging se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Micro-Tom, así como de la línea de degradación de citocininas *35S::CKX2* de Lázaro E. P. Peres (Líneas no publicadas). Las semillas se sembraron en una mezcla de sustrato que consiste en tierra hoja, perlita, tierra lama, arena en relación 3:1:1:1 respectivamente y se crecieron en condiciones de invernadero con temperatura controlada entre 28-32°C y luz solar natural.

### **4.2 MALDI-MS Imaging**

#### **4.2.1 Preparación de Muestras de Gineceo de Tomate**



La premisa al desarrollar la metodología para la preparación de la muestra fue manipular lo menos posible y realizar el menor número de actividades sobre el tejido para evitar la degradación y deslocalización de las citocininas endógenas.

Se tomaron flores de tomate justo después de anthesis y antes de la polinización (1-2 dpa), ya que en esta etapa tenemos un gineceo maduro y se ha reportado que en este punto la concentración de citocininas empieza a aumentar (Mcatee et al. 2013; Gillaspy, Ben-David, and Gruissem 1993).

Se probó la inclusión de la muestra en varios medios recomendados para hacer los cortes en el criostato: agua, gelatina 10% y carboximetil-celulosa (CMC) de sodio al 3% (Dong et al. 2016). La forma de preparar las muestras de gineceo es muy semejante para todos los medios de inclusión. Antes de cortar la flor de la planta, se retiraron los pétalos, estambres y sépalos cuidadosamente con unas pinzas para revelar el gineceo, conformado por el ovario y el estilo alargado. También se retiró el estilo para concentrar el esfuerzo en el ovario maduro. Una vez que está expuesto el ovario, se coloca el medio de inclusión en un mini molde de base metálica (Leica 3803080) y sólo entonces se corta el gineceo para sumergirlo y acomodarlo en el medio de inclusión. El bloque metálico con la muestra es luego sumergido cuidadosamente en nitrógeno líquido para realizar un congelamiento rápido que evita que se formen cristales (flash-frozen). El bloque se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se ha registrado que puede permanecer así hasta 9 meses sin afectar la composición de muchos de sus metabolitos (Dong et al. 2016), aunque este estudio no se ha hecho con respecto a las citocininas. En nuestro caso, las muestras fueron procesadas al día siguiente. Se montan en una platina utilizando el gel de congelación de tejidos de Leica (14020108926) para luego realizar cortes en un criostato CM 1860 UV también de la marca Leica. Las cuchillas utilizadas fueron las número 818 de perfil alto (Leica 14035838926). Se analizaron los cortes realizados hasta encontrar el tejido deseado con la ayuda de un microscopio digital VHX-5000. Al encontrar el tejido deseado se tomaron fotografías ópticas para comparar con las imágenes de MALDI. Los

cortes posteriores se colectaron en placas para MALDI-Imaging del proveedor (Waters 700003895), o en portaobjetos de vidrio ya que el equipo Synapt G1 presenta estas dos posibilidades para introducir la muestra e inmediatamente se pusieron en hielo seco para evitar el oscurecimiento por oxidación observada al microscopio (quizás por la intensa luz que recibe la muestra) y la conservación de los metabolitos.

#### **4.2.2 Aplicación de Matriz**

La aplicación de matriz se hizo con dos métodos distintos, ambos desarrollados en casa ya que no contamos con los equipos especializados para este fin.

El primero consiste en utilizar la fuente de ionización por electrospray del equipo LCT de Waters y la jeringa de infusión de muestra para generar una capa de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-hidroxi-benzóico o CHCA en una concentración de 3.6 mg/mL) sobre el tejido de la muestra. El flujo de la jeringa se ajusta a 50  $\mu$ L/min y se prende el flujo del gas API en el software de control del equipo LCT (MassLynx 4.1). La muestra se coloca a 10 cm de la salida del "microspray" (ya que no tiene corriente eléctrica) y se procede así por espacio de 5 minutos para aplicar un total de 250  $\mu$ L de solución o 0.9 mg CHCA (Ver imagen en el Anexo 1.). La solución de CHCA se prepara siguiendo las instrucciones del manual de preparación de soluciones de Waters (Waters 715001491 Rev. H, UK) en una mezcla de 50:50 acetonitrilo y agua con 0.1% ácido trifluoroacético (TFA).

El segundo método de aplicación de matriz que se probó fue la sublimación. Se realizó con ayuda de una liofilizadora Labconco FreeZone® 4.5L de la siguiente manera: se colocaron 100 mg de CHCA sólido (Fulka 70990-1G-F) en un vaso de 1 litro del sistema de secado en frío. Dentro de este vaso, se colocó otro vaso más pequeño y sostenido a 3 cm por encima del polvo de

CHCA por medio de unas patas de soporte. El vaso pequeño lleva pegada en su parte inferior la placa con la muestra y en su interior se coloca un poco de hielo (Ver imagen en Anexo 2.). Una vez que está este arreglo, se abre el vacío de la liofilizadora ajustado a  $2.5 \times 10^{-2}$  torr y se calienta el vaso a 180°C con ayuda de una parrilla de calentamiento. En cuanto se estabilizan estos dos parámetros se empieza a observar la sublimación y deposición de la matriz sobre la muestra. En este punto se encontró que 10 minutos permite tener una muestra totalmente cubierta de matriz.

#### 4.2.3 Adquisición de Espectros de Masas en modo MALDI-Imaging

La obtención de datos de espectrometría de masas en modo MALDI-Imaging se realizó en un equipo Synapt G1 (Waters, UK) que tiene un analizador de Tiempo de Vuelo o TOF. Se operó en modo V que es el que tiene la mayor sensibilidad (a comparación del modo W que presenta menor sensibilidad, pero mayor resolución) y en modo de ionización positiva, que es el más apropiado para citocininas. Además, se realizó una optimización de parámetros para favorecer la ionización y detección de la molécula de *t*-zeatina (ver Tabla 1. Condiciones de Operación del Espectrómetro de Masas Synapt G1. **Algunas condiciones presentan valores con unidades arbitrarias designados por el fabricante. EDC= Enhanced Duty Cycle; CE=Collision Energy**) El estándar de *t*-zeatina utilizado para buscar las condiciones óptimas de operación del equipo fue donado a nuestro laboratorio por Keren Martínez-Aguilar (CINVESTAV, Irapuato).

La adquisición de datos en modo MALDI-Imaging requiere de la generación de un archivo que contiene los datos del patrón de análisis que deberá realizar el equipo. Este archivo se genera a partir de una fotografía de la muestra usando el software MALDI Imaging Pattern Creator del mismo proveedor. Es importante tener en cuenta que aquí se selecciona la resolución y el tamaño de la toma de datos, parámetros que afectan directamente el tiempo que tardará el equipo en adquirir la imagen, así como

el tamaño del archivo. Buscando un balance entre resolución, tiempo de análisis y tamaño del archivo se seleccionó una resolución de 50  $\mu\text{m}$  para las muestras de gineceo, aunque el equipo puede adquirir hasta 25  $\mu\text{m}$ . El archivo del patrón generado se carga en el programa MassLynx que controla el equipo Synapt junto con los demás parámetros seleccionados y se lanza la adquisición de espectros. Se realizó adquisición de datos en modo MS/MS para el ion 220.12  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (zeatina) optimizado para detectar el fragmento 136.08  $[\text{M}-84]^+$  así como un análisis global MS desde 120-4000 m/z optimizado para 220  $[\text{M}+\text{H}]^+$  para cada una de las muestras de gineceos de tomate variedad Micro-Tom así como de la línea 35S::CKX2.

<b>Parámetro</b>	<b>Full Scan</b>	<b>MS/MS</b>
<b>Rango de masa</b>	120-4000 m/z	120-221 m/z
<b>MS/MS</b>	n.a.	220.12
<b>Laser Energy</b>	360	360
<b>Firing Rate</b>	200 Hz	200 Hz
<b>Sensitivity</b>	EDC*, 220.12	EDC, 136.07
<b>Polarity</b>	Positive	Positive
<b>Scan Time</b>	2 sec	2 sec
<b>Trap CE**</b>	6 volts	12 volts
<b>Transfer CE</b>	4 volts	4 volts
<b>Sample Plate</b>	0.0	0.0
<b>Extraction</b>	10	10
<b>Hexapole</b>	10	10
<b>Aperture 0</b>	0.0	0.0

**Tabla 1. Condiciones de Operación del Espectrómetro de Masas Synapt G1.** Algunas condiciones presentan valores con unidades arbitrarias designados por el fabricante. EDC= Enhanced Duty Cycle; CE=Collision Energy.

#### 4.2.4 Visualización de Datos MALDI-MS Imaging

Para la visualización de las imágenes de MALDI se utilizó el software abierto Biomap (<https://ms-imaging.org/wp/biomap/>) realizando previamente una conversión de archivos con el software MALDI Imaging Converter (Waters). También se analizaron los datos de MALDI-MSI usando el software HDI que nos proporcionó el proveedor del equipo (Waters, UK).

### **4.3 Inmunolocalización de citocininas**

#### **4.3.1 Fijado**

Una vez que las plantas de Arabidopsis alcanzaron la etapa reproductiva se colectaron entre 5-7 inflorescencias para cada línea (Col-0, Ler, *spt*, *ahp6.1*, *35S::SPT-HA*, *35S::AHP6*) y fueron fijadas en 1.5 ml de solución de 3% paraformaldehído con 0.5% glutaraldehído en MTSB (Microtubule stabilizing buffer) que consiste en 15 g PIPES (PM 302.4), 1.90 g EGTA (PM 380.4), 1.22 g MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O (PM 246.5) y 2.5 g KOH (PM 56.1) en 1 litro de agua MilliQ y pH ajustado a 7 con KOH 10 M. Esta solución fue adicionada con 0.1% de Triton X-100 como humectante y se aplicó vacío (aproximadamente -20" Hg) por espacio de 30 minutos. La correcta y rápida penetración de la solución de fijado es uno de los pasos más importantes de esta técnica (Pasternak, Tietz, and Palme 2015). Esta operación se realizó con solución fría (en hielo) y en lo posible al abrigo de la luz para evitar la degradación de las citocininas.

Sossountzov y colaboradores demostraron que utilizando esta solución de fijado, las bases libres de citocininas y no los ribósidos de éstas se unen mayoritariamente a las proteínas celulares de la planta (Sossountzov et al. 1988).

#### **4.3.2 Deshidratación y Preparación de Bloques**

Una vez que las muestras habían sido fijadas, se realizó un breve lavado con agua MilliQ para después comenzar a encubar a 4°C en una serie de

soluciones crecientes en concentración de etanol desde 10 - 100% cada hora para realizar una deshidratación gradual de la muestra. Si el fijado se realizó correctamente las inflorescencias se van al fondo del recipiente durante la incubación con etanol. Al final de la serie de etanol la muestra ha perdido casi toda la clorofila y presenta un color blanco parduzco. A continuación, se siguió el protocolo del polímero para cortes Technovit® 7100 que consiste en una pre-infiltración con 50% de la solución básica de Technovit® y 50% etanol por 2 horas a temperatura ambiente, seguido de una infiltración por 24 horas mínimo (recomendado 48 horas) con la solución básica de Technovit® mezclada con el polvo Hardener I que incluye el kit. Durante el paso de la infiltración también se aplicó vacío durante los primeros 30 minutos. Desde la recolección de la muestra hasta este paso se realizó en un tubo Falcon® de 15 mL y solamente se fueron cambiando las soluciones con la ayuda de una pipeta de Pasteur de plástico.

Finalmente, se colocó 1 mL de la solución de polimerización (solución de infiltración más Hardener II en relación 1:15) en los moldes de base desechables (Leica 3803015) y se introdujeron 1 o 2 inflorescencias antes de poner el casete de procesado (Leica 3802242). A las 72 horas a temperatura ambiente el bloque había polimerizado completamente y se añadió una capa del polímero Technovit® 3040 2:1 polvo:líquido v/v para dar fortaleza al bloque. Este paso es necesario hacerlo rápido ya que el polímero endurece a los 40 segundos aproximadamente.

#### **4.3.3 Cortes e Incubación con Anticuerpos**

Los bloques se cortaron a 12 µm en un micrótomo rotatorio Leica® y se colectaron secciones alternadas en una caja de 24 pocillos con agua milliQ fría (en hielo). Tener varios pocillos con listones consecutivos de la misma muestra permite tener varios tratamientos sobre secciones muy similares y comparar secciones tratadas vs. testigo o no tratadas. Una vez que se tuvieron los cortes, y una vez montados en portaobjetos, se procedió a

realizar un bloqueo utilizando Bovine Serum Albumin (BSA fracción V) al 2% en MTSB. El objetivo de este bloqueo es minimizar la unión no específica de los anticuerpos (Pasternak, Tietz, and Palme 2015) por lo que se repitió 3 veces durante 10 minutos cada una. Después se realizó la incubación con los anticuerpos primarios generados en conejo contra *t*-zeatin ribósido que fueron adquiridos de la empresa OlchemIm (Czech Republic). Los anticuerpos de OlchemIm tienen una concentración aproximada de 1 µg/µL y se prepararon en una dilución 1:100 en solución de bloqueo para realizar la incubación durante 10 minutos en vacío y durante toda la noche a 4°C seguido de 1 hora a temperatura ambiente. Se ha reportado que estos anticuerpos reconocen las bases libres de citocininas, así como sus ribósidos, ribótidos y N<sup>9</sup>-glucósidos, con reacción mínima entre las diferentes citocininas (Cassanova, 2003). Debido a la fijación específica reportada por Sossountzov (Sossountzov et al. 1988) que se mencionó anteriormente, esta metodología detecta específicamente bases libres de citocininas. Finalmente, se utilizó como anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG (H&L) de Dylight® 488 diluído 1:200 en solución de bloqueo. La incubación con el anticuerpo secundario fue durante 1 hora a temperatura ambiente para luego lavar 3 veces por 5 minutos con MTSB y montar en un portaobjetos sobre una base de medio anti-fade Fluoroshield™ de Sigma-Aldrich. Este paso se realizó bajo el estereoscopio para asegurar buena calidad de las muestras.

#### **4.3.4 Microscopía**

Las muestras en general fueron examinadas en un microscopio confocal Leica LSM 800 usando una configuración para GFP que usa el láser de 488 nm; se utilizó una potencia del 15% y un pinhole de 40 µm que equival a 1.26 Airy Units y una sección de 13.3 µm. La ganancia utilizada en el detector fue de 700 V más una ganancia digital de 5.0X para todas las muestras. Las imágenes se adquirieron y analizaron usando el software ZEN del mismo proveedor.

Para las líneas silvestres Col-0 y Ler las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal invertido LSM 510 META. La fluorescencia se excitó usando el láser de Argón a 488 nm al 15% de potencia. Las emisiones fueron filtradas a LP 575 nm y 500-550 nm, respectivamente. La ganancia del detector se ajustó a 893 y el pinhole a 118 que equivale a 1.42 Airy Units o una rebanada óptica menor a 5.3  $\mu\text{m}$ . Otros parámetros importantes son: Amplifier Offset a -0.357 y Amplifier Gain = 2.4 unidades. El análisis de estas fotografías se realizó con el software LSM Image Browser.



## 5. RESULTADOS

Durante el desarrollo de este proyecto se generaron como resultado dos metodologías para la detección y localización *in situ* de citocininas en muestras vegetales, en específico, en gineceo de Arabidopsis y tomate. Los protocolos para la inmunolocalización de citocininas (Anexo 3. Protocolo de Inmunohistoquímica) y el de imágenes por Espectrometría de Masas con MALDI (Anexo 4. Protocolo de MALDI-MS Imaging) se encuentran en los anexos al final de este documento.

