

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ROL DE GENES WIP Y CITOCININAS EN EL
DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DANIELA RAMOS CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. NAYELLI MARSCH MARTÍNEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ROL DE GENES WIP Y CITOCININAS EN EL
DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DANIELA RAMOS CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. NAYELLI MARSCH MARTÍNEZ

SINODALES

Dra. NAYELLI MARSCH MARTÍNEZ
DIRECTORA

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
SINODAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
SINODAL

Dr. RAMÓN GUEVARA GONZÁLEZ
SINODAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ROL DE GENES WIP Y CITOCININAS EN EL
DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DANIELA RAMOS CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. NAYELLI MARSCH MARTÍNEZ

SINODALES

Dra. NAYELLI MARSCH MARTÍNEZ _____
DIRECTORA

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ _____
SINODAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES _____
SINODAL

Dr. RAMON GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ _____
SINODAL

Q.B. MAGALI E. AGUILAR ORTÍZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	3
II.2 Análisis funcional de genes	3
II.3 Fases del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
II.4 Papel de las hormonas en el desarrollo de las plantas	7
II.4.1 Las hormonas y el establecimiento del fruto en <i>Arabidopsis</i>	10
II.5 Citocininas, importancia y señalización	11
II.6 Familia de genes y proteínas WIP	13
II.7 Sistema de transactivación, implicación de la síntesis y degradación de citocininas	16
III. HIPOTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
IV.1 General	18
IV.2 Específicos	18
V. METODOLOGÍA	19
V.1 Materiales	19
V.1.1 Material biológico	19
V.1.1.1 Líneas experimentales del ecotipo Columbia de <i>Arabidopsis</i>	19
V.1.1.1.1 Líneas mutantes	19
V.1.1.1.2 Líneas sobreexpresantes	19
V.1.1.1.3 Líneas de fusión marcadoras	19
V.1.1.2 Líneas de transactivación del ecotipo Landsberg	20
V.1.2 Material de laboratorio	20

V.1.3	Material de invernadero	20
V.1.4	Reactivos	21
V.1.4.1	Soluciones	21
V.1.4.2	Medios	22
V.1.4.3	Hormonas	22
V.1.5	Equipos	22
V.2	Métodos	23
V.2.1	Cruzas	23
V.2.2	Tinciones	23
V.2.2.1	Tinción de GUS	23
V.2.2.2	Tinción azul de alcian	23
V.2.3	Inclusión de tejidos vegetales en parafina	24
V.2.4	Cortes en microtomo y fijación del tejido	24
V.2.5	Microscopia	24
V.2.5.1	Estereoscopia	24
V.2.5.2	Microscopia confocal	25
V.2.5.3	Microscopia electrónica	25
V.2.5.4	Microscopia óptica	26
V.2.6	Prueba estadística de Student	26
V.3	Diseño experimental	26
VI.	RESULTADOS	29
VI.1	Expresión del marcador de citocininas TCS::GFP en el fruto de <i>Arabidopsis</i>	29
VI.2	Expresión del marcador de auxinas DR5::GFP	30
VI.3	Sistema de transactivación	31
VI.4	Tratamientos con citocininas en plantas silvestres y mutantes De genes <i>WIP2</i> y <i>WIP5</i>	35
VI.5	Análisis del fenotipo y de los patrones de expresión de genes WIP	40
VII.	DISCUSIÓN	42

VIII. CONCLUSIONES	45
IX. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología de una planta adulta y un fruto maduro de <i>Arabidopsis</i>	7
2	Modelo de señalización de las citocininas	12
3	Esquema de un dedo de zinc	14
4	Motivos predichos en la familia de genes WIP de <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
5	Esquema general de la metodología	28
6	Expresión del marcador de citocininas TCS::GFP	20
7	Comparación entre el patrón de expresión del marcador de auxinas DR5::GFP y el marcador de citocininas TCS::GFP	31
8	Patrones de expresión de los promotores <i>SHP</i> (pAGL5), <i>FUL</i> (pAGL8) y pBP en frutos jóvenes y maduros	32
9	Fenotipo en líneas de transactivación	33
10	Microscopía electrónica del replum en líneas de transactivación y planta silvestre.	34
11	Gráfico que muestra la diferencia en el tamaño del replum, distancia de valva a valva y número de células en las diferentes cruzas de transactivación	35
12	Respuesta en los frutos silvestres y mutantes (<i>wip2</i> , <i>wip5</i> y <i>wip2 wip3</i>) al tratamiento con BAP	36
13	Morfología de fruto silvestre tratado con BAP	37
14	Cortes en frutos silvestres sin y con tratamiento de BAP 100µM	38
15	Inducción con K y BAP en plántulas de la línea <i>WIP2</i> -GUS	39
16	Patrón de expresión de los genes <i>WIP2</i> y <i>WIP5</i>	40
17	Fenotipo en hoja de líneas de sobreexpresión de los genes <i>WIP2</i> y <i>WIP5</i>	41

RESUMEN

Las hormonas regulan varios aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas, tales como el establecimiento y desarrollo del fruto. En particular, las citocininas juegan un papel importante en el control de las actividades del meristemo y recientemente se ha descrito su función en otros tejidos como hojas y flores, pero su participación en fruto no está bien definida. Por lo cual, este trabajo tiene como objetivo analizar el rol de las citocininas en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* y su relación con los genes *WIP2* y *WIP5* en la vía de señalización de citocininas; basándonos en el hecho de que los genes *WIP* regulan varios aspectos del desarrollo y que se ha reportado que *WIP2* interactúa físicamente con un elemento de señalización de citocininas. Para definir esto, analizamos la expresión de las citocininas mediante la línea de fusión entre el marcador de citocininas y la proteína verde fluorescente (TCS-GFP); líneas de transactivación donde manipulamos los niveles de expresión de citocininas, mediante la expresión del gen de biosíntesis de citocininas (*AtIPT7*) y el gen de degradación de citocininas (*AtCKX3*) en plantas silvestres del ecotipo Landsberg erecta; y líneas mutantes y sobreexpresantes de genes *WIP*, donde analizamos el fenotipo y la respuesta a tratamientos con citocininas aplicadas exógenamente. Para verificar la expresión de los genes *WIP* se usaron líneas reporteras con GUS. Finalmente observamos las diferencias morfológicas y los patrones de expresión en estas líneas durante el desarrollo.

I. INTRODUCCIÓN.

Arabidopsis thaliana es de las plantas mejor caracterizada y se ha utilizado ampliamente por la comunidad científica como modelo de estudio por numerosas razones, entre las cuales destacan; la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma, su corto tiempo de generación y tamaño. Estas características facilitan ampliamente los estudios de mutagénesis y clonación de genes, lo que ha permitido que, hasta ahora, existan una gran cantidad de mutantes caracterizadas para varios genes de *Arabidopsis*. Conocer los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y otros procesos de *Arabidopsis* es clave para entender la función de los genes en organismos más complejos.

Una de las maneras para analizar la función de uno o varios genes es mediante la alteración en estos genes, provocando una ganancia o una pérdida de función y posteriormente observar la respuesta en el fenotipo de la planta para inferir el papel que tienen estos genes en el ciclo de vida del organismo. Particularmente en este trabajo nos enfocamos en la relación entre los genes *WIP2* (No transmitting tract *NTT* ó *WIP* domain protein 2) y *WIP5* (*WIP* domain protein 5) y las fitohormonas citocininas durante el desarrollo de *Arabidopsis*, para lo cual contamos con líneas de sobreexpresión para los genes *WIP2* y *WIP5*, obtenidas mediante la técnica activation tagging bajo el control de un promotor 35S; así como también con líneas mutantes con pérdida de función para estos genes, obtenidas mediante inserciones de elementos transponibles en la región codificante del gen. Por otro lado se tienen líneas de fusión con la proteína verde fluorescente GFP (por sus siglas en inglés green fluorescent protein) para el marcador de auxinas DR5::GFP y el marcador de citocininas TCS (por sus siglas en inglés two component system), la cual tiene 6 elementos repetidos de la secuencia **AAAATCTACAAATCTTTTTGGATTTTGTGGATTTTCTAGC** (los pentámeros de los ARR del tipo B están en negritas), clonada bajo el control de un promotor mínimo 35S con una caja TATA seguido de la región codificante de la proteína verde fluorescente. Se cuenta con otras líneas de fusión con el promotor de los

genes *WIP2* y *WIP5* y el gen reportero GUS (β -glucoronidasa). Las líneas de fusión nos permiten observar la expresión de los marcadores de auxinas y citocininas y los patrones de expresión de los genes *WIP* en respuesta a citocininas durante el desarrollo en *Arabidopsis*. La planta silvestre del ecotipo Columbia se utiliza como patrón de comparación con las mutantes en la morfología durante el desarrollo. Por otra parte, manipulamos los niveles de expresión de citocininas, mediante la expresión del gen de biosíntesis de citocininas *AtIPT7* y el gen de degradación de citocininas *AtCKX3*, usando los promotores *pBP*, *pAGL5 (SHP)* y *pAGL8 (FUL)*, y analizamos su efecto en el desarrollo, y la expresión de los promotores mediante el análisis del gen reportero GUS.

Es bien sabido que las fitohormonas regulan el desarrollo y crecimiento en las plantas. En particular las citocininas juegan un papel clave en la regulación de la diferenciación, división y elongación celular mediante el control de las actividades del meristemo, esta regulación es muy importante, ya que toda la morfología final de la planta se genera por la actividad de los meristemas. Actualmente la vía de señalización de las citocininas está bien entendida, pero aun no está claro como las diferentes moléculas involucradas en la vía interactúan con otras proteínas o regulan la actividad de otros genes. Por lo tanto, el conocimiento de estas interacciones contribuirá a la comprensión de su modo de acción en el desarrollo de las plantas.

Recientemente Dortay y colaboradores, encontraron que los reguladores de respuesta tipo-A, *ARR4* y *ARR16*, involucrados en la regulación por retroalimentación de la vía de señalización de las citocininas y en la inhibición de las actividades del meristemo, interactúan directamente con la proteína *WIP2*; sin embargo, los mecanismos moleculares utilizados para convertir la señal en un proceso biológico no han sido elucidados hasta el momento. Por lo cual, este trabajo pretende analizar la función de estos genes *WIP*, cuya función en el desarrollo ha sido descrita, su respuesta al tratamiento con citocininas y su implicación en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis thaliana*.

II. ANTECEDENTES.

II.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta con flores perteneciente a la familia de las crucíferas, nativa de Europa, Asia y el noroeste de África (Marsch, 2008). Es considerada el modelo genético más importante en el estudio de la biología de plantas (Beilsten y col., 2010) por numerosas razones entre las cuales destacan: la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma que es relativamente corto con 125 Mb, del cual se estima que contiene cerca de 27 000 genes que codifican para proteína y más de 6 000 no codificantes distribuido en sólo cinco cromosomas; su tamaño de alrededor de 30 cm, su carácter diploide, así como su corto tiempo de generación y alta tasa de éxito reproductivo; hacen de *Arabidopsis* un excelente modelo facilitador de los estudios de mutagénesis y clonación de genes (Joosen y col., 2009; Beilsten y col., 2010; Marsch, 2008; Heh y Bülow, 2008). Además han sido caracterizadas fenotípicamente una gran cantidad de mutantes y hay disponibles mutaciones insercionales para casi todos los genes de *Arabidopsis* (Heh y Bülow, 2008).

II.2 Análisis funcional de genes.

En genética molecular, la función de un gen se deduce al alterar dicho gen y observar la respuesta a través del fenotipo del organismo; enfoque que ha tenido mucho éxito en la identificación de moléculas involucradas en diversos procesos biológicos (Van Norman y Benfey, 2009). Las alteraciones en los genes pueden hacerse para obtener un organismo mutante con ganancia de función (sobre expresarlos) o una pérdida de función (silenciarlo o eliminar la función de dicho gen) en uno o más genes (Kuromori y col., 2009). Para analizar el fenotipo de mutantes combinadas o mutantes con marcadores se hacen cruza y se observan las diferencias con respecto a un control, en este caso particular una planta

silvestre del ecotipo Columbia o Landsberg erecta de *Arabidopsis* y mutantes sencillas.

Entendemos por cruzamiento el apareamiento controlado entre dos organismos, o bien, como en algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* consigo mismos, fenómeno conocido como autocruzamiento. Los cruzamientos se realizan con el fin de obtener descendencia de genotipos concretos a partir de parentales en los que se conoce el genotipo y las relaciones de dominancia o, al revés, observando las proporciones y los fenotipos de los individuos en la descendencia inferimos los genotipos y las relaciones de dominancia de los parentales (Griffiths y col., 2000).

La primera generación de un cruzamiento se llama parental (P). Después de cruzar dos variedades de la generación P, la descendencia resultante de este cruzamiento es la primera generación filial (F1); estas plantas expresan sólo el fenotipo del rasgo dominante, en otras palabras, son heterocigotos para un carácter. El cruzamiento entre los individuos de la F1 genera la segunda generación filial (F2); en F2 reaparecen los rasgos presentes en la generación parental, los cuales están aparentemente ocultos en la F1, en una proporción aproximada de 3 a 1, es decir; alrededor de $\frac{1}{4}$ de las semillas son heterocigotos recesivos y presentan el fenotipo correspondiente al alelo recesivo, mientras que en las plantas restantes $\frac{1}{4}$ es homocigota dominante y $\frac{1}{2}$ heterocigoto (Pierce, 2009).

El fenotipo se observa durante todas las fases de desarrollo de la planta para identificar diferencias morfológicas entre la planta mutante y la silvestre. En este trabajo contamos con líneas de plantas mutantes con sobreexpresión para los genes *WIP2* y *WIP5*, así como también con mutantes de pérdida de función o knockout para estos genes. Por otro lado se tienen líneas de fusión con la proteína verde fluorescente GFP (por sus siglas en inglés green fluorescence protein) para el marcador de citocininas TCS (por sus siglas en inglés two component system) y los genes *WIP* con el gen reportero GUS (β -glucoronidasa). La manipulación en los niveles de citocininas se hará mediante el control de la expresión en los genes de

degradación de citocininas, isopentenil transferasa (*IPT7*) y el gen de biosíntesis de citocininas, citocinina oxidasa (*CKX3*).

II.3 Fases del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

En las plantas prácticamente toda la morfología de la planta adulta (Figura 1A) se genera por la actividad de los meristemos apicales (Capron y col., 2009). Una vez ocurrido el evento de doble fecundación comienza el desarrollo de dos estructuras íntimamente relacionadas, el embrión (diploide) y el endospermo (triploide), que se derivan del cigoto y la célula central fertilizada respectivamente. Las siguientes fases de desarrollo ocurren aproximadamente a los 7 días y se dividen en globular, forma de corazón, de torpedo y finalmente formación de los cotiledones. Conforme el embrión madura las silicuas que contienen a las semillas, se vuelen amarillas hasta que se secan completamente y liberan a las semillas. Los embriones contenidos en la semilla madura cuentan con los órganos necesarios para el desarrollo temprano. Estos son: el meristemo apical, los cotiledones u hojas embrionarias, el hipocotilo, la radícula o raíz embrionaria y el meristemo de la raíz. (Capron y col., 2009; Weigel y Glazebrook, 2002).