### 5.1 Imágenes por Espectrometría de Masas con MALDI

#### 5.1.1 Determinación de la mejor matriz para citocininas

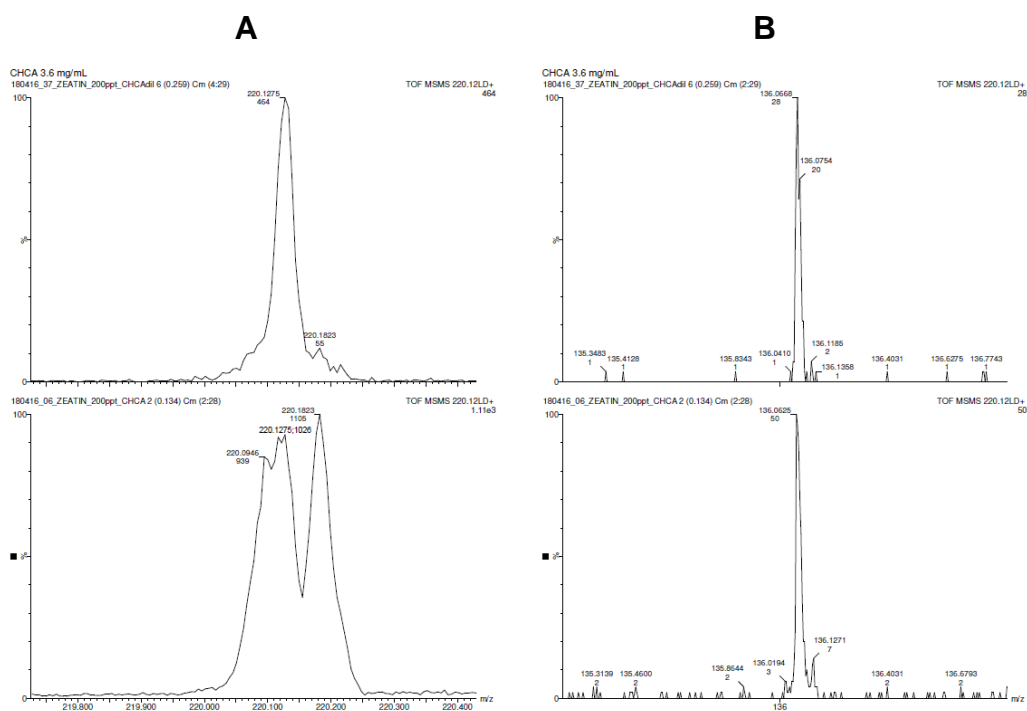
Antes de que las moléculas entren al detector de masas necesitan ser ionizadas. Esta importante función la realiza la “matriz”, que es generalmente un ácido orgánico aplicado en grandes cantidades con relación al analito. La función principal de la matriz es absorber la energía del láser (UV o IR). Esto resulta en la vaporización de la matriz que lleva consigo las moléculas del analito. Una vez vaporizada, la matriz funciona como un donador/receptor de protones, ionizando de esta manera a los analitos.

Se ha reportado que en MALDI-MS la elección de la matriz a utilizar de acuerdo al analito que se desea detectar es de suma importancia (Baker et al. 2017; Lewis, Wei, y Siuzdak 2006). Por esta razón, se realizaron pruebas de ionización de citocininas mezclando estándar de *t*-zeatina a una concentración de 2 y 0.2 ppb con las matrices más usadas: ácido dihidroxibenzóico (DHB), ácido  $\alpha$ -ciano-hidroxibenzóico (CHCA) y una “matriz universal” de Sigma-Aldrich (50149-1G-F). Para la matriz CHCA, se probaron dos concentraciones 3.6 mg/mL y 0.36 mg/mL. DHB y la matriz universal se probaron a 10 mg/mL. Los resultados de intensidad de la señal del ion 220.12 [M+H]<sup>+</sup> de la *t*-zeatina se presentan en la siguiente tabla:

Matriz	Señal $m/z=220.1275$ (cuentas)	
	Zeatina 2 ppb	Zeatina 0.2 ppb
CHCA 3.6 mg/mL	24038	1064.5
CHCA 0.36 mg/mL	21668	452
DHB	129.5	N.D.
Universal	959.5	N.D.

**Tabla 2. Intensidad de señal de *t*-zeatina en MALDI-MS con diferentes matrices.** Los valores son promedio de dos mediciones. N.D., no detectado.

Aunque la mejor señal se obtuvo al usar el CHCA concentrado, se observó que a esta concentración también se detectaba una señal proveniente de la matriz y que podía interferir con el analito. Por esta razón se determinó utilizar como señal de zeatina al ion  $m/z=136$ ,  $[M-83]^+$ , ya que esta señal estaba libre de ruido procedente de la matriz (ver Figura 5).



**Figura 5. Señal de la zeatina.** A) El ion 220 correspondiente a  $[M+H]^+$  detectado utilizando CHCA a 0.36 mg/mL (arriba) y a 3.6 mg/mL (abajo). B) Ion 136 correspondiente a  $[M-83]^+$  detectado utilizando CHCA a 0.36 mg/mL (arriba) y a 3.6 mg/mL (abajo).

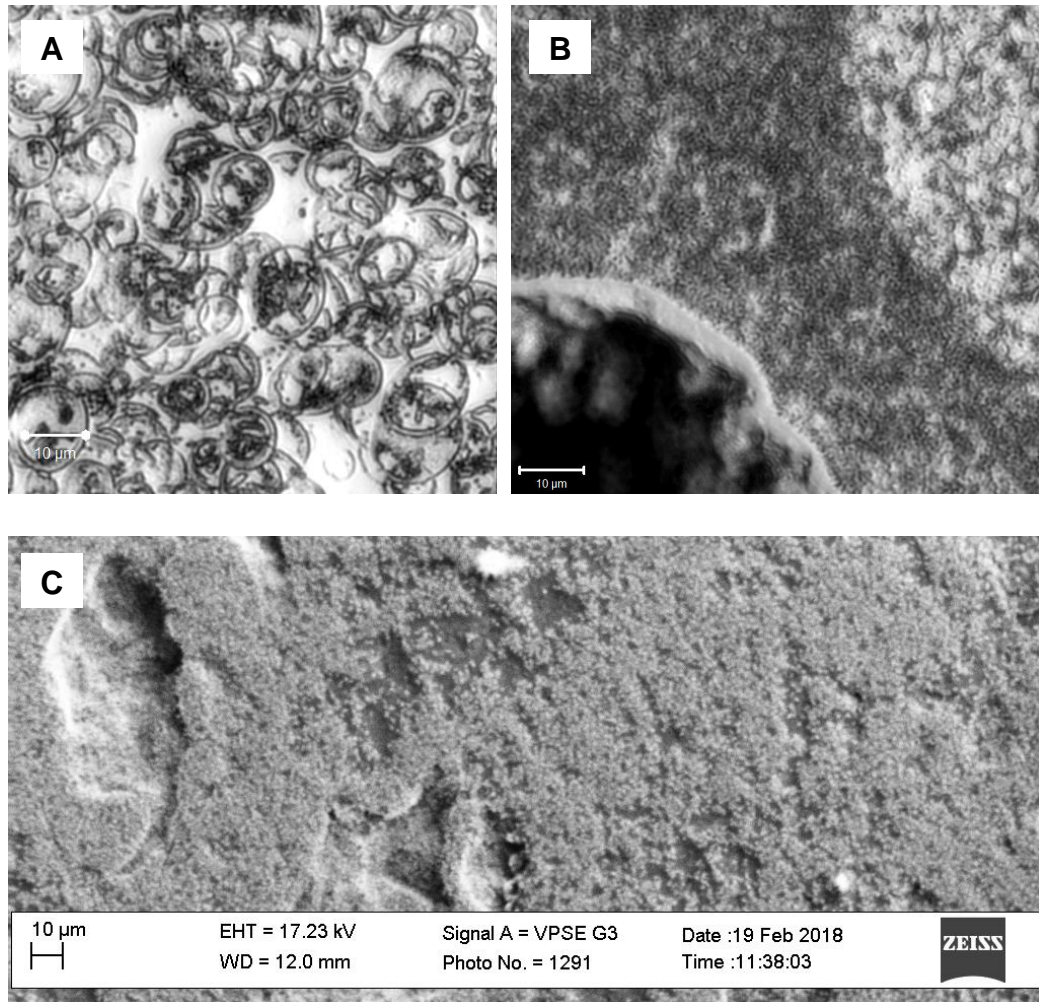
También se observó que la cristalización del CHCA es más homogénea y por lo tanto produce una señal más constante. La intensidad del láser también es un parámetro importante y se encontró que debe ser suficiente para generar la ionización de los analitos, pero no excesiva ya que puede generar ruido innecesario. La intensidad del láser se fijó en 250 unidades arbitrarias para las pruebas con estándares y en 350 para las imágenes de tejido.

### 5.1.2 Límite de detección de Citocininas

Es de conocimiento general que las citocininas se encuentran en concentraciones muy bajas en los distintos tejidos de las plantas (Plačková et al. 2017) incluyendo el gineceo, en el cual se han reportado niveles de pmol/g de peso húmedo (Bartrina et al. 2011). Por esta razón, uno de los primeros objetivos antes de realizar MALDI-Imaging de gineceo de tomate, fue determinar el límite de detección de las citocininas, particularmente de *t*-zeatina. Primeramente, se optimizó la señal de la *t*-zeatina utilizando la función EDC (Enhanced Duty Cycle), la cual aumenta 10 veces la señal del ion seleccionado. Se observó también que un análisis MS/MS no genera un incremento importante en la señal del ion buscado, sin embargo, sí presenta una mayor selectividad al permitir monitorear un ion fragmento de la molécula buscada. Por esta razón, se llevó a cabo un análisis MS/MS del ion  $m/z=220.12$  y se optimizó la energía de colisión en la trampa (Trap CE) para la generación del ion-hijo  $m/z=136.08$   $[M-83]^+$  el cuál no presentaba ningún ion de la matriz cerca. Posteriormente, se realizaron pruebas con concentraciones decrecientes de *t*-zeatina para conocer el límite de detección del equipo con los parámetros optimizados y específicos. El límite de detección fue de <200 femto gramos, o sea <0.91 attomol de zeatina en placa.

### 5.1.3 Métodos de Aplicación de Matriz

En MALDI Imaging, la deposición de una matriz sobre la superficie de la muestra cumple varias funciones, en particular: (i) extracción de los analitos desde la superficie de la muestra, (ii) co-cristalización de analitos y matriz, y (iii) absorción de la energía del láser ayudando a la desorción de las moléculas desde la superficie hacia la fase gaseosa, donde eventualmente ocurre la ionización. Para este trabajo se probaron dos métodos de aplicación de matriz: micro-spray y sublimación. Se sabe que el tamaño de los cristales de matriz sobre la muestra es uno de los factores limitantes para la resolución espacial a la hora de realizar imágenes de MALDI (Y. Chen et al. 2008). Por esta razón, se aplicó matriz sobre las superficies que serían utilizadas para montar las muestras de gineceos para MALDI-Imaging por ambos métodos de aplicación y se observaron al microscopio. Los cristales de CHCA presentan una morfología circular, como se ha reportado anteriormente (Gemperline, Rawson, y Li 2014). En ambos casos, sublimación y micro-spray, el tamaño de los cristales fue  $<10\ \mu\text{m}$ , de tal manera que fue necesario utilizar el microscopio electrónico de barrido para tratar de medir los cristales. Se concluyó que la técnica de sublimación genera cristales más uniformes sobre la superficie de vidrio de los portaobjetos, mientras que la técnica de micro-spray produce mejores resultados para las placas metálicas de MALDI-Imaging (ver Figura 6). Ambas técnicas funcionan para cubrir la muestra de matriz, en el caso del micro-spray depositando  $720\ \mu\text{g}$  de CHCA en un área de  $3\ \text{cm}^2$ . Para la sublimación, se pesó el portaobjetos antes y después de la aplicación durante 10 minutos encontrando que se depositaron aproximadamente  $0.2\ \text{mg}$  de matriz por  $\text{cm}^2$  de superficie.



**Figura 6. Cristales de CHCA vistos al microscopio.** En A, los cristales fueron aplicados sobre un portaobjetos con la técnica de micro-spray. En B, los cristales fueron aplicados con sublimación por 10 minutos, ambas vistas en microscopio LSM 510. C, es la misma muestra que B, pero vista al microscopio electrónico (Zeiss EVO 40).

#### 5.1.4 Obtención de Muestras de Gineceo de Tomate

En lo relacionado con las muestras biológicas de tomate, se observó un marcado fenotipo por parte de la línea sobre-expresante para degradación de citocininas *35S::CKX2* ya que es evidente su crecimiento retardado y además sus hojas son más pequeñas y no son dentadas como el fenotipo silvestre, Micro-Tom. En la Figura 7 se puede observar lado a lado una planta

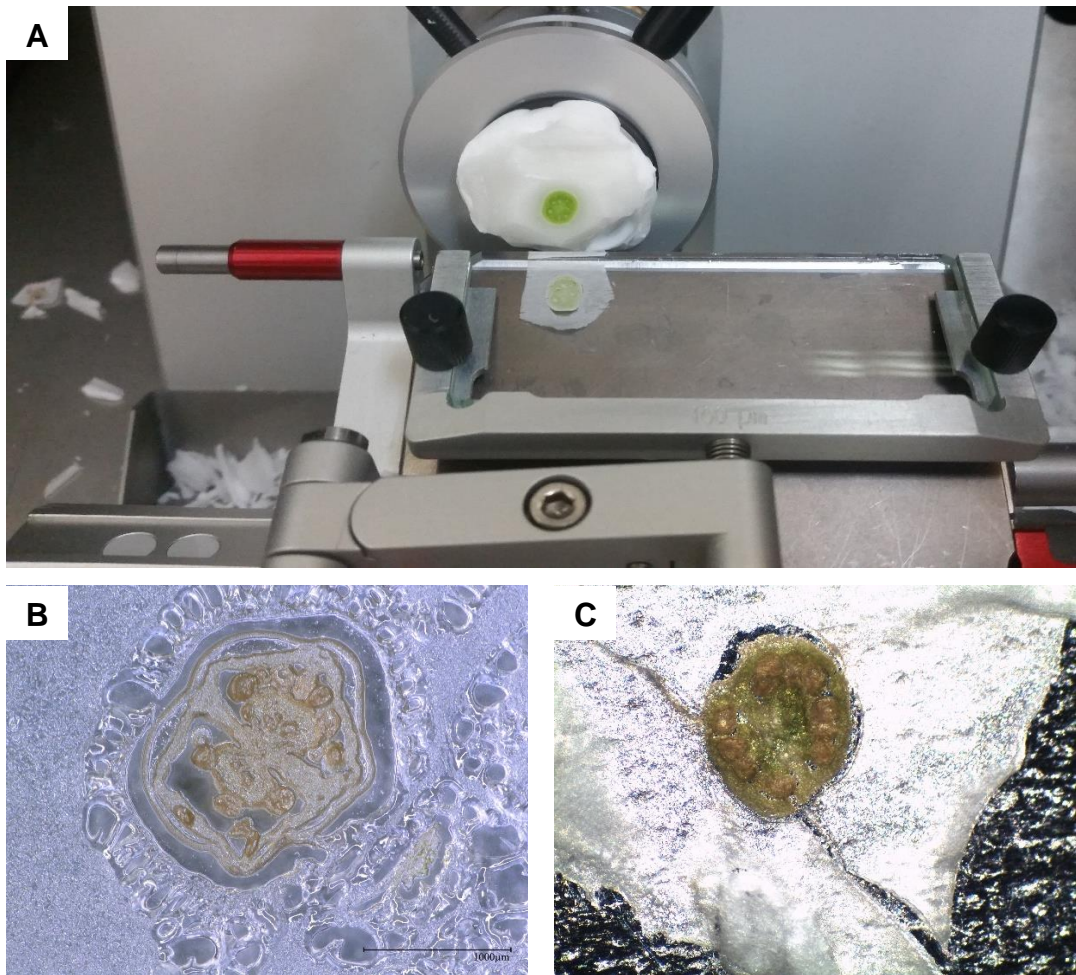
Micro-Tom y una *35S::CKX2* ambas de 4 semanas. Aunque retardado, la línea sobre-expresante de *CKX2* desarrolla inflorescencias y flores, que fueron utilizados para las pruebas de MALDI-MSI.



**Figura 7.** Fenotipo de la línea sobre-expresante de *35S::CKX2* para degradación de citocininas (izquierda) y variedad Micro-Tom (derecha).

Con respecto a la realización de secciones para realizar sobre ellas la espectrometría de masas por MALDI y generar las imágenes, se probaron tres materiales para embeber el tejido: i) agua MiliQ, ii) gelatina al 10% y iii) carboximetilcelulosa de sodio (CMC) al 3%. Con todos los materiales la velocidad de congelamiento es importante para que no se formen cristales y sea difícil realizar las secciones en el criostato. Por esta razón se realizó el congelamiento poniendo el bloque metálico con la muestra sobre nitrógeno líquido, aunque sin sumergirla. La gelatina y la CMC resultaron ser materiales útiles para realizar las crio-secciones de la muestra. Sin embargo, no se pudieron realizar cortes de calidad cuando el material estaba embebido solamente en agua MiliQ. Se encontró que la temperatura de corte es un factor clave para la correcta realización de los cortes, ya que si la temperatura era muy baja (-25,-30°C), la muestra se deshacía al intentar cortar. Por otro lado, si la temperatura es muy alta (-10, -15°C), la muestra se empieza a

descongelar y se separa del soporte a la hora de hacer el corte. Se encontró que la temperatura óptima es de entre  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $-22^{\circ}\text{C}$ . El ángulo de corte también es un parámetro importante, encontrando que al utilizar  $0^{\circ}$  se obtienen los mejores cortes. Aunque ambos materiales, gelatina y CMC funcionaron bien para los cortes, la CMC al 3% fue el soporte de elección ya que la gelatina presentaba secciones muy irregulares con burbujas tipo cráter (ver Figura 8).