El desarrollo de la raíz sigue un linaje definido a partir de un centro quiescente de células meristemáticas que dan lugar a cuatro tipos de células troncales. Estos son: la capa epidermal lateral de la raíz, que da lugar a la epidermis y a la envoltura de la raíz; la parte central de la raíz o columella, que da lugar a la endodermis y a la corteza; el tejido vascular y el periciclo. A partir de la raíz primaria se extienden las raíces laterales y los cabellos de la raíz emergen de las células epidermales en un patrón regular (Scheres y col., 2002; Weigel y Glazebrook, 2002).

El desarrollo continúa con la formación de los primordios foliares desde el meristemo apical para formar las hojas de la roseta, dichas hojas no tienen tricomas en su superficie inferior o abaxial. Subsecuentemente las hojas surgen en espiral y tienen tricomas en ambas superficies. Las primeras dos hojas verdaderas

surgen una frente a la otra y son más o menos redondas, las siguientes hojas surgen en espiral y son más ovaladas (Tsukaya, 2002). La parte en que la hoja se une al tallo se llama peciolo y el resto se compone de la lamina foliar. (Weigel y Glazebrook, 2002).

La flor puede ser considerada parte del mismo sistema de desarrollo que la hoja ya que sus órganos son hojas modificadas. El meristemo apical primario da lugar al meristemo floral que después se divide en 4 verticilos concéntricos que formarán los órganos principales, los cuales son, de afuera hacia adentro, 4 sépalos, 4 pétalos, 6 estambres y 2 carpelos unidos congenitamente para formar el gineceo central. Durante la organogénesis los genes homeóticos ABC parecen controlar el ritmo y la orientación de las divisiones celulares dando lugar a diferentes órganos en el primordio floral dentro de cada verticilo, posteriormente las células se diferencian en distintos tipos dentro de cada órgano hasta formar el brote principal que más tarde se alarga y forma parte de una inflorescencia. Las hojas caulinas decoran la parte baja, creciendo alrededor del tallo en un patrón en espiral al igual que las flores. (Álvarez-Buylla y col., 2010; Weigel y Glazebrook, 2002).

El desarrollo del polen o gametofito masculino ocurre en los lóculos de las anteras, donde una célula madre microspora sufre meiosis y produce una tétrada de microsporas, dos subsecuentes divisiones mitóticas producen granos de polen maduros que contienen un núcleo y dos espermatozoides. Cada flor de *Arabidopsis* puede producir hasta 1000 granos de polen. Para el desarrollo del gametofito femenino un megasporito sufre meiosis y uno de los productos sobrevive para formar la megaspora, 3 subsecuentes divisiones mitóticas dan lugar al saco embrionario que contiene los óvulos y una célula central (Weigel y Glazebrook, 2002).

El fruto se define como el ovario maduro que se desarrolla a partir del gineceo después de la fertilización y forma una silicua, estructura especializada en proteger la semilla mientras esta se desarrolla y liberarla cuando ha madurado. El gineceo

es la estructura reproductiva femenina que incluye el ovario y se forma de dos carpelos fusionados congénitamente; tiene 4 diferentes regiones, estas son, de arriba hacia abajo: el estigma, el estilo, el ovario (que consiste en valvas, replum, septum y margen de las valvas) y el ginóforo, que es el pequeño internodo en la base del fruto por encima de la zona de abscisión de los órganos florales y los nectarios. (Roder y Yanofsky, 2006; Girin y col, 2009), ver Figura 1B.

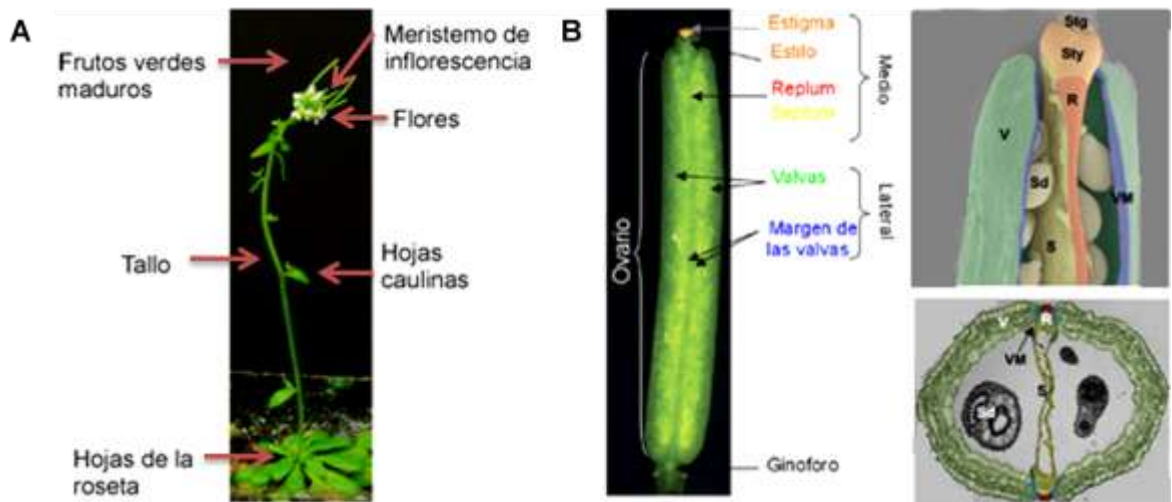


Figura 1. Morfología de una planta adulta y un fruto maduro de *Arabidopsis*. A) Tejidos principales en una planta adulta de *Arabidopsis*. (Autoría propia). B) Estructura de un fruto maduro, del lado izquierdo se indican los tejidos medios y laterales. Del lado derecho se muestran micrografías electrónicas de un fruto dehiscente, las valvas (V, verde) se han separado parcialmente del replum (R, rojo) en el margen de las valvas (VM, azul) revelando el septum (S, amarillo) y las semillas (sd); el estigma (stg) y el estilo (sty) están en color naranja. En la parte de abajo se muestra una sección transversal del fruto. (Girin y col, 2009).

II.4 Papel de las hormonas en el desarrollo de las plantas.

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos de bajo peso molecular derivadas del metabolismo secundario, encargadas de coordinar el desarrollo mediante la modulación del crecimiento en respuesta a señales intrínsecas y medioambientales, definiendo así la arquitectura final de la planta (Jaillais y Chory, 2010; Wolters y Jürgens, 2009). En general, este control en el desarrollo se ejerce

a nivel de la división celular, expansión, diferenciación y muerte celular (Bishopp y col., 2006).

Hasta la fecha han sido identificadas 10 fitohormonas que son: auxinas, ácido abscísico, citocininas, giberelinas, etileno, brasinoesteroides, jasmonato, ácido salicílico, óxido nítrico y estrigolactonas (Santner y Estelle, 2010). Las auxinas, citocininas, giberelinas y brasinoesteroides son fitohormonas que estimulan el crecimiento, mientras que el ácido abscísico, el etileno y el ácido jasmónico principalmente median las respuestas al estrés (Wolters y Jürgens, 2009).

Las hormonas vegetales difieren entre ellas en sus condiciones de biosíntesis, transporte, acción y degradación (Wolters y Jürgens, 2009). Referiremos algunas características de cada una de las hormonas enfatizando el papel de las citocininas en el desarrollo de las plantas.

Auxinas. El ácido 3 indolacético es la principal auxina en la mayoría de las plantas. Las auxinas se sintetizan del indol o del triptófano a través de las vías dependientes o independientes de triptófano (Davies, 2004; Woodward y Bartel, 2005), ninguna totalmente elucidada (Rodríguez y col., 2010). El transporte de auxinas es por interacciones célula-célula y se sintetizan a través de la planta en varios tejidos como hojas y semillas jóvenes o raíces, manteniendo así un gradiente de auxinas en toda la planta (Normanly, 2009; Davies, 2004). Las auxinas actúan como una señal para la división, elongación y diferenciación celular (Rodríguez y col., 2010) interviniendo en proceso como el alargamiento celular, diferenciación del tejido vascular, abscisión de las hojas, establecimiento y crecimiento del fruto, floración, respuesta a tropismo en meristemas y raíz entre otras (Davies, 2004). La degradación de las proteínas señalizadoras de las auxinas ocurre vía proteosoma mediante ubiquitinación (Bishopp y col., 2006; Santner y Estelle, 2009).

Giberelinas. Son una gran familia de fitohormonas tetracíclicas diterpenoides sintetizadas a partir del geranil difosfato (Wolters y Jürgens, 2009; Bastian y col.,

2010). Las giberelinas afectan un amplio rango de procesos en el crecimiento, desarrollo y respuestas al medio ambiente en las plantas, a través de la homeostasis entre las formas activas e inactivas de giberelinas. Estos procesos incluyen la germinación y desarrollo de la semilla, expansión de la hoja, alargamiento del tallo y floración (Bastian y col., 2010; Rodríguez y col, 2010).

Brasinoesteroides. Son un grupo de hormonas vegetales sintetizadas a partir de un precursor esterol (Wolters y Jürgens, 2009). Regulan varios aspectos del desarrollo de la planta a muy bajas concentraciones, incluyendo elongación celular, fotomorfogénesis, diferenciación del xilema, germinación de la semilla, adaptación al estrés biótico y abiótico del medio ambiente y también promueven la biosíntesis de etileno (Divi y col, 2010; Davies, 2004).

Etileno. Es una fitohormona gaseosa derivada de la metionina (Zhu y Guo, 2008; Wolters y Jürgens, 2009). Sintetizada en tejidos senescentes o durante la maduración en respuesta al estrés (Davies, 2004). Regula varios aspectos en el ciclo de vida de la planta como por ejemplo: la germinación y crecimiento de la semilla, iniciación floral y de la raíz, desarrollo de la flor, maduración del fruto, senescencia de hojas y flores y respuestas al estrés biótico y abiótico, donde representa un papel clave en la aptitud de una planta para la adaptación y reproducción (Zhu y Guo, 2008; Lin y col., 2009).

Ácido abscísico. Se deriva del ácido linoléico. La función del ácido abscísico está relacionada con la respuesta al estrés biótico y abiótico en las plantas, es una molécula clave en la respuesta al estrés salino, de sequía y térmico (Wolters y Jürgens, 2009; Divi y col., 2010).

Ácido salicílico. Se sintetiza a partir del aminoácido fenilalanina. Está involucrado en la resistencia a patógenos, termogénesis e inhibe biosíntesis de etileno y germinación de la semilla, también revierte los efectos del ácido abscísico (Divi y col., 2010; Davies, 2004).

Jasmonato. Se deriva de la zeaxantina está principalmente involucrado en la defensa de la planta contra patógenos, pero también regula crecimiento (Jaillais y Chory, 2010), pues es un inhibidor del crecimiento y la germinación de la semilla y en *Arabidopsis* es esencial para el desarrollo reproductivo masculino (Davies, 2004).

Citocininas. Las citocininas son una clase de fitohormonas derivadas de la adenina (Müller y Sheen, 2008), importantes en la regulación de la división celular y la diferenciación (Kiba y col., 2002) y actúan antagónicamente a las auxinas en el control de las actividades del meristemo (Jaillais y Chory, 2010).

II.4.1 Las hormonas y el establecimiento del fruto en *Arabidopsis*.

El establecimiento del fruto puede definirse como la activación del programa de desarrollo que convierte un pistilo en un fruto desarrollado. Aparentemente estos cambios son originados por un evento de fertilización de los óvulos, pero la existencia de frutos partenocárpicos y la inducción de frutos en flores emasculadas mediante la aplicación de auxinas y giberelinas, indica que la fertilización no es un requerimiento absoluto. Estas observaciones sugieren que tanto las auxinas como las giberelinas son elementos importantes en la señalización inicial durante el establecimiento del fruto. Después de la fertilización del ovulo, la primera señal parecen ser las auxinas, las cuales promueven la acumulación de giberelinas tanto en el ovulo fertilizado como en el ovario, donde finalmente dan lugar al fruto desarrollado. En algunas especies hay una participación menor de citocininas y ácido abscísico, como homólogos de las giberelinas (Dorcey y col, 2009; Alabadí y col, 2009, Arnaud y col, 2010).

Para explicar la diferenciación de los tejidos en el fruto se ha adoptado una hipótesis basada en un gradiente decreciente de auxinas a lo largo del gineceo, donde se establece que las auxinas deben ser sintetizadas en la parte apical del gineceo y transportadas a la parte basal (Nemhauser y col, 2000). De acuerdo con

esta hipótesis, altos niveles de auxinas promoverían la diferenciación del estilo y el estigma, niveles intermedios formarían el ovario y niveles bajos el tallo basal donde se encuentra el ovario (Sundberg y Ostergaard, 2009; Albadí y col, 2009).

II.5 Citocininas: Importancia y señalización.

En los últimos años, ha habido un gran avance en la elucidación y caracterización de las vías de transducción de señales para diferentes fitohormonas, como es el caso de las citocininas (Dortay y col., 2007).

La señalización de las citocininas esta mediada por un sistema de dos componentes TCS (por sus siglas en inglés two-component system) (Müller y Sheen, 2008, Dortay y col., 2007), Figura 1. Los receptores de citocininas histidina cinasa AHK2, AHK3 y CRE1/AHK4 cuentan con un dominio extracelular de unión a citocininas, un dominio citoplasmático histidina cinasa, un dominio receptor y un domino parecido al receptor (To y Kieber, 2008). Estos receptores están anclados en la membrana y cuando perciben un estímulo se autofosforilan en un residuo conservado de histidina del dominio de la cinasa. El grupo fosforilo en la histidina es transferido vía un residuo conservado de aspartato a un intermediario de la fosfotransferencia que contiene histidina (AHP por sus siglas en ingles Histidine Phosphotransfer proteins) AHP1, AHP2, AHP3, AHP4 o AHP5 en el citoplasma (Kiba y col., 2002; To y Kieber, 2008). Los receptores CRE1/AHK4 pueden mediar una reacción reversa de la transferencia del fosfato (To y Kieber, 2008). Los AHPs pueden translocarse en el núcleo para transferir el grupo fosforilo a un residuo conservado de ácido aspártico en el dominio receptor de un regulador de respuesta (ARR), tipo-A o tipo-B (To y Kieber, 2008; Wolters y Jürgens, 2009).

El tipo-B de ARRs contiene un dominio C-terminal de unión al ADN y un dominio receptor N-terminal; el cual, desfosforilado, reprime al dominio C-terminal. La fosforilación del tipo-B de ARRs libera esta represión e induce la transcripción de un subconjunto de blancos reguladores de la vía de señalización mediada por

citocininas, que incluyen los ARR tipo-A y los factores de respuesta a citocininas CRF (por sus siglas en inglés cytokinin response factors). Las proteínas CRF también son activadas por las citocininas vía la acumulación de los AHPs en el núcleo para activar directamente la transcripción (To y Kieber, 2008). El tipo-B de ARRs y los CRFs median algunos procesos en la señalización de citocininas como son; el desarrollo de la semilla y los brotes, la de-etiolación, la expansión de la hoja, la diferenciación vascular, también retrasa senescencia en la hoja y regula la homeostasis de las citocininas, en algunas especies se ha encontrado que puede potenciar la apertura de los estomas y el desarrollo de los cloroplastos (To y Kieber, 2008; Davies, 2004).