**Figura 8. Crio-sección de Gineceos de Tomate.** A es un ejemplo de corte de buena calidad realizado con CMC en criostato Leica CM 1860. B está embebido en gelatina al 10% y muestra burbujas mientras que C está embebido en 10% CMC. Los cortes son de 25  $\mu\text{m}$  de espesor.

Como se describió anteriormente, ambos métodos de aplicación de matriz, sublimación y micro-spray presentaron buenos resultados, logrando una aplicación uniforme de la matriz y cristales menores a 10  $\mu\text{m}$ , que está por debajo de la resolución del equipo Synapt para MALDI Imaging. La Figura 9 muestra las imágenes de estereoscopio de los gineceos de tomate antes y después de aplicar la matriz por el método de micro-spray.



Figura 9. Fotografías de gineceos de tomate antes (izquierda) y después (derecha) de aplicar matriz para MALDI (CHCA).

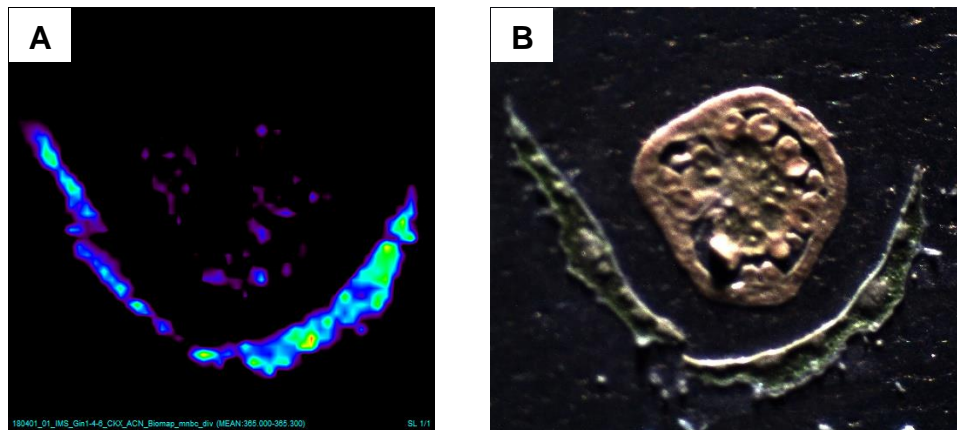
### 5.1.5 Generación de Imágenes de MALDI-MS

Una vez que se hubieron determinado los parámetros óptimos para la detección de citocininas por MALDI-MS y que se obtuvo el método de preparación de muestras de gineceo de tomate, se procedió a la introducción



de las muestras al equipo Synapt G1 (Waters, UK). Los datos de MSI se trataron usando el software Biomap (open source) y en menor medida el software HDI (Waters, UK). Para el tratamiento de datos se normalizó todo el espectro con respecto a un ion conocido de la matriz para después generar las imágenes correspondientes de los iones de la muestra.

Lo primero que se observó es que existen iones específicos por tejido; por ejemplo, el ion  $m/z=365$  se detecta en los sépalos (Figure 10), pero no en el gineceo mientras que otros iones se detectan tanto en sépalos como en gineceo. Aunque no es el propósito de este trabajo, la ubicación específica de algunos iones pudiera ser interesante para un estudio metabolómico/bioinformático en el futuro ya que los datos quedan disponibles para su uso.

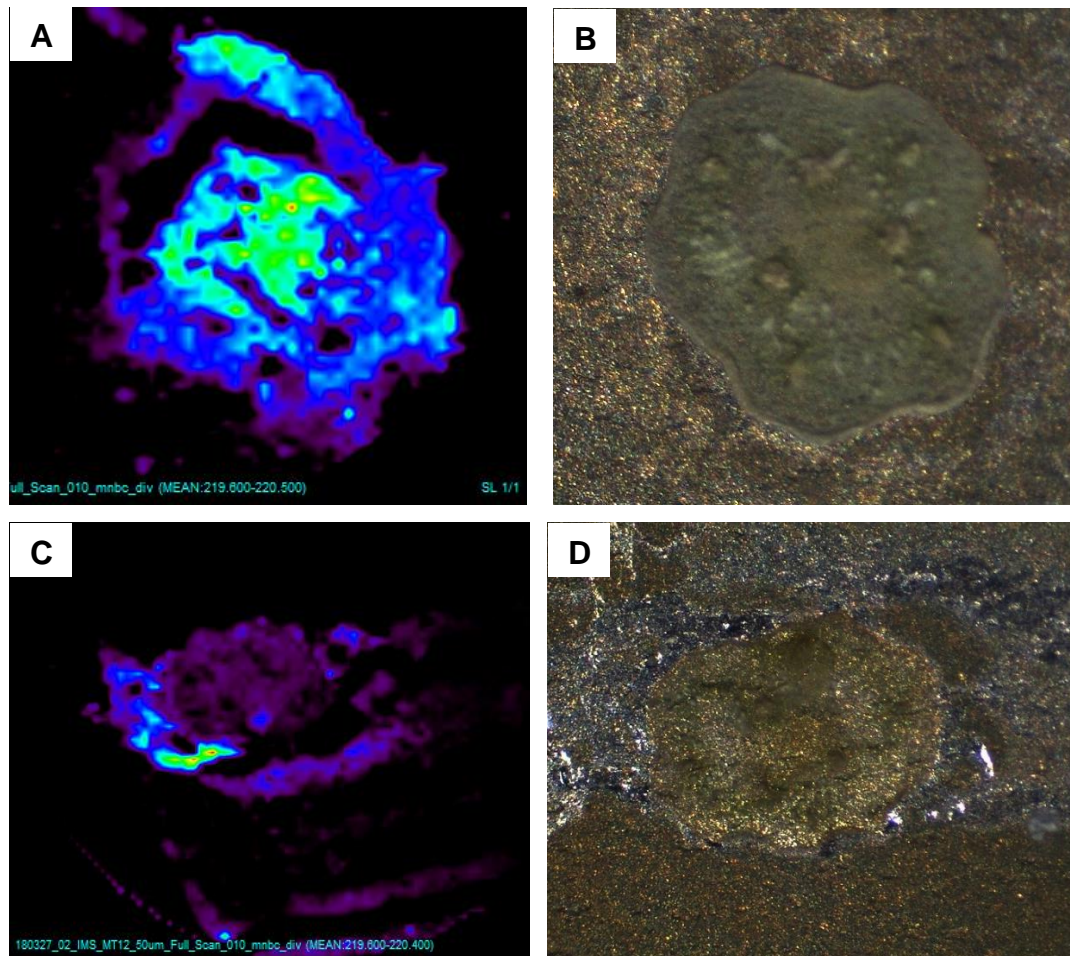


**Figura 10. Ion 365 positivo mostrando localización tejido-específica.** A) Imagen de MALDI-MS de la intensidad del ion 365. B) Imagen óptica de la muestra.

Con respecto a las citocininas, se realizaron dos análisis para cada muestra de gineceo: un análisis pseudo-dirigido haciendo un barrido desde 120-4000  $m/z$  pero con EDC en la  $m/z=220.12$ ; y otro específico realizando un experimento MS/MS sobre el ion  $m/z=220.12$  y con energía de colisión optimizada para generar el fragmento  $m/z=136.08$  correspondiente a la fracción de adenina de la zeatina.

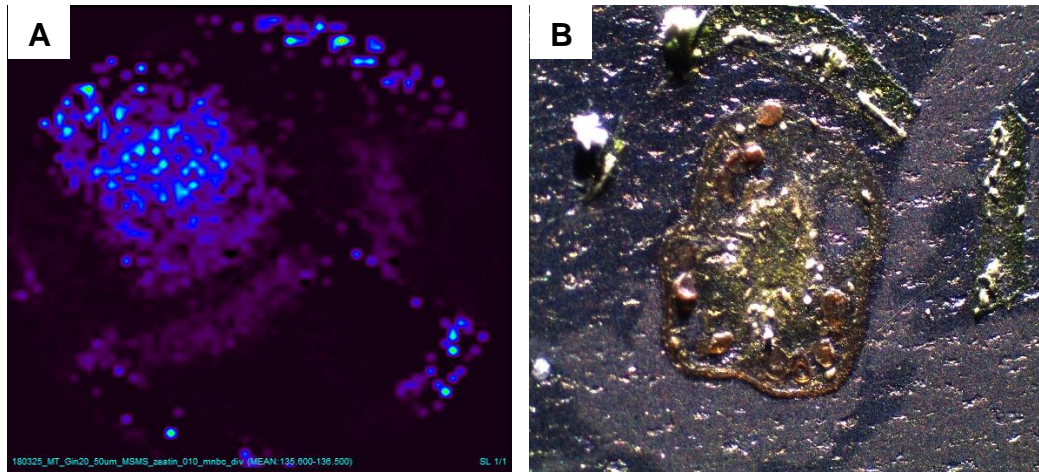
En el análisis “Full Scan” de las muestras de gineceo silvestre MT, se presentó señal del ion 220.12 positivo en las muestras 15 y 12

correspondientes a estadios jóvenes del desarrollo del gineceo (Figura 11). Estas imágenes se tomaron con una resolución espacial de 50  $\mu\text{m}$  por pixel.



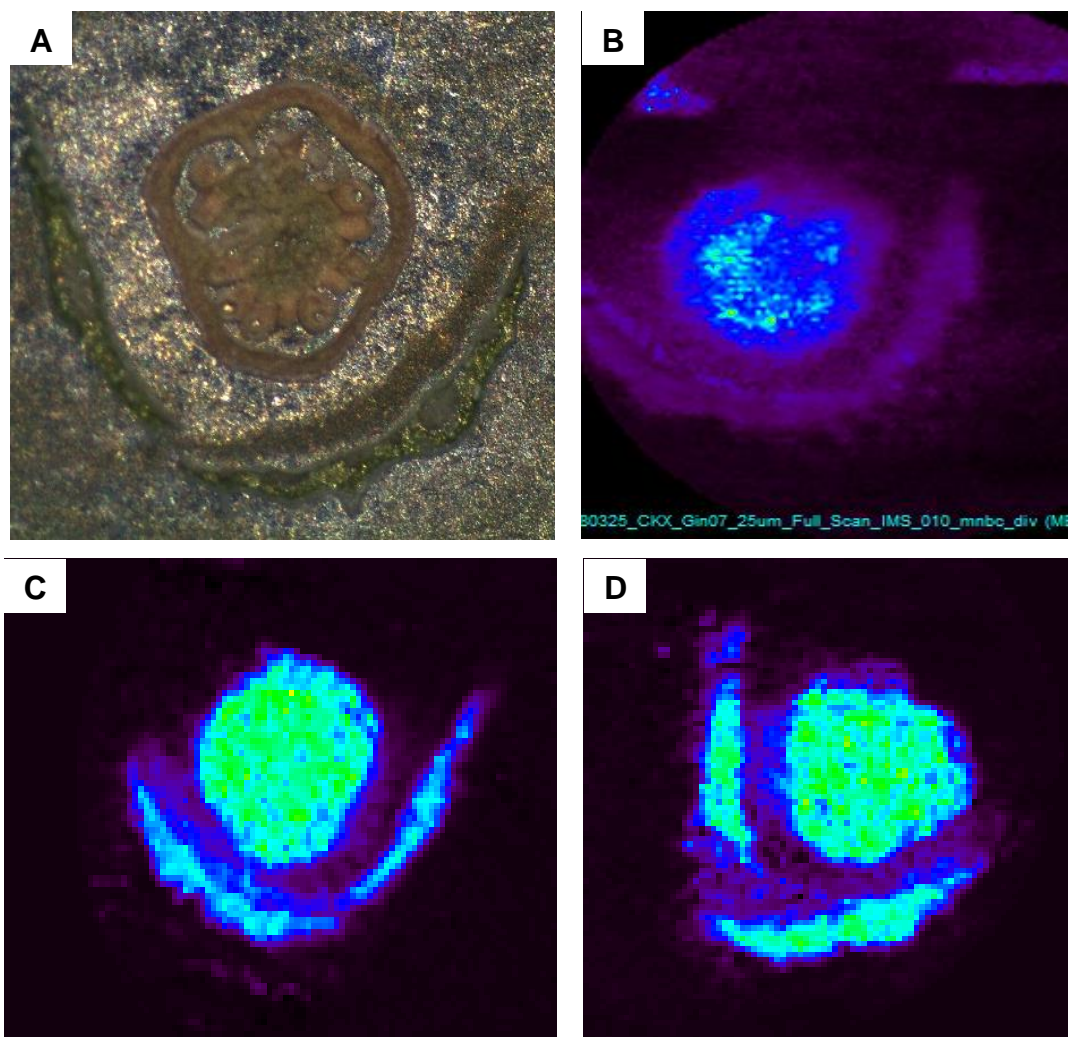
**Figura 11. Localización del ion 220 positivo en dos muestras de gineceo de tomate.** A y C) muestran la localización del ion 220 en una imagen de MALDI-MS de las muestras 15 y 12, respectivamente. B y D) Imagen óptica de las muestras 15 y 12 respectivamente.

De igual manera, el análisis específico MS/MS detectó al ion  $m/z=136.08$  positivo en la muestra 20 de la variedad MT (silvestre) (Figura 12).



**Figura 12. Imagen del ion 136 positivo en un análisis MS/MS sobre una muestra de gineceo de tomate. A) Localización del ion 136.08 en la muestra MT20, B) Imagen óptica de una sección de la misma muestra.**

Sorprendentemente, para la variedad degradadora de citocininas también se encontró señal de los iones de zeatina, particularmente para las muestras 1, 4 y 7 (Figura 13).



**Figura 13. Imagen del ion  $m/z=220$  positivo en las muestras  $35S::CKX2$  de gineceos de tomate. A) Imagen óptica, B) muestra 7, C) muestra 4 y D) muestra 1.**

En el análisis MS/MS la muestra 8 de la línea  $35S::CKX2$  presentó señal del ion 136.08 tanto en sépalos como en gineceo (Figura 14):

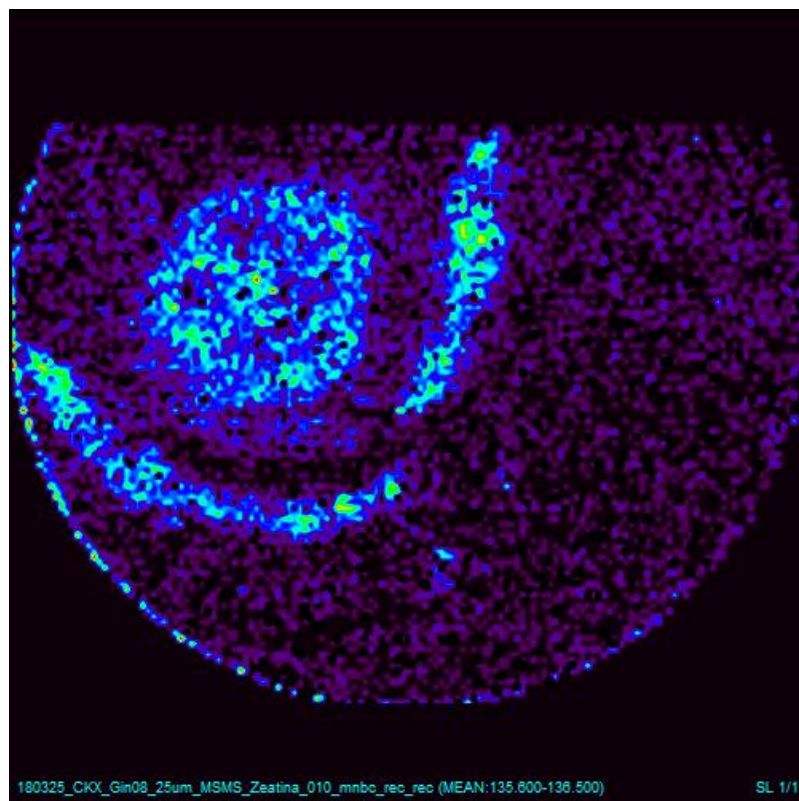


Figura 14. Señal del ion 136.08 en una análisis MS/MS de una muestra de gineceo de tomate 35S::CKX2.

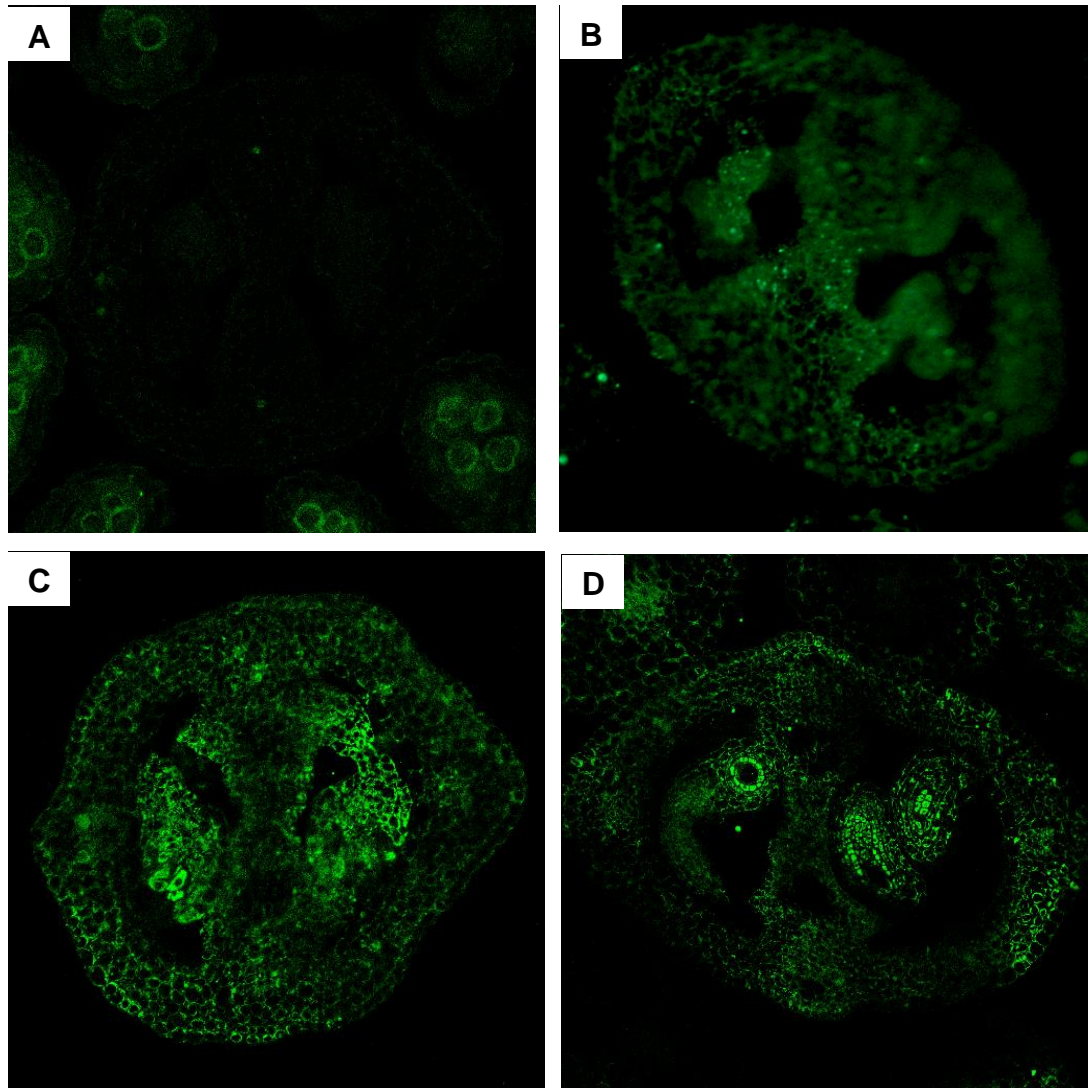
## 5.2 Inmunolocalización de Citocininas en *Arabidopsis thaliana*

### 5.2.1 Variedades silvestres *Col-0* y *Ler*

La inmunolocalización de citocininas -en específico *t*-zeatina- en las variedades silvestres de *A. thaliana* presentó una intensa fluorescencia a comparación del control como se puede observar en la Figura 15. El control negativo fue una muestra tratada exactamente igual que las demás, excepto el anticuerpo primario, y muestra ligera auto-fluorescencia, principalmente en polen.

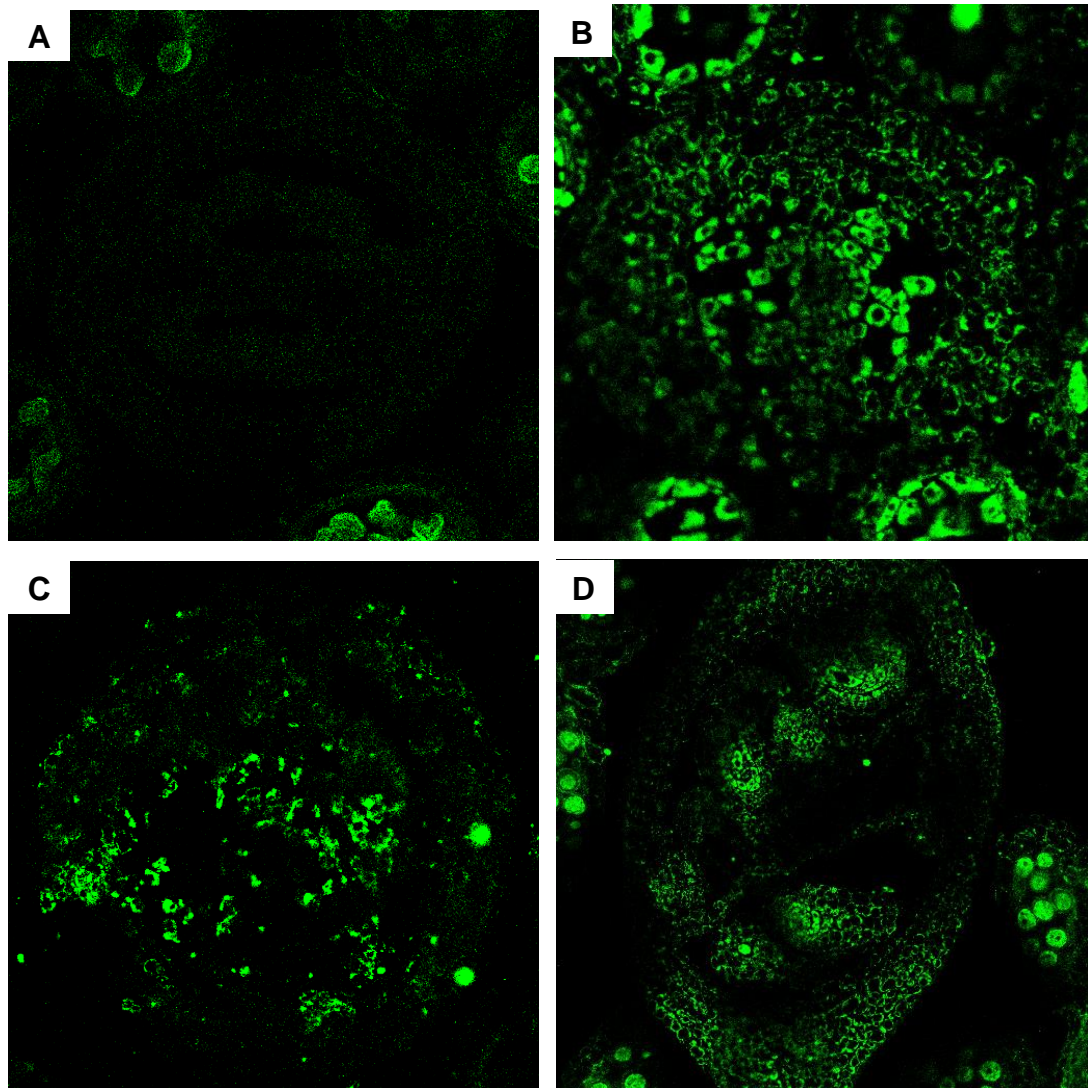
Para el ecotipo *Col-0* se encontró señal en todos los estadios de desarrollo del gineceo; apareciendo muy uniforme en etapas tempranas y un poco más

definida hacia óvulos cuando el gineceo se ha formado por completo (Figura 15).



**Figura 15** Inmunolocalización de *t*-zeatina en *A. thaliana* (Col-0). A) Control sin anticuerpo primario, B) Gineceo en etapa 9, C) Gineceo en etapa 10, D) Gineceo en etapa 13.

El ecotipo Ler presentó ligeramente menor intensidad de señal para *t*-zeatina que Col-0, aunque el patrón de localización se conserva principalmente en óvulos para gineceos maduros y uniformemente distribuida en estadios más jóvenes (Figura 16).

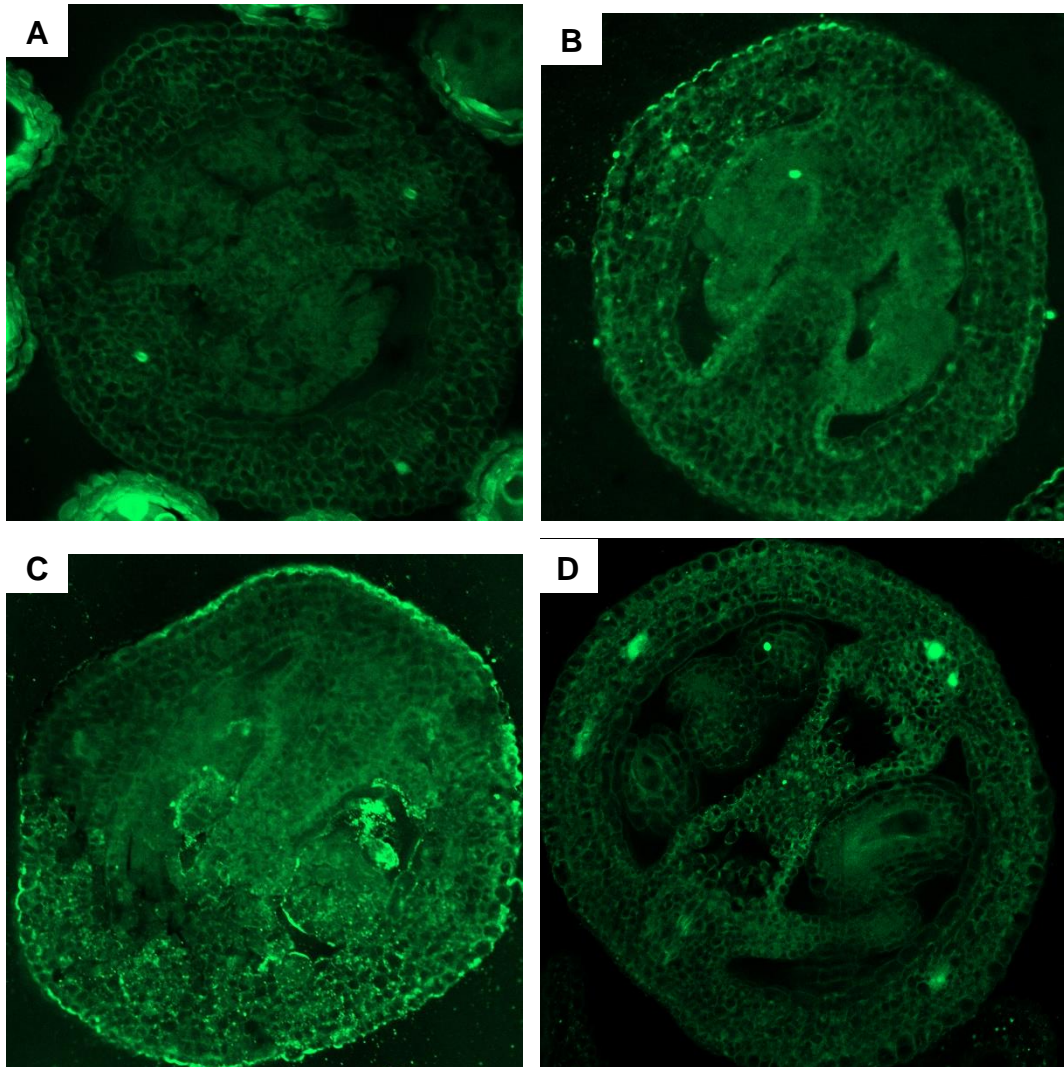


**Figura 16. Inmunolocalización de *t*-Zeatina en *A. thaliana* (Ler).** A) Control sin anticuerpo primario, B) Gineceo en etapa 8, C) Gineceo en etapa 10, D) Gineceo en etapa 13.

### 5.2.2 Inmunolocalización *t*-zeatina en *35S::AHP6*

La sobre-expresante del gen represor de citocininas *AHP6* está en el fondo Col-0. Se observó señal intensa de inmunolocalización de *t*-zeatina en las muestras de gineceos maduros. En la Figura 17 se puede observar cómo la

señal de fluorescencia se concentró en algunas zonas del contorno de las células, así como el contorno del gineceo.



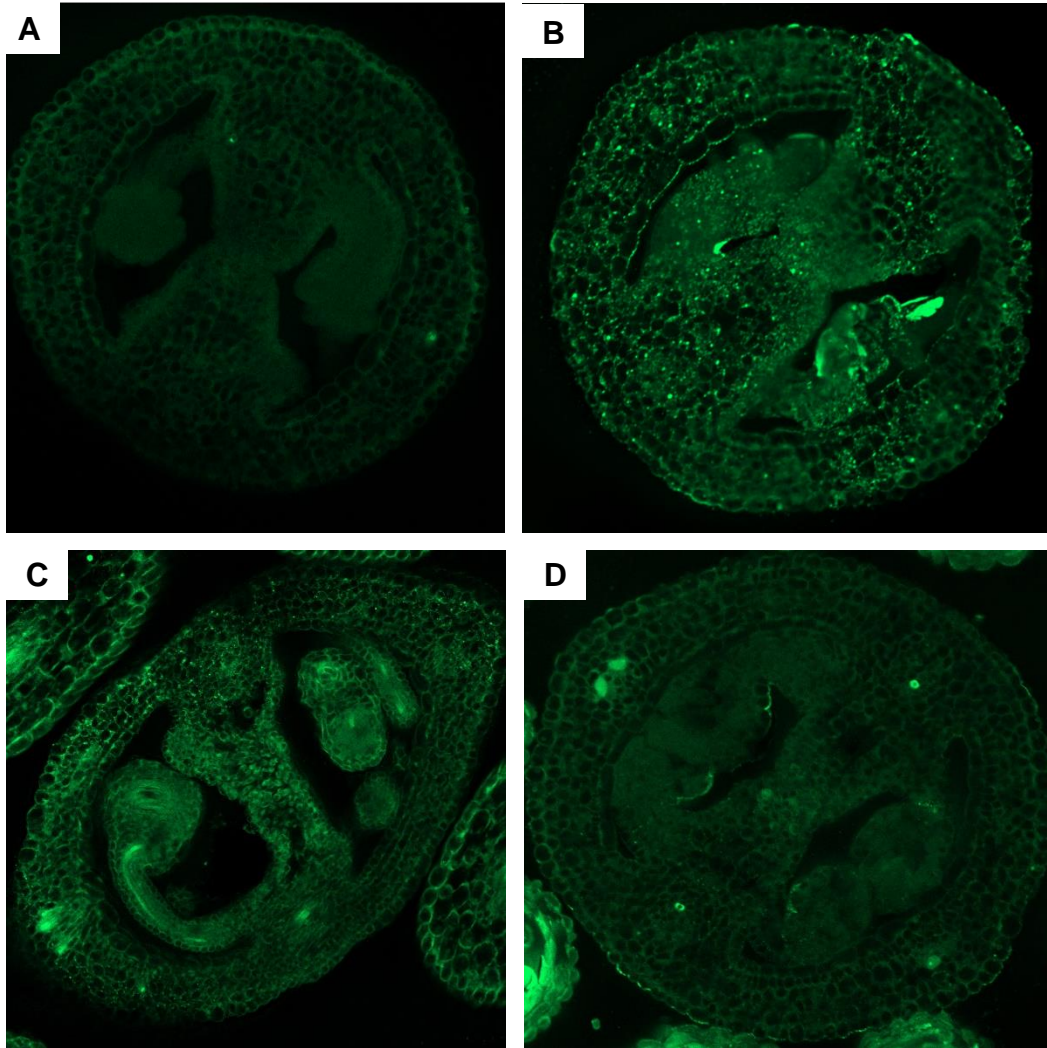
**Figura 17.** Inmunolocalización de *t*-zeatina en *35S::AHP6*. A) Control, B) Señal de inmunolocalización en gineceo etapa 9, C y D) Señal de *t*-zeatina en gineceos maduros de la sobre-expresante de *AHP6*.

### 5.2.3 Inmunolocalización de *t*-Zeatina en *ahp6*

En las muestras de la mutante *ahp6* la señal de inmunolocalización de *t*-zeatina se aprecia claramente a lo ancho de todo el gineceo en una etapa temprana, pero al parecer la señal desaparece conforme el gineceo se



desarrolla (Figura 18). También se observa señal de auto-fluorescencia en los haces vasculares del control, sin embargo, en las muestras la señal es más intensa.