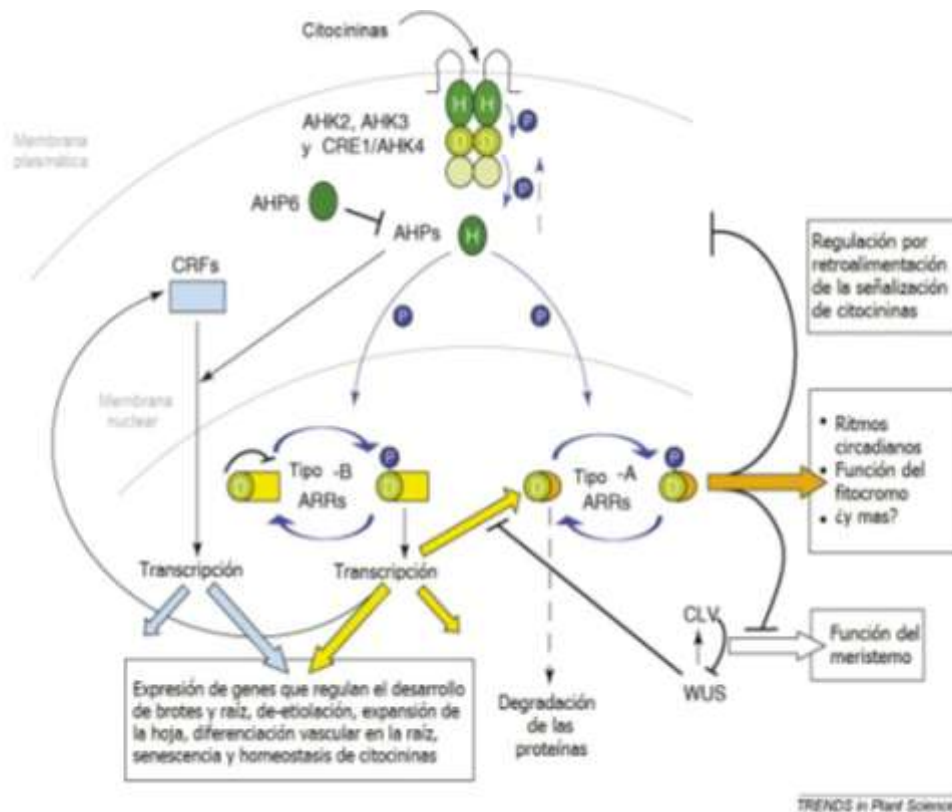


Figura 2. Modelo de señalización de las Citocininas (To y kieber, 2008).

El tipo-A de ARRs contiene un dominio receptor conservado y una región corta C-terminal. La fosforilación de los ARRs tipo-A median procesos rio abajo tales como:

la retroalimentación de la vía, el control de la función del fitocromo, la regulación de los ritmos circadianos e inhibición del desarrollo del meristemo; estos tipos de ARR, desfosforilados, son fácilmente degradados. La transcripción de los ARRs tipo-A es reprimida por el factor de transcripción wuschel (WUS), el cual es requerido para el mantenimiento de los meristemos apicales. WUS y clavata (CLV) mantienen la señalización por retroalimentación para regular la población de las células meristemáticas (To y Kieber, 2008).

El flujo de señales básicas en el sistema de dos componentes TCS mediado por citocininas está bien entendido (cómo se muestra en la Figura 2.), pero no está claro cómo esta vía se integra con el resto del proteoma. Por lo tanto, el conocimiento de las interacciones de las proteínas del TCS contribuirá a la comprensión de su modo de acción. Recientemente Dortay y colaboradores, encontraron que los reguladores de respuesta tipo-A, ARR4 y ARR16 interactúan directamente con la proteína WIP2; sin embargo, los mecanismos moleculares utilizados para convertir la señal llevada por los TCS en procesos biológicos no ha sido elucidada hasta el momento. Por lo cual, este trabajo pretende analizar la función de estos genes WIP dentro de la vía de señalización de las citocininas y su implicación en el desarrollo de la planta *Arabidopsis thaliana*.

II.6 Familia de genes y proteínas WIP.

Las proteínas WIP forman una subfamilia específica de proteínas de dedos de zinc ZFs (por sus siglas en inglés zinc fingers) C2H2 en las plantas (Appelhagen y col., 2010). Los dedos de zinc son motivos protéicos que forman estructuras estabilizadas por iones de zinc (Sagasser y col., 2002) y constituyen uno de los motivos más comunes de unión al ADN en los factores de transcripción de organismos eucariotas. También han sido implicados en la unión al ARN y como mediadores en las interacciones proteína-proteína, recientemente se ha descrito también su función como motivos de unión a lípidos (Appelhagen y col., 2010; Sagasser y col., 2002; Isalan, 2004).

Los dedos de zinc se clasifican de acuerdo al número y orden de los residuos de histidina y cisteína, las cuales coordinan los iones zinc para mantener las características de la estructura terciaria de la proteína (Appelhagen y col., 2010). El motivo clásico en un dedo de zinc (C₂H₂) está formado por una estructura que consiste en la unión de dos hojas beta y una alfa hélice ($\beta\beta\alpha$) y contiene un par de cada uno de los residuos de histidina y cisteína que tetraédricamente unen un ion zinc (Sagasser y col., 2002; Appelhagen y col., 2010), como se muestra en la Figura 3.

Otro rasgo característico de la mayoría de los dedos de zinc C₂H₂ en las plantas es la presencia de seis aminoácidos (QALGGH) en el extremo N-terminal de la región helicoidal. Sin embargo, no todos los ZFs contienen esta secuencia, un ejemplo de ellos son las proteínas que contienen el dominio WIP.

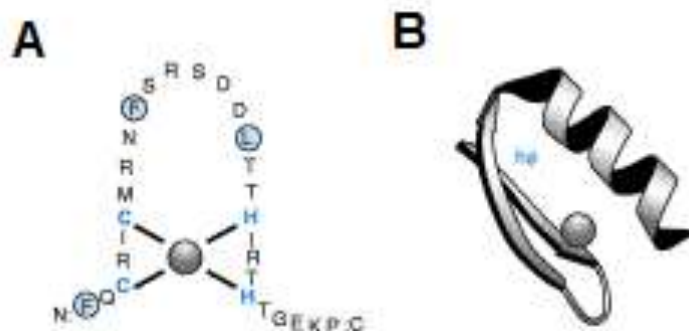


Figura 3. Esquema de un dedo de Zinc. A) Dibujo de la forma clásica de un dedo de zinc, se representa la cadena de amino ácidos (código de una letra) y los pares de cisteína e histidina quelantes del ion central zinc. B) Representación de la estructura clásica $\beta\beta\alpha$ de un dedo de zinc.

La familia A1 de proteínas de dedos de zinc ZFPs (por sus siglas en inglés zinc finger proteins) en las plantas está caracterizada por cuatro motivos de dedos de zinc. Dentro de esta familia el subgrupo A1d cuenta con seis miembros en *Arabidopsis thaliana* de los cuales todos tienen sus ZFs en una región C-terminal

altamente conservada, llamado dominio WIP, acorde con los primeros 3 aminoácidos de la secuencia consenso (triptófano, isoleucina y prolina) y recientemente descritos como genes *WIP* (Appelhagen y col., 2010; Crawford, 2007), ver Figura 4.