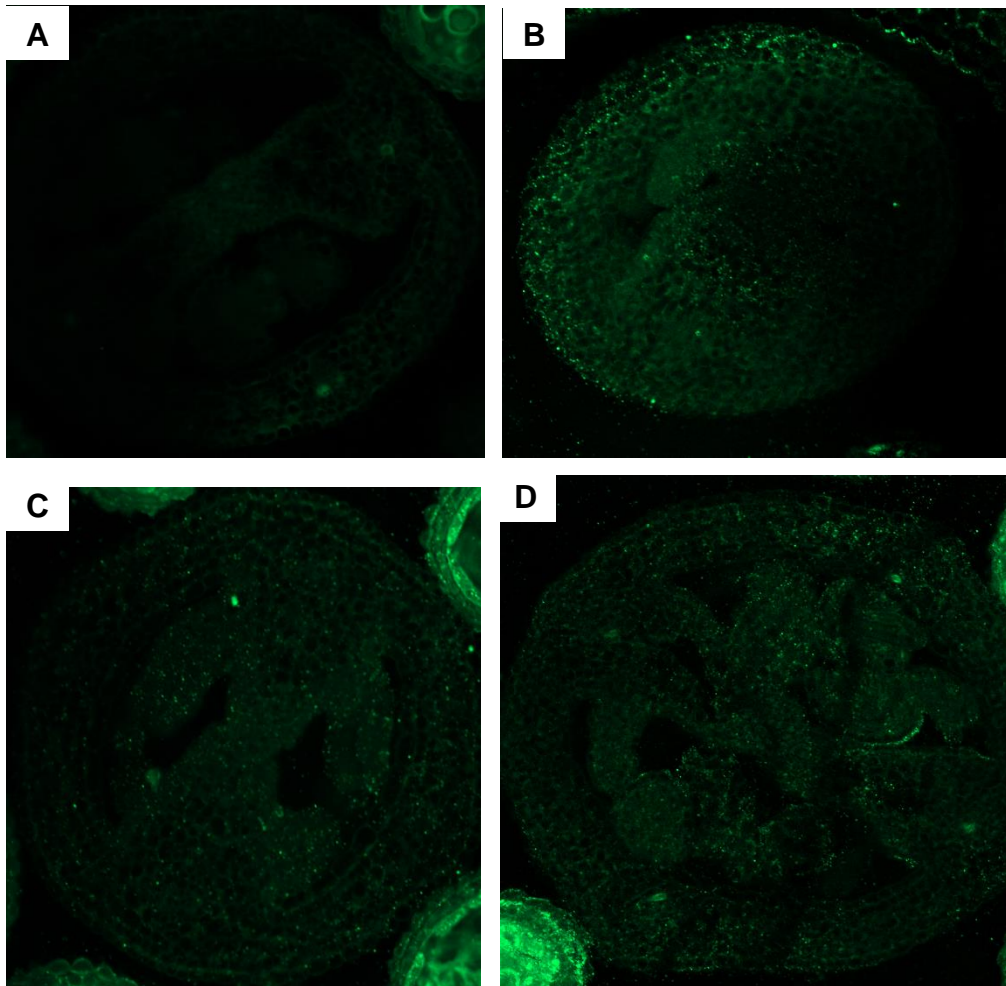


**Figura 18. Inmunolocalización de *t*-zeatina en *ahp6*.** A) Control, B) Señal fluorescente de inmunolocalización de *t*-zeatina en un gineceo en etapa 9 de la muestra *ahp6*. C, D) Señal de *t*-zeatina en gineceos maduros de mutante *ahp6*.

#### 5.2.4 Inmunolocalización *t*-zeatina en *35S::SPT*

En la sobre-expresante de *SPT* la inmunolocalización de *t*-Zeatina muestra señal ubicua en todo el gineceo desde etapas tempranas hasta en gineceos

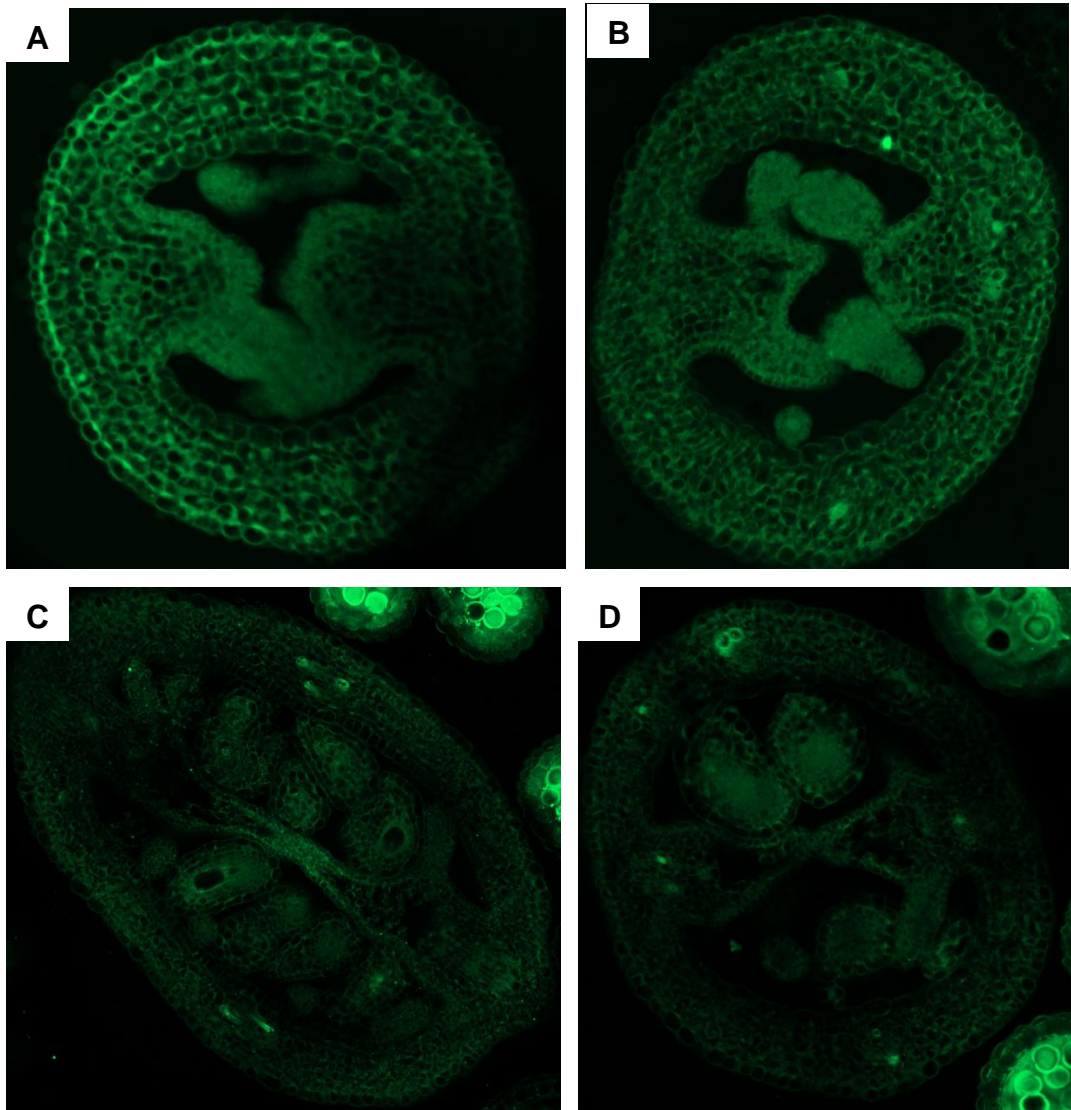
maduros (Figura 19). La señal se observa muy localizada como puntos fluorescentes a lo largo y ancho de la muestra.



**Figura 19. Inmunolocalización de *t*-Zeatina en *35S::SPT*.** A) Control, B) Señal de *t*-zeatina en gineceo en etapa 10. C, D) Señal de *t*-zeatina en gineceos en etapas de la sobre-expresante de *SPT*.

### 5.2.5 Inmunolocalización de *t*-zeatina en la mutante *spt-2*

En la mutante *spt-2* parece que no se detectó señal de fluorescencia de la inmunolocalización de *t*-zeatina en ninguna etapa del desarrollo del gineceo (Figura 20).



**Figura 20. Inmunolocalización de *t*-zeatina en la mutante *spt-2*.** A) Control, B), C) y D) muestras de inmunolocalización de *t*-zeatina en gineceos de la mutante *spt-2*.

## 6. DISCUSIÓN

Conocer el patrón de localización de elementos específicos, como lo son, la expresión génica o la presencia de metabolitos, es sumamente valioso y permite elucidar la función de éstos en una muestra biológica (Korte et al. 2012). Compuestos tan interesantes como las fitohormonas—entre ellas las citocininas—han llamado particularmente la atención desde los inicios de su estudio, de modo que se han hecho múltiples esfuerzos para localizar y cuantificar su presencia en diversos tejidos de las plantas (Prinsen et al. 1995; Zavala and Brandon 1983; Antoniadi et al. 2015). Quizás uno de los recursos más valiosos para la localización de citocininas *in planta*, sea el reportero sintético *TCS*, que permite visualizar la respuesta transcripcional a la señalización de citocininas (Muller y Sheen 2008). Utilizando *TCS::GFP* se ha estudiado el desarrollo del gineceo en plantas modelo como lo son *Arabidopsis thaliana* y tomate, permitiendo elucidar un posible rol de las citocininas en la formación del gineceo y del fruto (Marsch-Martínez et al. 2012; Celso-Espinoza & de Folter, no publicado). Sin embargo, se sabe que las citocininas son compuestos móviles, y que su sitio de síntesis no necesariamente corresponde a su lugar de acción o señalización; además, los transcritos de *CKX* incluso han sido utilizados para mostrar presencia y patrón de localización de citocininas (Bartrina et al. 2011). Es por estas razones que en el presente trabajo se buscó desarrollar dos metodologías que permitieran visualizar la presencia y patrón de localización de las citocininas en el gineceo, tanto de *Arabidopsis* como de tomate. Se decidió utilizar MALDI-MS Imaging para la localización de *t*-zeatina en el gineceo de mayor tamaño: el de tomate, debido a que la técnica presenta una limitación en cuanto a la resolución espacial (máximo 25  $\mu\text{m}$ ). También, se desarrolló una técnica de inmunohistoquímica para la localización de *t*-zeatina en gineceos de *A. thaliana*.

## 6.1 MALDI-MS Imaging

A pesar de las dificultades técnicas que presenta la metodología—principalmente en cuanto a preparación de la muestra—se pudieron obtener imágenes de masas de los iones correspondientes a zeatina con relativamente alta certeza. Aunque una de las ventajas de la técnica de MALDI-MSI es que se puede hacer un análisis no direccionado en un barrido de masas que detecte un amplio número de compuestos en la misma muestra y en la misma adquisición de datos (Full Scan), este análisis no es específico y sólo permite obtener una identificación de compuestos probables de acuerdo con su masa exacta. Para tener una identificación más certera se debe de realizar un análisis tipo MS en tándem o MS/MS que permite fragmentar un ion seleccionado y monitorear los iones “hijo” producidos por el rompimiento. El problema con este tipo de análisis es que la prueba es destructiva y el equipo Synapt G1 (Waters, UK) no permite monitorear más de un ion a la vez en modo MALDI Imaging. Por esta razón se tienen dos tipos de análisis para dos secciones consecutivas pero distintas de una misma muestra: uno no dirigido que nos permite obtener datos de la localización de muchos compuestos putativos; y otro específico para zeatina, que permite tener mayor certeza sobre la localización de esta molécula en específico.

Es notoria la sensibilidad de la técnica de MALDI-MS. Al menos, en lo que se refiere a citocininas. Se hicieron pruebas hasta el rango de attomol, en el cuál se sigue observando señal del estándar de *t*-zeatina. Cabe mencionar que esto no es igual para todos los metabolitos y que es probable que la sensibilidad para auxinas, por ejemplo, sea menor debido al modo de ionización (negativo en lugar de positivo).

A pesar de que en este trabajo se realizó la preparación de las muestras a bajas temperaturas y cuidando siempre evitar la degradación de las

moléculas de citocininas, es probable que estas moléculas sean más estables de lo que se piensa comúnmente. Se ha llegado a observar que la 6-BAP es estable en solución acuosa a temperatura ambiente hasta por 6 meses, degradándose solo un 10% (Jaime Valverde, comunicación personal). Esto respalda el hecho de que, a pesar de la preparación relativamente brusca de la muestra de gineceo, aún se puede observar señal de citocininas, tanto en MALDI-MS como en inmunohistoquímica.

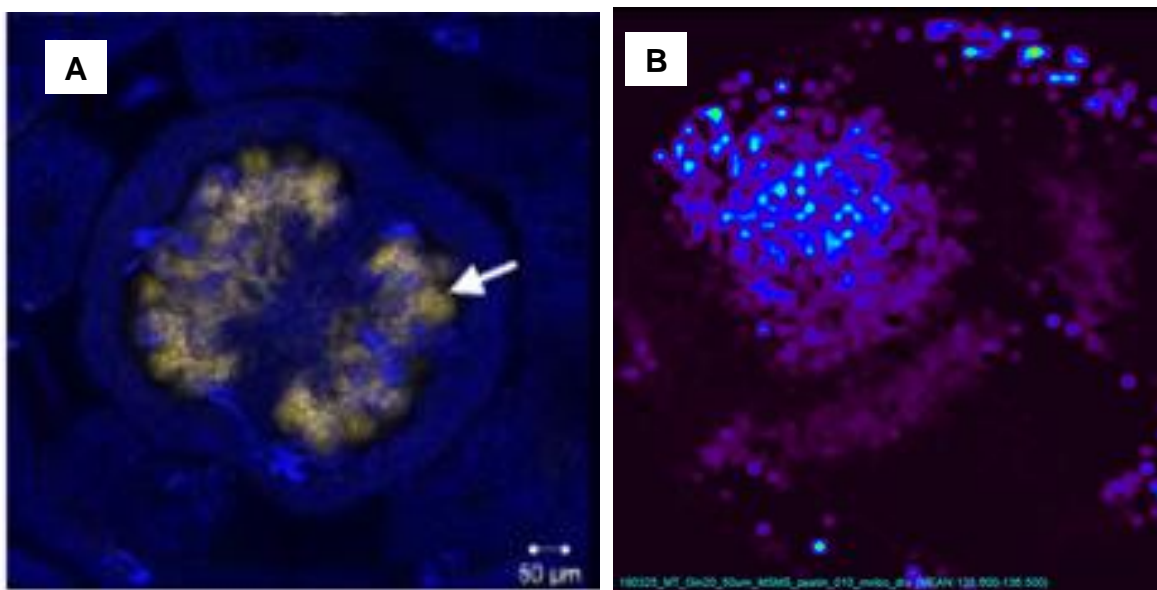
Una ventaja importante que presenta la técnica de MALDI-MSI es la rapidez en la preparación de la muestra. Una vez que se corta la inflorescencia, embeber en CMC y congelar es un paso muy rápido. Aunque es recomendable dejar la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$  por unas horas (en nuestro caso fue toda la noche), en teoría se puede llevar al criostato y cortar inmediatamente. Dependiendo de la cantidad de muestras que se quieran preparar, la realización de cortes puede tardar desde unos minutos hasta varias horas. Para la aplicación de matriz, una vez que se tienen montados los aparatos, el proceso tarda 5 minutos por muestra para micro-spray y 10 minutos para sublimación; aunque por sublimación se pueden preparar varias muestras a la vez. Una vez preparada la muestra, la adquisición de datos es programada y automatizada. El tiempo que se requiere para realizar una imagen de MALDI-MS, así como el tamaño del archivo crudo van a depender de la resolución espacial utilizada y del tamaño de la muestra. En el caso de gineceos de tomate, el tiempo aproximado de adquisición de datos es de 4-6 horas con una resolución de 50  $\mu\text{m}$ . El tamaño de los archivos en promedio es de 1-3 GB para los archivos Full Scan y 200-400 MB para los archivos MS/MS.

### **6.1.1 Imágenes de MALDI-MS de Tomate silvestre (Micro-Tom)**

Aunque se observó señal del ion 220 positivo en un análisis Full Scan de muestras de gineceo de tomate variedad Micro-Tom (MT), la calidad de los

cortes no fue la óptima ya que no se observan claramente los distintos tejidos característicos del gineceo y por lo tanto las imágenes no son muy específicas. Aunque la resolución de 50  $\mu\text{m}$  es suficiente para diferenciar a grandes rasgos entre las distintas zonas del gineceo, el gráfico tipo “mapa de calor” de iones para generar la imagen de MALDI-MS pierde resolución y es complicado compararlo contra una imagen óptica. La mejor manera de hacer una comparación será sobreponiendo ambas imágenes (óptica y de MALDI-MS) de manera que sobresalga la máxima intensidad de los iones y ver si corresponde con algún tejido específico. Al monitorear el ion 220.12 positivo en un análisis no dirigido es posible que algún otro compuesto esté siendo graficado con la zeatina, ya que en la muestra 12 (**Error! Reference source not found.**) se observa una deslocalización del ion por fuera de la muestra. Esto también podría ser una deslocalización del analito causada al realizar los cortes.

El análisis MS/MS es más específico y detectó señal en la muestra 20 de la variedad MT. Se observa la señal localizada ubicuamente en todo el gineceo, pero con más intensidad en la parte central correspondiente al séptum. Esto no coincide con la señal de TCS que se ha observado en tomate (Celso-Espinoza y de Folter, sin publicar) principalmente en óvulos, placenta y con baja intensidad precisamente en el séptum (Figura 21).



**Figura 21. Comparación entre la localización de *TCS* y MALDI-Imaging.** A muestra una imagen de la localización de *TCS::VENUS* en un gineceo de tomate (Celso-Espinoza, sin publicar). B es una imagen MS/MS del ion correspondiente a un fragmento de zeatina en una muestra de gineceo de tomate.

Aunque la calidad de imagen del MALDI-MS dista mucho de ser óptima, se observa que el patrón de localización de la molécula de zeatina es distinta que el patrón de localización de la respuesta transcripcional a citocininas reportado por el *TCS*.

### 6.1.2 Imágenes de MALDI-MS de Tomate *35S::CKX2*

La señal detectada para el ion  $[220.12]^+$  en las muestras de la sobre-expresante constitutiva del gen *CKX2* es intensa en todo el gineceo e inclusive en los sépalos. También en el análisis MS/MS se detectó al ion  $[136.07]^+$  fragmento confirmado para la zeatina. La hipótesis original al utilizar estas muestras era que presentarían menor señal que las líneas silvestres o incluso ausencia de señal de citocininas debido a la degradación que estas estarían sufriendo por la acción de la proteína *CKX2*. Sin embargo, también se ha reportado que, al menos en *Arabidopsis*, es necesaria una doble mutante para observar los efectos de la degradación de las citocininas por



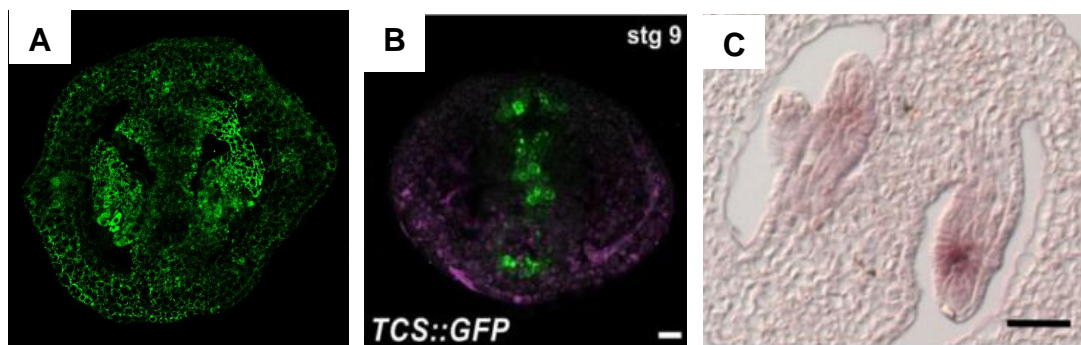
estas oxidasas (Bartrina et al. 2011; Werner et al. 2003). Además, se observó en nuestras plantas que recuperan el fenotipo silvestre y una vez que empiezan a producir flores y frutos estos son muy semejantes a la línea MT, así que es probable que por algún mecanismo la planta esté respondiendo a la sobre-expresión de este gen y esté recuperando el nivel de citocininas necesario para el correcto desarrollo de las flores y frutos. Con respecto a TCS, no se dispone de datos de este reportero en la línea 35S::CKX2.

## **6.2 Inmunolocalización de *t*-zeatina en *A. thaliana***

La inmunohistoquímica involucra un proceso largo y laborioso. Sin embargo, los resultados superan ampliamente el esfuerzo invertido ya que la calidad de las imágenes llega a un nivel sub-celular y la certeza en la especificidad de los anticuerpos disponibles comercialmente (OlchemIm, Czech Republic) ha sido demostrada repetidamente (Eva casanova et al. 2004; Rijavec et al. 2011; Della Rovere et al. 2013). Además, esta técnica permite diferenciar entre isómeros conformacionales de citocininas, como, por ejemplo, *cis* y *trans* zeatina, mientras que en MALDI-MS estas dos moléculas corresponderían a una misma señal, el ion 220 [M+H]<sup>+</sup>. Aunque hay reportes de la utilización de un anticuerpo secundario conjugado con GFP para inmunolocalización de citocininas (Aloni et al. 2005), no hay hasta donde sabemos muchos reportes y este trabajo sería el primero en realizarlo de esta manera en gineceo. Las desventajas que presenta la técnica son: primero, un largo tiempo de preparación de muestra—cerca de una semana para hacer bloques y cortes—así como un tiempo de vida relativamente corto de la señal de fluorescencia, ya que a pesar de usar un antioxidante especial (Fluoroshield®) dura como máximo 48-72 horas en refrigeración, por lo que las muestras se tienen que observar de inmediato al microscopio. Por esta razón, se deben planear muy bien los experimentos y ser mesurados en cuanto al número de muestras por experimento.

### 6.2.1 Inmunolocalización de *t*-zeatina en Arabidopsis

Los resultados de inmunolocalización de *t*-zeatina en gineceos de Arabidopsis Col-0 son contrastantes con lo que se observa para esta misma línea con el reportero *TCS* para la respuesta transcripcional a señalización de CKs. Mientras que el *TCS* se encuentra muy definido a la zona central del gineceo; la inmunolocalización parece ubicua, con un poco más de intensidad en funículos y óvulos. Parece ser que la señalización es muy específica mientras que la presencia de las CK es más generalizada, al menos en el gineceo. Una observación que apoya estos resultados es la presencia de la expresión de *AHP6* en las valvas del gineceo (Reyes-Olalde et al. 2017), ya que si no hubiera presencia de citocininas en esta área no se estaría llevando a cabo la represión de la señal. De hecho, se ha utilizado la localización de la señal de *CKX* para mostrar presencia de citocininas y no coincide con lo reportado por *TCS* (Bartrina et al. 2011). Podemos concluir que *TCS* es un indicador muy valioso para la señalización o actividad transcripcional de citocininas, pero al igual que los otros genes involucrados en la bioquímica de CKs, ya sea biosíntesis, señalización o degradación, no pueden ser utilizados como sinónimo de presencia de estas moléculas y se debe ser precavido al usar estos marcadores indirectos. Será interesante ver también la expresión de los receptores de citocininas y más genes ARR-tipo B, quienes afectan también a la expresión de *TCS* y probablemente causan la diferencia entre las moléculas de citocininas y el patrón de expresión de la línea *TCS*.



**Figura 22. Comparación entre la señal de inmunolocalización de *t*-zeatina, *TCS* e hibridación *in situ*.** A) Inmunolocalización de *t*-zeatina, B) Señal de *TCS::GFP* (Reyes-Olalde et al. 2017), C) Localización de mRNA por hibridación *in situ* con *CKX5* (Bartrina et al. 2011).

### **6.2.2 Inmunolocalización de *t*-zeatina en *35S::AHP6* y *ahp6***

Los resultados en las muestras de la sobre-expresante y mutante del gen *AHP6* no muestran un patrón estable de localización de la señal de inmunolocalización de *t*-zeatina. Quizás esto nos habla de la redundancia que existe en los genes de regulación de citocininas y que una mutante simple no se ve afectada grandemente en la cantidad y localización de una citocinina específica como la *t*-zeatina. Es recomendable repetir este experimento con un buen número de muestras biológicas y repeticiones técnicas.

### **6.2.3 Inmunolocalización de *t*-zeatina en *35S::SPT* y *spt***

La poca intensidad de la señal encontrada en *spt* para la inmunolocalización de citocininas concuerda con lo que se ha reportado para *TCS* en esta mutante (Reyes-Olalde et al. 2017). En este mismo trabajo de Reyes-Olalde y colaboradores, se demostró que *SPT* actúa a nivel de señalización uniéndose al menos a un ARR-tipo B. Sin embargo, ya que la mutante recupera parcialmente el fenotipo silvestre en el estilo al agregar citocininas exógenas (BAP), y debido a la baja señal de presencia de *t*-zeatina que se observa en la inmunohistoquímica, es muy probable que *SPT* esté actuando también a nivel de biosíntesis de citocininas y no solamente a nivel de señalización. De hecho, la inmunolocalización muestra ligeramente más señal de *t*-zeatina en la sobre-expresante *SPT* que, en la mutante, aunque las muestras silvestres no son comparables con las líneas insercionales debido a que no pertenecen al mismo experimento y las imágenes se

tomaron en microscopios distintos. Es recomendable repetir este experimento antes de concluir.

## 7. CONCLUSIONES

Para estudiar el rol de las citocininas en el desarrollo del gineceo, se desarrolló un método para la localización de estas hormonas en gineceos de tomate por MALDI-MS Imaging. Así mismo, se desarrolló una metodología para la detección de citocininas en el gineceo de *Arabidopsis* por medio de inmunohistoquímica. Con estas dos metodologías se observó que el patrón de localización de la respuesta transcripcional a citocininas observado con el marcador *TCS* no coincide con la localización de la molécula de *t*-zeatina, una de las citocininas más abundantes y activas en plantas. Estos resultados resaltan la importancia biológica de los diversos grados de regulación en la actividad de las citocininas; desde la biosíntesis y degradación hasta reguladores positivos y negativos de las vías de señalización. El presente trabajo indica que la presencia de *t*-zeatina es generalizada en todo el gineceo, por lo que es posible que se esté llevando a cabo una fina regulación de la actividad de las citocininas a nivel de la transducción de señales. En futuros estudios será interesante investigar la expresión de los receptores de citocininas, así como de más genes ARR-tipo B, responsables directos de la expresión de *TCS* y que muy probablemente están causando la diferencia entre la localización de las moléculas de citocininas y el patrón de expresión de *TCS*, el último nivel en la señalización de estas moléculas.

## 8. PERSPECTIVAS

- Validar la metodología desarrollada para MALDI-MSI por medio de una molécula de patrón de localización conocido en una muestra biológica; podría ser el patrón de citocininas en raíz, reportado por Shiono y colaboradores (Shiono et al. 2017).
- Realizar inmunolocalización de citocininas en tomate y comparar con el patrón de MALDI-MSI y la línea *TCS*.
- Validar la metodología de inmunolocalización por medio del uso de mutantes directamente relacionadas con citocininas (como *CKX* o *IPTs*).
- Desarrollar la metodología de “whole-mounting” para inmunolocalización de citocininas en gineceo. Esto ahorraría mucho tiempo de preparación de muestra y sería más comparable con los análisis de *TCS*.
- Realizar experimentos cortos y con un número reducido de muestras y tratamientos para inmunolocalización de citocininas ya que experimentos distintos casi nunca son comparables entre sí y experimentos largos se corre riesgo de perder la señal en las muestras.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo 1.



**Anexo 1. Fotografía del método de deposición de matriz con “microspray”. A) muestra el equipo LCT de Waters, UK. B) Es un acercamiento a la fuente de ionización utilizada como aspersor de matriz sobre una placa de MALDI.**

### 9.2 Anexo 2.



**Anexo 2. Fotografía del método de deposición de matriz por sublimación.**

### 9.3 Anexo 3. Protocolo de Inmunohistoquímica

# Protocolo: Inmunolocalización de Citocininas en el Gineceo

Rogelio Nájera, Humberto Herrera-Ubaldo, José Juan Ordaz-Ortiz & Stefan de Folter

## INTRODUCCIÓN

La investigación respecto al rol de las fitohormonas en el proceso de floración requiere de técnicas exactas que revelen su distribución y concentración a nivel celular y de tejido (Dewitte, 1999). Tradicionalmente, se han adoptado principalmente dos estrategias para cumplir estas necesidades: la primera consiste en la mejora constante de los procesos de extracción y purificación, así como de los límites de detección y la especificidad de las técnicas de química analítica usadas para la cuantificación de los niveles de hormonas endógenos (Li et al., 2017). La segunda se enfoca en la elaboración de técnicas para la localización in situ de hormonas (Pasternak, Tietz, & Palme, 2015; Zavala & Brandon, 1983). La inmunohistoquímica se basa en la habilidad de las moléculas de anticuerpos (especialmente la inmunoglobulina G, IgG), de reconocer y ligarse a los antígenos contra los cuales fueron generados en un animal experimental. Generalmente, estos anticuerpos son luego unidos a un anticuerpo secundario que está conjugado con algún señalizador ya sea de fluorescencia, o alguna enzima que genere un producto visible. Una de las ventajas de esta metodología es que tiene un excelente límite de detección. Se ha

reportado un límite de detección entre 3-10 pg para diversas fitohormonas (Maldiney et al., 1986). Para analizar una muestra por Inmunolocalización se debe primero de fijar el tejido, embeber en algún material que conserve su estructura y luego cortar. En este protocolo se ha adoptado una solución de fijado que se ha usado con éxito durante muchos años: paraformaldehído y glutaraldehído (Aloni, Langhans, Aloni, Dreieicher, & Ullrich, 2005; Sossountzov et al., 1988; Zavala & Brandon, 1983). A la hora de embeber el tejido para cortarlo, un material que conserve la morfología y que sea fácil de usar es lo más recomendable; en este caso hemos utilizado Technovit® con resultados excelentes. En resumen, este protocolo presenta toda la información necesaria para llevar a cabo la localización de citocininas en el gineceo de *Arabidopsis thaliana*, con buenos límites de detección a nivel celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos y Soluciones:

- MTBS (Microtubule-stabilizing buffer): Preparación de solución madre (2x MTSB): 15 g PIPES (PM 302.4), 1.90 g EGTA (PM 380.4), 1.22 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (PM 246.5) y 2.5 g KOH (PM 56.1) se disuelven



en agua en un total de 500 mL a pH 7.0 (ajustado con KOH 10 M);

- Solución de fijado: 3% paraformaldehído y 0.5% glutaraldehído en 1x MTSB suplementado con 0.1% Triton X-100. La solución madre se prepara con 2 g de paraformaldehído disuelto en 20 mL de agua (conc 10%) calentando ligeramente 65-70°C y con la adición de 1 gota de KOH 1M. La solución madre se puede guardar en alícuotas de 2 mL a -20°C;

*Comentarios: Preparar la solución madre en la campana para evitar los vapores de formaldehído.*

- Etanol absoluto (o acetona)
- Technovit 7100®
- Solución de infiltración: 100 mL Technovit 7100 basic solution más Technovit 7100 hardener 1 (bolsa de 1 g). Disolver durante 4 horas; cuando está cerrada la solución es estable hasta 4 semanas si se guarda a 4°C.
- Solución de polimerización: Mezclar solución de infiltración con Technovit 7100 Hardener 2 en relación 15:1. Mezclar durante 3 min. Se empieza a poner viscosa a los 5-10 min.
- Solución de bloqueo: 2 % albumin fraction V BSA en 1 × MTSB;
- Solución que le dará firmeza al bloque: Technovit 3040 2:1 polvo: líquido v/v  
*Comentarios: Al preparar esta solución se cuenta con 0.5 minutos de periodo de manejo, luego de 2 minutos la solución se vuelve muy viscosa y se endurece totalmente a los 5 minutos a 22°C. Preparar en campana de extracción ya que huele muy fuerte. (Polvo: Divenzoylperoxid; Líquido: Methylmethacrylat, N,N-dimethyl-p-toluidin)*

Preparar de la siguiente manera:

1. Colocar el líquido en un tubo Falcon 50 mL que quedará inutilizable.
2. Adicionar la mitad del polvo
3. Agitar violentamente
4. Adicionar el resto del polvo
5. Mezclar 40 segundos
6. Reposar 10 seg
7. Volver a agitar
8. Agregar a los bloques rápidamente

- Tween 20
- Solución de anticuerpo primario: Los anticuerpos adquiridos de OlchemIm (Czech Republic) tienen una concentración entre 1-4 ug/uL y deben dividirse en alícuotas de 5 uL y ser guardados a -20°C. Cuando se van a usar, se diluyen 1:100 en solución de bloqueo.
- Solución de anticuerpo secundario: Se utiliza una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Se prepara justo antes de su uso.
- Fluoroshield histology mounting medium de Sigma-Aldrich.