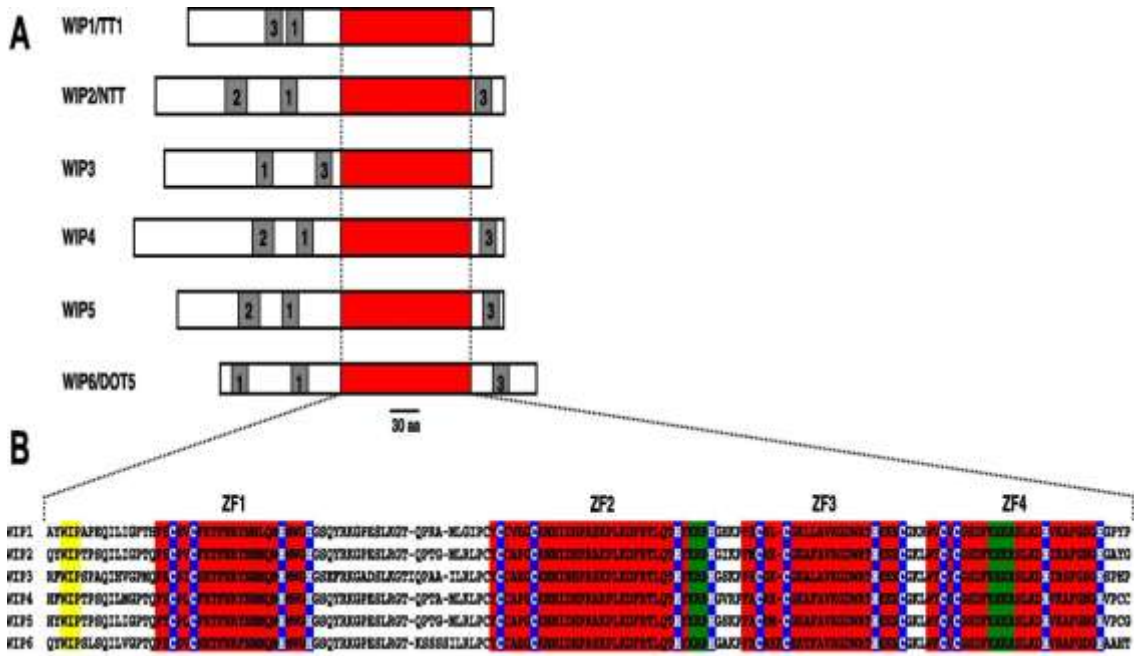


Figura 4. Motivos predichos en la familia de proteínas WIP de *Arabidopsis thaliana*. A) Representación esquemática del dominio WIP, que se muestra en color rojo para las diferentes proteínas de la familia WIP. B) Alineación de amino ácidos del dominio WIP. Los tres primeros amino ácidos conservados están marcados en color amarillo, los motivos de dedos de zinc están marcados en rojo, los residuos que coordinan la unión del zinc se remarcan en azul y la señal de localización nuclear en verde (Appelhagen y col., 2010).

En las plantas muchas proteínas de dedos de zinc actúan como factores de transcripción con funciones regulatorias en el desarrollo y la diferenciación, por ejemplo la proteína WIP2 juega un papel importante en el desarrollo del tracto de transmisión, el cual es importante para el crecimiento del tubo polínico (Sagasser y col., 2001; Appelhagen y col., 2010). Por otro lado el gen *WIP2* tiene una participación en el desarrollo del replum del fruto, donde actúa como un regulador positivo para el gen *BP*, el cual, a su vez, es un regulador clave que promueve el

desarrollo del replum (Marsch y col., datos no publicados). Basándonos en estas observaciones inferimos que posiblemente el gen *WIP2* puede estar involucrado en la regulación del desarrollo, muy posiblemente mediante la interacción directa o indirecta con algún factor clave en la vía de señalización por citocininas.

Por otro lado, dentro de la subfamilia del dominio WIP, el gen más parecido en secuencia a *WIP2* es el gen *WIP5*, y ya que se ha visto que en mutantes con pérdida de función (Knockout) para el gen *WIP2* el fenotipo en el desarrollo del fruto no es severo se pretende estudiar la función del gen *WIP5*, y determinar si tiene una función redundante con *WIP2* (Marsch y col., datos no publicados).

II.7 Sistema de Transactivación, implicación de la síntesis y degradación de citocininas en la planta.

Para probar si las citocininas están involucradas en alguna fase del desarrollo, con especial atención al desarrollo del fruto de *Arabidopsis*, manipularemos los niveles de citocininas, utilizando el sistema de transactivación LhG4, el cual permite que un gen de interés sea activado en un tejido específico de la planta después de una cruce con la línea transgénica definida (Moore y col, 1998). En este sistema una línea acarreadora (PRO:LhG4) que expresa el factor de transcripción sintético LhG4 bajo el control de un promotor específico es cruzada con una línea responsiva (OP:GEN), la cual expresa el gen de interés río abajo para varias copias del operador de *Escherichia coli*, reconocido por LhG4. Las plantas resultantes que tengan ambas construcciones (PRO>>GEN ó pGEN x op:GEN) expresan el gen de interés en el dominio de expresión del promotor específico. (Moore y col, 1998, Shani y col, 2010). Mediante estas cruces de transactivación expresaremos el gen de biosíntesis de citocininas, isopentenil transferasa *ASE7* (At *IPT7*), y el gen de degradación de citocininas, citocinina oxidasa 3 (At *CKX3*) (Shani y col, 2010), bajo el control de los promotores *BP*, fusionado a el gen reportero GUS, *FUL* (pAGL 8) y *SHP2* (pAGL 5) y analizaremos tanto sus efectos en el desarrollo como los patrones de expresión.

III.HIPÓTESIS

Las citocininas juegan un papel importante en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis thaliana*, y miembros de la familia WIP (WIP2 y WIP5) intervienen en la vía de señalización de estas hormonas.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 General

Analizar el rol de las citocininas en el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* y su relación con los genes *WIP2* y *WIP5* en la regulación de la señalización mediada por citocininas.

IV.2 Específicos

- ❖ Determinar el patrón de expresión del marcador de citocininas TCS-GFP en frutos silvestres, en comparación con el marcador de auxinas DR5-GFP.
- ❖ Analizar detalladamente las diferencias morfológicas de plantas en la generación F1 de líneas de transactivación.
- ❖ Examinar los efectos morfológicos de tratamientos de citocininas en plantas silvestres y mutantes *WIP2* y *WIP5*.
- ❖ Comparar la respuesta de estos genes a citocininas mediante líneas marcadoras con el gen reportero GUS expuestas a dichas hormonas.
- ❖ Observar el fenotipo de líneas con pérdida de función (knockout KO) y sobre expresantes de *WIP5* en comparación con *WIP2*.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales.

V.1.1 Material Biológico

V.1.1.1 Líneas experimentales del ecotipo Columbia de *Arabidopsis*

Columbia silvestre: COL WT (wild type)

V.1.1.1.1 Líneas mutantes.

Líneas knockout del gen *WIP5*: *wip5*.

Línea knockout del gen *WIP2*: *wip2*

Línea doble mutante de los genes *WIP2* y *WIP3*: *wip2 wip3*.

V.1.1.1.2 Líneas sobre expresantes.

Línea sobre expresante del gen *WIP5*: 35S:*WIP5*.

Línea sobre expresantes del gen *WIP2*: 35S *WIP2*.

V.1.1.1.3 Líneas de fusión marcadoras.

Línea de fusión de un promotor responsivo a citocininas con el gen de la proteína verde fluorescente GFP: TCS::*GFP*.

Línea de fusión de un promotor responsivo a auxinas con el gen de la proteína verde fluorescente GFP: DR5::*GFP*

Línea de fusión del promotor del gen *NO TRANSMITTING TRACT/NTT (WIP2)* con el gen reportero GUS: WIP2-GUS.

Línea de fusión del promotor del gen *WIP DOMAIN PROTEIN 5 (WIP5)* con el gen reportero GUS: WIP5-GUS.

V.1.1.2 Líneas de transactivación del ecotipo Landsberg erecta:

Landsberg erecta silvestre: *Ler* WT

Para los promotores: pBP, pAGL8 (*FUL*) y pAGL5 (*SHP2*)

Para los genes: op:*GUS*, op:*IPT7* y op:*CKX3*

V.1.2 Material de laboratorio

Cristalería de laboratorio PYREX[®]

Cajas de petri 100 x 15 SyM laboratorios[®]

Portaobjetos (24.4 x 76.2 mm) LAUKA[®] y cubreobjetos (24 x 50 mm) CORNING[®]

Placas para tinción de GUS costar[®]

Puntas para micropipeta

Tubos eppendorf 15 y 50 ml AXIGEN[®]

Tubos falcon BIOLOGIX[®]

Pinzas WPI[®]

Mechero de bunsen HANAU[®]

V.1.3 Material de invernadero

Fertilizante Universal soluble en Agua Miracle-Gro[®]

Mezcla de tierra para *Arabidopsis*

Charolas

Macetas

Aspersores

V.1.4 Reactivos.

Agua desionizada, extra pura MQ y estéril

Parafina SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, MO.

Yoduro de propidio SIGMA-ALDRICH[®] Buchs

Etanol Reproquifin[®] Mexico df.

Formaldehído SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, MO.

Ácido acético glacial Karal[®] Leon, Gto.

Histoclear Electron Microscopi Science[®], Hetfield PA

Fosfato de sodio monosódico y dibásico SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, MO.

EDTA invitrogen[®], Carlsbad CA

Tritón SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, MO.

Azul de alcian X-GLUC SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, MO

Ácido acético SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, MO.

Rojo nuclear SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, MO.

Hidróxido de sodio J.T.Baker[®] Sweden

Murashige & Skoog Phytotechnology Laboratories[®] Shawnee Mission, KS

Agar para planta Phytotechnology Laboratories[®] Shawnee Mission, KS

V.1.4.1 Soluciones

Etanol (70%, 85%, 96% y 100%)

Solución FAE para fijar tejidos (50% etanol, 3.7 % formaldehído, 5% ácido acético glacial)

Soluciones de histoclear-etanol (25% histoclear + 75% etanol, 50% histoclear + 50% etanol, 75% histoclear + 25% etanol y 100% histoclear)

Solución X-gluc (0.1 M buffer de fosfatos pH 7.0, 0.5 M EDTA, Triton 10%, X-Gluc, agua MQ)

Solución azul de alcian (azul de alcian 1g y 100 ml de una solución de ácido acético 3%, pH: 3.1)

solución de rojo nuclear 1%

Hidróxido de sodio 1N

V.1.4.2 Medios.

Medio Murashige & Skoog MS (0.5X MS, 0.5 azúcar, 1% agar para planta, pH 5.7-6.0) P

Agar para planta

V.1.4.3 Hormonas.

Kinetina 1 μ M Duchefa Biochemie[®], Hearlem The Netherlands

Bencilaminopurina 1 μ M y 100 μ M (BAP) Duchefa Biochemie[®], Hearlem The Netherlands

Ácido indolacético (IAA) 100 μ M Duchefa Biochemie[®], Hearlem The Netherlands

V.1.5 Equipos.

Micropipetas GILSON[®]

Microcentrífuga eppendorf[®] 5415 R

Vortex Labnet[®]

Balanza OHAUS[®]

Campana de flujo laminar NAUIRE[®]

Estereoscopio Leica[®] EZ4 D (Leica, Germany)

Microscopio confocal LSM 510 Meta[®] (Carl Zeiss, Germany)

Microscopio electrónico Zeiss[®] EVO40 (Carl Zeiss, Germany)

Microscopio óptico Zeiss[®] Observer.Z1

Microtomo Leica[®]

pH metro OAKTON[®]

Termomixer eppendorf[®]

Refrigeradores 4 °C, VENDO[®] y -20% °C, REVCO[®]

Ultracongelador -80°C REVCO[®]

Horno de microondas mabe[®]
Dispensador de parafina Leica[®]
Cámara fotográfica

V.2 Métodos.

V.2.1 Cruzas.

Para realizar las cruzas se quitan todos los sépalos, pétalos y estambres de la flor, dejando únicamente el pistilo; posteriormente se deposita sobre este pistilo el polen de una flor de la planta donadora, fenómeno conocido como polinización. Una vez ocurrida la fecundación del ovulo, el fruto comienza acrecer y desarrollarse en un lapso aproximado de 2 semanas, finalmente se recuperan las semillas, se esterilizan, siembran y posteriormente se analizan. Es recomendable realizar la cruzas 2 veces para asegurar la fecundación.

V.2.2 Tinciones.

V.2.2.1 Tinción de GUS.

Los tejidos recolectados se sumergen en una placa con solución de X-gluc (Buffer de fosfatos pH 7 0.1 M, EDTA 0.5 M, X-gluc 40 mM y agua extra pura MQ), se cubre la placa con papel aluminio y se almacena a 37°C por 12 h. Posteriormente se realizan de 2 a 3 lavados con etanol al 70% para clarear los tejidos y observarlos mejor en el estereoscopio. Las muestras restantes se pueden almacenar a -20°C en etanol al 70%.

V.2.2.2 Tinción azul de alcian.

Una vez que se ha cortado y fijado tejido en un cubreobjetos, este se tiñe con una solución 1% de rojo nuclear como colorante de contraste. Después se tiñen con

una solución pH 3.1 de azul de alcian 8GX (azul de alcian 1g y 100 ml de una solución de ácido acético 3%) por 30 min, posteriormente se enjuagan con agua y se dejan secar al aire libre, para posteriormente observarse al microscopio óptico.

V.2.3 Inclusión de tejidos vegetales en parafina.

Los tejidos vegetales recolectados se fijan mediante lavados de 60 min con soluciones de etanol, en el siguiente orden: EtOH 70%, 85%, 95% y 100%. Después de los lavados de etanol se inicia una serie de lavados con una solución de histoclear y etanol en el siguiente orden: 25% histoclear + 75% EtOH, dos lavados de 60 min cada uno; 50% histoclear + 50% EtOH, un lavado de 60 min; 75% EtOH + 25% EtOH, un lavado de 60 min; 100% histoclear, dos lavados de 60 min cada uno y se puede dejar en incubación toda la noche a 56°C. Una vez terminados los lavados se agrega parafina líquida y se deja en incubación a 60°C por 24 hrs. Es necesario hacer un cambio de parafina cada 12 hrs y volver a incubar a 60°C, durante tres días.

V.2.4 Cortes en microtomo y fijación de tejidos.

Una vez que los tejidos están fijados en la parafina sólida se hacen los cortes secuenciales del tejido en el microtomo que después se fijan en portaobjetos, las muestras quedan listas para ser teñidas y posteriormente analizadas en el microscopio óptico.

V.2.5 Microscopía para identificar patrones de expresión genética y análisis fenotípicos.

V.2.5.1 Estereoscopía.

Los tejidos frescos recolectados se colocan sobre un portaobjetos y se observan al estereoscopio Leica EZ4 D (Leica, Germany). En el caso de las muestras teñidas

con solución de GUS se extienden en una placa con agar o sobre un portaobjetos con ayuda de etanol al 70% y se visualizan. Esta herramienta nos da una visión general de los tejidos y cuando observamos tejidos que han sido teñidos con la solución de GUS, nos revela el patrón de tinción en ellos.

V.2.5.2 Microscopía confocal.