#### Equipo:

- Bomba de vacío
- Refrigerador 4°C
- Microscopio de fluorescencia o confocal.
- Tubos Falcon® de 15 y 50 mL
- Cubreobjetos
- Micropipetas 0.1-1000 µL
- Portaobjetos
- Pinzas finas
- Estereoscopio
- Microtomo
- Moldes de plástico y tapa respectiva
- Campana de extracción

- Cajas de 12 o 24 pocillos para cultivo de tejidos

## PROTOCOLO

### Fijado

- Inmediatamente que se corta la muestra, se colecta en 1.5 mL de solución de fijado fría. La relación medio de fijación/explante debe ser 10:1. Aplicar vacío (aprox. -20" Hg) por 30 min. Revisar si el material de plantas está completamente sumergido en la solución, esto indica que el fijador ha penetrado; retirar el vacío y continuar la fijación por 2.5 horas a 4°C.
- Lavar con 2 mL de agua destilada ~10 min.

*Comentarios: Utilizando esta solución de fijado, Sossountzov (1988) demostró que las bases libres de citocininas se fijan al material de la planta y que se unen preferencialmente a los ribósidos de éstas.*

### Deshidratación

- Se realiza por medio de adiciones sucesivas de etanol. Empezar con una solución 10% etanol en agua, y dejar reposar por 60 min a 4°C. Después continuar con una solución al 20% y repetir hasta llevar al 100% de etanol. Esta será la solución final de deshidratación.

### Pre-infiltración

- Mezclar Technovit 7100 Basic solution y SFD 1:1 v/v

- Poner las muestras en esta solución de pre-infiltración e incubar 2 hrs. a temperatura ambiente.

### Infiltración

- Poner las muestras en la solución de infiltración por hasta 24 horas a temperatura ambiente, o por más tiempo si se dejan a 4°C. Agitación y un leve vacío ayudan.

### Polimerización

- Agregar solución de polimerización al recipiente de plástico y acomodar la(s) muestra(s), se empieza a poner viscosa a los 5-10 min. Poner la tapa y esperar 2 hrs., de preferencia a 37°C. Se utilizan casi 2 mL de esta solución por bloque de muestras.

### Fortalecer bloque

- Se prepara la solución que le dará firmeza al bloque, Technovit 3040 2:1 polvo:líquido v/v, e inmediatamente se agrega a los bloques. Se requiere cerca de 1.0 mL por bloque.

### Cortes

- Una vez que los bloques han endurecido (24 horas a 37°C y al abrigo de la luz), se procede a cortar a 12 um en un micrótomo. Recolectar los "listones" en una caja de 24 pocillos con agua MilliQ fría.

### Bloqueo

- Retirar el agua del pocillo que contiene la muestra de interés y reemplazar por solución de bloqueo. 500 uL son más que suficientes para cubrir bien los listones. No se recomienda poner demasiados listones en un mismo pocillo o que estos sean demasiado grandes, ya que se enredan. Incubar 3 veces por 10 min en la solución de bloqueo.

### Incubación con anticuerpo primario

- Reemplazar la solución de bloqueo con solución del anticuerpo primario al 1% e incubar toda la noche a 4°C seguido por 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se prepara en solución de bloqueo con 0.025% de Tween 20. No agitar durante la incubación con anticuerpos.
- ¡Siempre poner controles sin el anticuerpo primario!
- Un control opcional es incubar una mezcla del anticuerpo primario con una solución estándar de la citocinina correspondiente. Si el anticuerpo es específico, la señal debe ser menor que en una muestra normal.
- Lavar 2 x 5 min con 500 uL de 1 x MTSB

*Comentarios: Los anticuerpos policlonales de Olchemlm (Czech Republic) reconocen las bases libres de citocininas, sus ribósidos, ribótidos y N9-glucósidos, con reacción mínima entre las diferentes citocininas (Cassanova, 2003). Debido a la fijación específica reportada por Soussountzov, este protocolo detecta específicamente bases libres de citocininas.*

### Incubación con anticuerpo secundario

- Agregar 500 uL de la solución de anticuerpo secundario (1:200) en buffer de bloqueo.
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar 3 x 5 min con 1 x MTSB

*Comentarios: Se puede en este punto hacer co-tinción de pared celular y núcleo, lo cual puede resultar muy provechoso. Ver Pasternak et al. (2015).*

### Montaje

- Transferir las muestras a portaobjetos con una gota del medio antifade.
- Cubrir con cubreobjetos y observar al microscopio de fluorescencia o confocal.
- Es recomendable analizar lo antes posible las muestras, ya que se pierde la fluorescencia. Guardar las muestras a 4°C.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aloni, R., Langhans, M., Aloni, E., Dreieicher, E., & Ullrich, C. I. (2005). Root-synthesized cytokinin in Arabidopsis is distributed in the shoot by the transpiration stream. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1535–1544.
- Dewitte, W. (1999). Dynamics of Cytokinins in Apical Shoot Meristems of a Day-Neutral Tobacco during Floral Transition and Flower Formation. *Plant Physiology*, 119, 111–121.
- Li, D., Guo, Z., Liu, C., Li, J., Xu, W., & Chen, Y. (2017). Quantification of near-attomole gibberellins in floral organs dissected from a single Arabidopsis thaliana flower. *Plant Journal*, 91(3), 547–557.
- Maldiney, R., Leroux, B., Sabbagh, I., Sotta, B., Soussountzov, L., & Miginiac, E. (1986). A

- biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones—auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *Journal Of Immunological Methods*, *90*, 151–158.
- Pasternak, T., Tietz, O., & Palme, K. (2015). Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods*.
- Sossountzov, L., Maldiney, R., Sotta, B., Sabbagh, I., Habricot, Y., Bonnet, M., & Miginiac, E. (1988). Immunocytochemical localization of cytokinins in Craigella tomato and a sideshootless mutant. *Planta*, *175*, 291–304.
- Zavala, M. E., & Brandon, D. L. (1983). Localization of a Phytohormone Using Immunocytochemistry.

## 9.4 Anexo 4. Protocolo de MALDI-MS Imaging

# Protocolo: Imágenes por Espectrometría de Masas con MALDI-MS

Rogelio Nájera, David Gómez-Zepeda, Stefan de Folter & José Ordaz Ortiz

### INTRODUCCIÓN

La obtención de imágenes por espectrometría de masas por ionización asistida por matriz (MALDI-MSI) ha probado ser una técnica útil para la localización *in situ* de un amplio grupo de moléculas; desde proteínas hasta metabolitos de bajo peso molecular (Boughton, Thinagaran, Sarabia, Bacic, & Roessner, 2016). En plantas, la técnica se ha utilizado con éxito para el estudio de semillas (Sturtevant, Dueñas, Lee, & Chapman, 2017), hojas (Annangudi, Myung, Avila Adame, & Gilbert, 2015), raíces (Takahashi, Kozuka, Aneqawa, Nagatani, & Mimura, 2015); entre otros varios tejidos. Una de las principales ventajas de hacer imágenes moleculares por medio de espectrometría de masas es la capacidad de realizar un análisis no dirigido y sin necesidad de marcadores específicos. Esto, aunado a la alta sensibilidad y resolución de los equipos espectrometría de masas (que además mejora cada día) hacen de la técnica una herramienta muy poderosa para el análisis de muestras biológicas de todo tipo.

En un experimento tradicional de MALDI-MS Imaging o MALDI-MSI, la muestra congelada debe ser cortada en un criostato a unos cuantos  $\mu\text{m}$ , generalmente entre 10-50  $\mu\text{m}$ . Aunque existen diversos métodos de ionización aplicables a tejido biológico, el que más se ha desarrollado y aplicado es el método de ionización y desorción con láser asistida por una matriz o MALDI por sus siglas

en inglés (Boughton et al., 2016). En esta metodología en particular, el microcorte de muestra es montado sobre una superficie apropiada- ya sea un portaobjetos o una placa especial de acero inoxidable- y se aplica una matriz: un compuesto que co-cristaliza con la muestra y tiene el propósito de absorber la energía del láser y transferirla a las moléculas de la muestra para su ionización/desorción en el equipo. El espectrómetro de masas está equipado con un láser de luz UV que sondea la muestra en un plano bidimensional. Para cada disparo del láser se registra una posición en el espacio (x,y) junto con el espectro de masas generado en ese punto. Después de la generación de datos, cada ion -o incluso una selección de éstos- se pueden graficar de acuerdo con su intensidad relativa a manera de "heat-map". Para una descripción más detallada de la técnica, se recomiendan las revisiones de Dong (Dong, Li, & Aharoni, 2016) y Bjarnholt (Bjarnholt, Li, D'Alvise, & Janfelt, 2014).

En este protocolo, se describe el proceso de preparación de muestras y adquisición de datos de MS para muestras de gineceo de tomate a partir de flores desde -5 hasta 5 dpa (días post-antesis). La matriz que se utilizó fue el ácido  $\alpha$ -ciano-hidroxi-cinámico (CHCA), aunque también se probó ácido dihidroxibenzóico (DHB), obteniendo que la sensibilidad es superior con CHCA. La obtención de datos fue en modo positivo buscando citocininas, y se notó que la

sensibilidad del equipo decrece significativamente en modo negativo. Cabe mencionar en este punto que la espectrometría de masas, así como la preparación de muestras y la matriz a utilizar son muy dependiente del tipo de analito que se quiere analizar, por lo que este protocolo puede solo servir como una guía general para muestras y analitos diferentes a los que se describen.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos y Soluciones:

- Solución de carboximetil celulosa al 2% (CMC).

Comentarios: Se prepara en agua caliente (60-70°C) agregando poco a poco CMC de sodio y agitando hasta que se forme el gel.

- Nitrógeno líquido
- Gel OCT (Leica 14020108926)
- Solución de matriz:  $\alpha$ -CHCA 2 mg/ml

Comentarios: La matriz se prepara en una solución de 50:50 acetonitrilo/agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA).

- Moldes metálicos para bloques de microscopía (Leica 3803080)

### Equipo:

- Ultracongelador -80°C
- Congelador -20°C
- Criostato, platinas, navajas Leica 818 perfil alto
- Estereoscopio
- Placas de MALDI Waters [700003895]
- Liofilizadora
- Synapt HDMS G1 en modo MALDI (Waters, UK)

## PROTOCOLO

### Precaución

*Los metabolitos presentes en muestras biológicas son susceptibles a degradación, por lo que se recomienda que toda la preparación de la muestra sea en frío después de ser separado de su ambiente natural.*

### Obtención de Gineceo

Retirar cuidadosamente con pinzas los pétalos y estambres de la flor de tomate aun estando en la planta, para terminar con el gineceo expuesto. Cortar el gineceo desde el pedicelo e inmediatamente sumergirlo en el gel de CMC. Una vez que la muestra se encuentra acomodada en el gel se procede a introducirlo cuidadosamente en el nitrógeno líquido. *PRECAUCION: sumergirlo abruptamente, o un tamaño muy grande (mayor a 1 cm<sup>3</sup>) causará que se fracture la muestra. Las muestras congeladas se guardan por toda la noche en el refrigerador de -80°C y se transfieren a -20°C al menos 2 horas antes del proceso de corte.*

### Corte en Criostato

Las muestras se separan del molde y se montan en una platina de corte agregando un poco de gel OCT antes y después del bloque de muestra. El criostato se ajusta a -20°C y se comienzan a realizar los cortes de 100  $\mu$ m. Cuando se acerca el tejido de interés, se recomienda montar las muestras en un portaobjetos y verla al estereoscopio hasta lograr el corte deseado (guardar esta foto). Los cortes subsiguientes se montan en la placa de MALDI y se congelan inmediatamente. Es recomendable preparar con anterioridad la placa del MALDI con un poco de matriz aplicada previamente (ver sección "Aplicación de matriz"). Etiquetar correspondientemente las muestras y guardar en hielo seco.

## **Secado**

Las muestras en este punto son estables a -80°C hasta por 1 año, sin embargo, se recomienda liofilizar por 30-60 minutos. Se observó que este proceso mejora la sensibilidad en el equipo de espectrometría de masas.

## **Aplicación de Matriz**

La matriz se puede aplicar ya sea con Electro spray (ES) o mediante sublimación. Se observó que la deposición de matriz en placas de MALDI es más eficiente (cristales más pequeños y homogéneos) por ES. Sin embargo, en portaobjetos de vidrio, la matriz se deposita mejor por sublimación (ver imágenes suplementarias en PowerPoint).

ES: Se prepara una solución de  $\alpha$ -CHCA de 2 mg/mL según las instrucciones previas, y se carga en una jeringa de infusión directa al MS LCT. El equipo se prepara para aplicación de matriz retirando el cono y el motor con el baffle. A continuación, se acomoda la muestra dentro de la cámara de ionización y se procede a encender el flujo de gas (flujos en ceros) y a infundir 50  $\mu$ L/min. Una vez que se observa la muestra cubierta de matriz se puede retirar.

Sublimación: Se utiliza la bomba de la liofilizadora para hacer el vacío necesario, por lo que se ajusta a 0.025 Torr. En un vaso grande se agregan 100 mg de  $\alpha$ -CHCA. En un vaso chico al que se le agregaron unas patas de 5 cm como soporte se monta por abajo el portaobjetos o la placa MALDI con la muestra; puede ser con tape doble-cara. A continuación, se agrega un poco de hielo al vaso chico y se introduce en el vaso grande con matriz. Este montaje se conecta a la liofilizadora y se inicia el proceso de vacío. Una vez que se alcanzado el vacío se calienta a 200°C con una parrilla y se espera de 10-20 min hasta que la matriz ha sublimado lo

suficiente en la muestra. Después de este paso se puede volver a fotografiar la muestra en un estereoscopio antes de introducir al MALDI MS.

## **Introducción al equipo MALDI-MS**

La placa de MALDI o el portaobjetos con la muestra se debe de fotografiar para poder programar la realización de imágenes en el software MassLynx. Esta fotografía se carga al programa “Image generator” de Waters y se selecciona el área a analizar. Posteriormente, el archivo creado en este paso se carga a la lista de muestra de MassLynx y se programan los parámetros deseados. Una vez que se ha programado el software, se introduce la muestra al masas y se corre la muestra. El tiempo de adquisición dependerá de los parámetros seleccionados sobre todo la resolución y el área de muestreo. El tamaño del archivo final también es muy dependiente de estos factores, así como del rango de masas seleccionado.

## **Generación de imágenes**

Una vez que el equipo ha terminado la adquisición de datos, el archivo se debe transformar con el programa “MALDI imaging file converter” de Waters. El archivo final ya se puede visualizar en Biomap (abierto: página de internet).

## **REFERENCIAS:**

Annangudi, S. P., Myung, K., Avila Adame, C., & Gilbert, J. R. (2015). MALDI-MS imaging analysis of fungicide residue distributions on wheat leaf surfaces. *Environmental Science and Technology*, 49(9), 5579–5583.

Bjarnholt, N., Li, B., D’Alvise, J., & Janfelt, C. (2014). Mass spectrometry imaging of plant metabolites – principles and possibilities. *Nat. Prod. Rep.*, 31(6), 818–837.

Boughton, B. A., Thinakaran, D., Sarabia, D., Bacic, A., & Roessner, U. (2016). Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochemistry Reviews*, 15(3), 445–488.

Dong, Y., Li, B., & Aharoni, A. (2016). More than Pictures: When MS Imaging Meets Histology. *Trends in Plant Science*, 21(8), 686–698.

Sturtevant, D., Dueñas, M. E., Lee, Y. J., & Chapman, K. D. (2017). Three-dimensional

visualization of membrane phospholipid distributions in *Arabidopsis thaliana* seeds: A spatial perspective of molecular heterogeneity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(2), 268–281.

Takahashi, K., Kozuka, T., Anegawa, A., Nagatani, A., & Mimura, T. (2015). Development and application of a high-resolution imaging mass spectrometer for the study of plant tissues. *Plant and Cell Physiology*, 56(7), 1329–1338.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Albacete, Alfonso. 2017. "Quantification of Cytokinin Levels and Responses in Abiotic Stresses." In *Methods in Molecular Biology*, 1569:101–11.
- Aloni, Roni, Markus Langhans, Erez Aloni, Ellen Dreieicher, and Cornelia I. Ullrich. 2005. "Root-Synthesized Cytokinin in Arabidopsis Is Distributed in the Shoot by the Transpiration Stream." *Journal of Experimental Botany* 56 (416): 1535–44.
- Alvarez-Buylla, Elena R, Mariana Benítez, Adriana Corvera-Poiré, Álvaro Chaos Cador, Stefan De Folter, Alicia Gamboa De Buen, Adriana Garay-Arroyo, et al. 2010. "Flower Development."
- Alvarez, John, and David R Smyth. 2002. "Crabs Claw And Spatula Genes Regulate Growth And Pattern Formation During Gynoecium Development In Arabidopsis Thaliana." *Int. J. Plant Sci* 163 (1): 17–41.
- Annangudi, Suresh P, Kyung Myung, Cruz Avila Adame, and Jeffrey R Gilbert. 2015. "MALDI-MS Imaging Analysis of Fungicide Residue Distributions on Wheat Leaf Surfaces." *Environmental Science and Technology* 49 (9): 5579–83.
- Antoniadi, Ioanna, Lenka Plačková, Biljana Simonovik, Karel Doležal, Colin Turnbull, Karin Ljung, and Ondřej Novák. 2015. "Cell-Type-Specific Cytokinin Distribution within the Arabidopsis Primary Root Apex." *The Plant Cell* 27 (7): 1955–67.
- Baker, Teesha C, Jun Han, and Christoph H Borchers. 2017. "Recent Advancements in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging." *Current Opinion in Biotechnology* 43: 62–69.
- Bar, Maya, Alon Israeli, Matan Levy, Hadas Ben Gera, José M Jiménez-Gómez, Stepan Kouril, Petr Tarkowski, and Naomi Ori. 2016. "CLAUSA Is a MYB Transcription Factor That Promotes Leaf Differentiation by Attenuating Cytokinin Signaling." *The Plant Cell* 28 (7): 1602–15.
- Bartrina, Isabel, Elisabeth Otto, Miroslav Strnad, Tomáš Werner, and Thomas Schmülling. 2011. "Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in Arabidopsis Thaliana." *The Plant Cell* 23 (1): 69–80.

- Bishopp, Anthony, Satu Lehesranta, Anne Vatén, Hanna Help, Sedeer El-Showk, Ben Scheres, Kerttuli Helariutta, Ari Pekka Mähönen, Hitoshi Sakakibara, and Ykä Helariutta. 2011. "Phloem-Transported Cytokinin Regulates Polar Auxin Transport and Maintains Vascular Pattern in the Root Meristem." *Current Biology* 21 (11): 927–32.
- Boughton, Berin A., Dinaiz Thinakaran, Daniel Sarabia, Antony Bacic, and Ute Roessner. 2016. "Mass Spectrometry Imaging for Plant Biology: A Review." *Phytochemistry Reviews* 15 (3). Springer Netherlands: 445–88.
- Caboni, E, S D 'angeli, A Chiappetta, A M Innocenti, H Van Onckelen, and C Damiano. 2002. "Adventitious Shoot Regeneration from Vegetative Shoot Apices in Pear and Putative Role of Cytokinin Accumulation in the Morphogenetic Process." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 199–206.
- Chen, Junyi, Andreas Lausser, and Thomas Dresselhaus. 2014. "Hormonal Responses during Early Embryogenesis in Maize." *Biochemical Society Transactions* 42 (2): 325–31.
- Chen, Yanfeng, Jeremy Allegood, Ying Liu, Elaine Wang, Begoña Cachón-González, Timothy M Cox, Alfred H Merrill, and M. Cameron Sullards. 2008. "Imaging MALDI Mass Spectrometry Using an Oscillating Capillary Nebulizer Matrix Coating System and Its Application to Analysis of Lipids in Brain from a Mouse Model of Tay-Sachs/Sandhoff Disease." *Analytical Chemistry* 80 (8): 2780–88.
- Dewitte, Walter. 1999. "Dynamics of Cytokinins in Apical Shoot Meristems of a Day-Neutral Tobacco during Floral Transition and Flower Formation." *Plant Physiology* 119: 111–21.
- Dong, Yonghui, Bin Li, Sergey Malitsky, Ilana Rogachev, and Asaph Aharoni. 2016. "Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review"
- Eva casanova, Ana elisa valdés, Belén fernández, and Lluïsa moysset (Barcelona). 2004. "Levels and Immunolocalization of Endogenous Cytokinins in Thidiazuron- Induced Shoot Organogenesis in Carnation." *J.PlantPhysiol* 161: 95–104.

- Gemperline, Erin, Stephanie Rawson, and Lingjun Li. 2014. "Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging."
- Gillaspy, Glenda, Hilla Ben-David, and Wilhelm Gruissem. 1993. "Fruits: A Developmental Perspective." *The Plant Cell American Society of Plant Physiologists* 5: 1439–51.
- Groszmann, Michael, Yasmin Bylstra, Edwin R Lampugnani, and David R Smyth. 2010. "Regulation of Tissue-Specific Expression of SPATULA, a BHLH Gene Involved in Carpel Development, Seedling Germination, and Lateral Organ Growth in Arabidopsis." *Journal of Experimental Botany* 61 (5): 1495–1508.
- Heisler, M G, A Atkinson, Y H Bylstra, R Walsh, and D R Smyth. 2001. "SPATULA, a Gene That Controls Development of Carpel Margin Tissues in Arabidopsis, Encodes a BHLH Protein." *Development (Cambridge, England)* 128 (7): 1089–98.
- Irish, Vivian F. 2010. "The Flowering of Arabidopsis Flower Development." *Plant Journal* 61 (6): 1014–28.
- Jasinski, Sophie, Paolo Piazza, Judith Craft, Angela Hay, Lindsey Woolley, Ivo Rieu, Andrew Phillips, Peter Hedden, and Miltos Tsiantis. 2005. "KNOX Action in Arabidopsis Is Mediated by Coordinate Regulation of Cytokinin and Gibberellin Activities." *Current Biology* 15: 1560–65.
- Kieber, Joseph J., and G. Eric Schaller. 2014. "Cytokinins." *The Arabidopsis Book* 12: e0168.
- Knapp, S. 2002. "Tobacco to Tomatoes: A Phylogenetic Perspective on Fruit Diversity in the Solanaceae." *Journal of Experimental Botany* 53 (377): 2001–22.
- Knox, R. B., H.I.M.V. Vithanage, and B. J. Howlett. 1980. "Botanical Immunocytochemistry: A Review with Special Reference to Pollen Antigens and Allergens." *The Histochemical Journal*.
- Korte, Andrew R., Zhihong Song, Basil J. Nikolau, and Young Jin Lee. 2012. "Mass Spectrometric Imaging as a High-Spatial Resolution Tool for Functional Genomics: Tissue-Specific Gene Expression of TT7 Inferred from

- Heterogeneous Distribution of Metabolites in Arabidopsis Flowers.” *Analytical Methods* 4 (2): 474.
- Kudo, Toru, Takatoshi Kiba, and Hitoshi Sakakibara. 2010. “Metabolism and Long-Distance Translocation of Cytokinins.” *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1): 53–60.
- Lee, Young Jin, David C. Perdian, Zhihong Song, Edward S. Yeung, and Basil J. Nikolau. 2012. “Use of Mass Spectrometry for Imaging Metabolites in Plants.” *Plant Journal* 70 (1): 81–95.
- Letham, David Stuart. 1973. “Cytokinins from Zea Mays.” *Phytochemistry* 12 (10): 2445–55.
- Lewis, J. Kathleen, Jing Wei, and Gary Siuzdak. 2006. “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis.” In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Li, Dongmei, Zhenpeng Guo, Cuimei Liu, Jincheng Li, Wenzhong Xu, and Yi Chen. 2017. “Quantification of Near-Attomole Gibberellins in Floral Organs Dissected from a Single Arabidopsis Thaliana Flower.” *Plant Journal* 91 (3): 547–57.
- Lozano, Rafael, Estela Giménez, Beatriz Cara, Juan Capel, and Trinidad Angosto. 2009. “Genetic Analysis of Reproductive Development in Tomato.” *International Journal of Developmental Biology*.
- Maldiney, R6gis, Bernard Leroux, Issam Sabbagh, Bruno Sotta, Lucienne Sossountzov, and Emile Miginiac. 1986. “A Biotin-Avidin-Based Enzyme Immunoassay to Quantify Three Phytohormones” Auxin, Abscisic Acid and Zeatin-Riboside.” *Journal Of Immunological Methods* 90: 151–58.
- Marsch-Martinez, Nayelli, and Stefan de Folter. 2016. “Hormonal Control of the Development of the Gynoecium.” *Current Opinion in Plant Biology* 29: 104–14.
- Marsch-Martínez, Nayelli, Daniela Ramos-Cruz, J. Irepan Reyes-Olalde, Paulina Lozano-Sotomayor, Victor M. Zúñiga-Mayo, and Stefan de Folter. 2012. “The Role of Cytokinin during Arabidopsis Gynoecia and Fruit Morphogenesis and Patterning.” *The Plant Journal* 72 (2): 222–34.
- Mcatee, Peter, Siti Karim, Robert Schaffer, Karine David, and Maren Müller. 2013. “A Dynamic Interplay between Phytohormones Is Required for Fruit

- Development, Maturation, and Ripening” 12 (416): 52–1.
- Miller C.O., F. Skoog, F.S. Okomura, M.H. Saltza, and F.M. Strong. 1956. “Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division.” *Journal of American Chemical Society*, no. 78: 1375–80.
- Miyawaki, Kaori, Miho Matsumoto-Kitano, and Tatsuo Kakimoto. 2004. “Expression of Cytokinin Biosynthetic Isopentenyltransferase Genes in Arabidopsis: Tissue Specificity and Regulation by Auxin, Cytokinin, and Nitrate.”
- Muller, B, and J Sheen. 2008. “Cytokinin and Auxin Interaction in Root Stem-Cell Specification during Early Embryogenesis.” *Nature* 453 (7198): 1094-U7.
- Ordaz-Ortiz, José Juan, Sofia Foukaraki, and Leon Alexander Terry. 2015. “Assessing Temporal Flux of Plant Hormones in Stored Processing Potatoes Using High Definition Accurate Mass Spectrometry.” *Horticulture Research* 2: 15002.
- Parkinson, John S. 1993. “Signal Transduction Schemes of Bacteria Review.” *Cell* 73: 857–71.
- Pasternak, Taras, Olaf Tietz, and Klaus Palme. 2015. “Protocol: An Improved and Universal Procedure for Whole-Mount Immunolocalization in Plants.” *Plant Methods*.
- Pattison, Richard J., and Carmen Catalá. 2012. “Evaluating Auxin Distribution in Tomato (*Solanum Lycopersicum*) through an Analysis of the PIN and AUX/LAX Gene Families.” *Plant Journal* 70 (4): 585–98.
- Pencik, A., Biljana Simonovik, Sara V Petersson, E. Henykova, Siby Simon, Kathleen Greenham, Yi Zhang, et al. 2013. “Regulation of Auxin Homeostasis and Gradients in Arabidopsis Roots through the Formation of the Indole-3-Acetic Acid Catabolite 2-Oxindole-3-Acetic Acid.” *The Plant Cell* 25 (10): 3858–70.
- Plačková, Lenka, Jana Oklestkova, Kristýna Pospíšková, Kateřina Poláková, Jan Buček, Jakub Stýskala, Marek Zatloukal, et al. 2017. “Microscale Magnetic Microparticle-Based Immunopurification of Cytokinins from Arabidopsis Root Apex.” *The Plant Journal* 89 (5): 1065–75.
- Prinsen, Els, Pascale Redig, Walter Van Dongen, Eddy L Esmans ’, Henri A Van

- Onckelen, and R P Newton. 1995. "Quantitative Analysis of Cytokinins by Electrospray Tandem Mass Spectrometry In The." *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY* 9: 948–53.
- Provart, Nicholas J, Jose Alonso, Sarah M Assmann, Dominique Bergmann, Siobhan M Brady, Jelena Brkljacic, John Browse, et al. 2015. "50 Years of Arabidopsis Research: Highlights and Future Directions."
- Reyes-Olalde, J. Irepan, Víctor M. Zúñiga-Mayo, Joanna Serwatowska, Ricardo A. Chavez Montes, Paulina Lozano-Sotomayor, Humberto Herrera-Ubaldo, Karla L. Gonzalez-Aguilera, et al. 2017. *The BHLH Transcription Factor SPATULA Enables Cytokinin Signaling, and Both Activate Auxin Biosynthesis and Transport Genes at the Medial Domain of the Gynoecium. PLoS Genetics*. Vol. 13.
- Rijavec, Tomaž, Mukesh Jain, Marina Dermastia, and Prem S Chourey. 2011. "Spatial and Temporal Profiles of Cytokinin Biosynthesis and Accumulation in Developing Caryopses of Maize." *Annals of Botany* 107 (7): 1235–45.
- Rovere, F Della, L Fattorini, S D 'angeli, A Velocchia, G Falasca, and M M Altamura. 2013. "Auxin and Cytokinin Control Formation of the Quiescent Centre in the Adventitious Root Apex of Arabidopsis." *Annals of Botany*.
- Sakakibara, Hitoshi. 2006. "CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation." *Annual Review of Plant Biology* 57 (1): 431–49.
- Schaller, G Eric, Dennis E Mathews, Michael Gribskov, and John C Walker. 2002. "Two-Component Signaling Elements and Histidyl- Aspartyl Phosphorelays." *The Arabidopsis Book*, 1–9.
- Schmülling, Thomas, Bullet Tomá Werner, Bullet Michael Riefler, Bullet Eva Krupková, Bullet T Isabel Bartrina Manns š Schmülling, T Werner, M Riefler, E Krupková, and I Bartrina Manns. 2003. "Structure and Function of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Genes of Maize, Rice, Arabidopsis and Other Species." *J Plant Res* 116: 241–52.
- Shiono, Katsuhiko, Riho Hashizaki, Toyofumi Nakanishi, Tatsuko Sakai, Takushi Yamamoto, Koretsugu Ogata, Ken Ichi Harada, Hajime Ohtani, Hajime Katano, and Shu Taira. 2017. "Multi-Imaging of Cytokinin and Abscisic Acid on the Roots

- of Rice (*Oryza Sativa*) Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (35): 7624–28.
- Sossountzov, L, R Maldiney, B Sotta, I Sabbagh, Y Habricot, M Bonnet, and E Miginiac. 1988. "Immunocytochemical Localization of Cytokinins in Craigella Tomato and a Sideshootless Mutant." *Planta* 175: 291–304.
- Sturtevant, Drew, Maria Emilia Dueñas, Young Jin Lee, and Kent D Chapman. 2017. "Three-Dimensional Visualization of Membrane Phospholipid Distributions in Arabidopsis Thaliana Seeds: A Spatial Perspective of Molecular Heterogeneity." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (2). Elsevier B.V.: 268–81.
- Suzuki, Tomomi, Kensuke SAKURAI, Aya IMAMURA, Ayako NAKAMURA, Chiharu UEGUCHI, and Takeshi MIZUNO. 2000. "Compilation and Characterization of Histidine-Containing Phosphotransmitters Implicated in His-to-Asp Phosphorelay in Plants: AHP Signal Transducers of Arabidopsis Thaliana." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64 (11): 2486–89.
- Takahashi, Katsutoshi, Toshiaki Kozuka, Aya Anegawa, Akira Nagatani, and Tetsuro Mimura. 2015. "Development and Application of a High-Resolution Imaging Mass Spectrometer for the Study of Plant Tissues." *Plant and Cell Physiology* 56 (7): 1329–38. 3.
- Tomato Genome Consortium, The, Kazusa DNA Research Institute, Life Sciences, Roche company, Amplicon Express Inc, Beijing Academy of Agriculture, Forestry Sciences, et al. 2012. "The Tomato Genome Sequence Provides Insights into Fleshy Fruit Evolution." *Nature* 485.
- Werner, Tomá, Václav Motyka, Valérie Laucou, Rafaël Smets, Harry Van Onckelen, and Thomas Schmülling. 2003. "Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity." *The Plant Cell* 15: 2532–50.
- Xiao, Han, Cheryl Radovich, Nicholas Welty, Jason Hsu, Dongmei Li, Tea Meulia, and Esther Van Der Knaap. 2009. "BMC Plant Biology Integration of Tomato Reproductive Developmental Landmarks and Expression Profiles, and the

- Effect of SUN on Fruit Shape.” *BMC Plant Biology* 9 (9).
- Yanai, Osnat, Eilon Shani, Karel Dolezal, Petr Tarkowski, Robert Sablowski, Goran Sandberg, Alon Samach, and Naomi Ori. 2005. “Arabidopsis KNOXI Proteins Activate Cytokinin Biosynthesis.” *Current Biology* 15: 1566–71.
- Zavala, Maria Elena, and David L Brandon. 1983. “Localization of a Phytohormone Using Immunocytochemistry.”
- Zubko, Elena, Christopher J. Adams, Ivana Macháèková, Jiri Malbeck, Claire Scollan, and Peter Meyer. 2002. “Activation Tagging Identifies a Gene from *Petunia Hybrida* Responsible for the Production of Active Cytokinins in Plants.” *Plant Journal* 29 (6): 797–808.