Los tejidos frescos recolectados se ponen sobre un portaobjetos con 1 a 3 gotas de una solución diluida de yoduro de propidio (0.01 mg/ml de $C_{27}H_{34}I_2N_4$), posteriormente se cubren con el cubreobjetos y se observa los patrones de fluorescencia en el microscopio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Germany). La GFP se excita a 488nm de un laser de argón y el yoduro de propidio a 514nm. La emisión de la GFP fue filtrada con un filtro BP 500-550 nm y la emisión del yoduro de propidio fue filtrada con un filtro LP 575 nm. Esta herramienta nos muestra las zonas en el tejido donde se detecta actividad de la GFP en las líneas marcadoras (TCS::GFP y DR5::GFP).

V.2.5.3 Microscopía electrónica.

Se recolectan muy cuidadosamente los tejidos frescos y se colocan sobre un soporte con una etiqueta adhesiva de carbono y después se observa la morfología general del tejido al microscopio Zeiss EVO40 (Carl Zeiss, Germany), usando un haz de 20kV con un detector SE1. La microscopia electrónica se usa para un análisis más detallado de la morfología de algunos tejidos, para la medición de replum, distancia de valva a valva y número de células en las cruces de transactivación, las fotos fueron tomadas con una magnificación de 215x.

V.2.5.4 Microscopía óptica.

Los tejidos cortados y fijados de los frutos tratados con BAP se observan al microscopio óptico, las fotos fueron tomadas con una cámara Zeiss AxioCam MRc instalada en el microscopio Zeiss Observer.Z1

V.2.6 Prueba estadística de Student

Para analizar las diferencias significativas en el tamaño del replum en las cruzas de transactivación (pAL5 x CKX3, pAGL5 x IPT7, pAGL8 x CKX3, pAGL8 x IPT7, pBP x CKX3 y pBP x IPT7), se tomaron 10 frutos al azar y se midieron, mediante microscopia electrónica, la anchura del replum y la distancia de valva a valva posteriormente se realizó un prueba estadística de T de Student con un intervalo de confianza del 95% y se determinó la significancia de la prueba.

V.3 Diseño experimental

Para analizar los patrones de respuesta a citocininas en una planta silvestre del ecotipo COL de *Arabidopsis* se utilizó la línea homocigota del marcador de citocininas unido a la proteína verde fluorescente (TCS-GFP). Posteriormente se recolectó tejido de las plantas, en especial frutos y se observó en el microscopio confocal, donde se determinó la fluorescencia indicadora de la expresión.

Para ver si las citocininas están involucradas en el desarrollo del fruto se realizaron las siguientes cruzas de transactivación: pAGL8 (*FUL*) x op:*IPT7*; pAGL5 (*SHP2*) x op:*CKX3*; pBP>>GUS x op:*IPT7*; pBP>>GUS x op:*CKX3*. Se analizó el fenotipo y los patrones de expresión de los promotores mediante las cruzas con GUS. Posteriormente, mediante una prueba estadística T de Student, con un número de 10 frutos por muestra, se determinó la significancia para el tamaño de replum, distancia de valva a valva y número de células en las diferentes cruzas de transactivación.

Para analizar la respuesta a citocininas de los genes *WIP2*, *WIP5* y *WIP3*, se asperjaron durante 4 semanas plantas Knockout para estos genes, con una solución 100 μ M de bencílamínopurina (BAP), y se hizo un análisis detallado de la morfología de los frutos mediante estereoscopia, microscopía electrónica y microscopía óptica, esta última se utilizó para el análisis de los cortes transversales de frutos tratados con BAP.

Para analizar la función de los genes *WIP2* y *WIP5* se hizo la siguiente cruce: 35S *WIP5* x 35S *WIP2*. Se observó el fenotipo, en la generación F1, para comparar las líneas de sobreexpresión de los genes *WIP*. La Figura 5 muestra un esquema general de la metodología empleada en este trabajo.

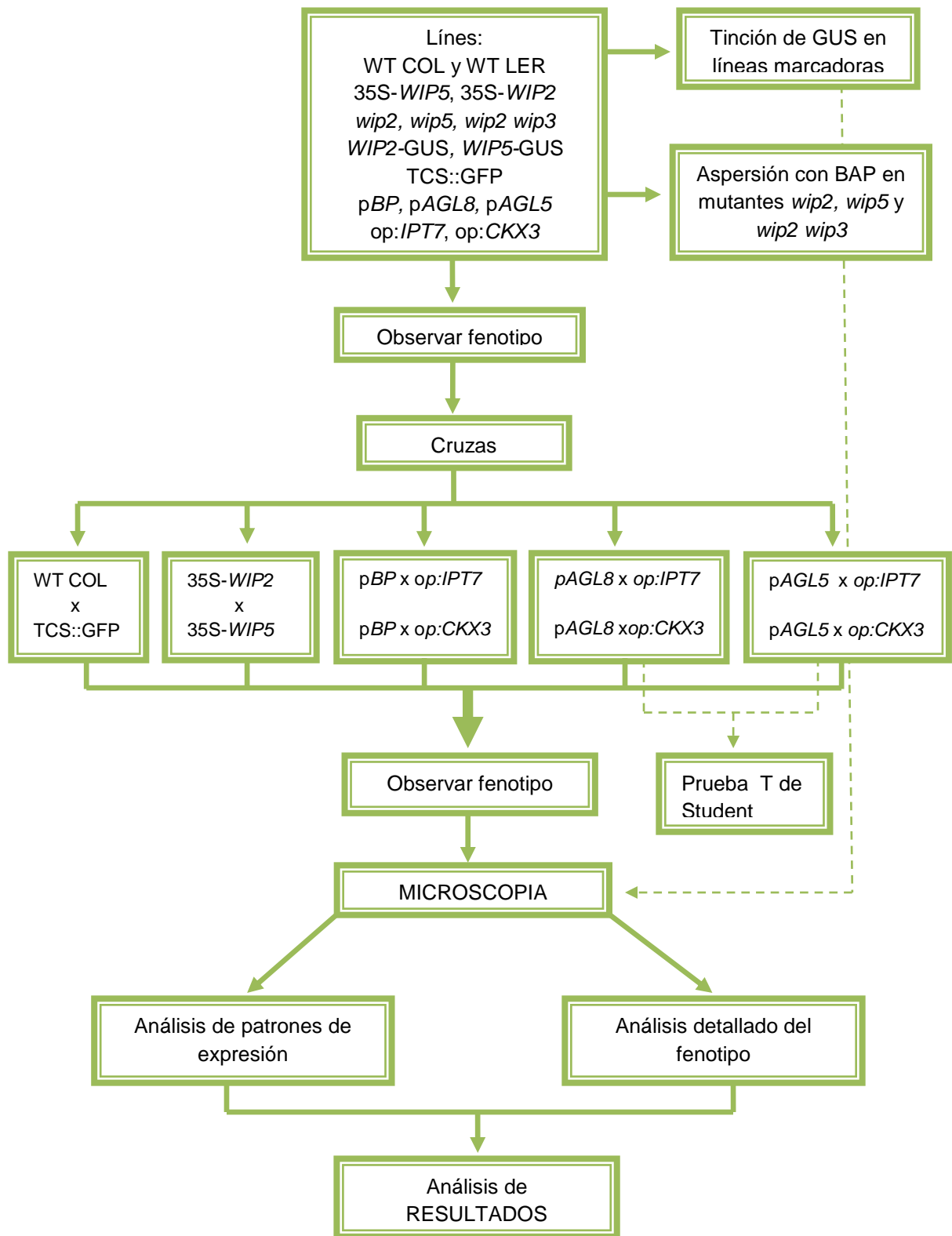


Figura 5. Esquema general de la metodología.

VI. RESULTADOS

VI.1 Expresión del marcador de citocininas TCS::GFP en el fruto de Arabidopsis.

Para determinar el patrón de expresión del marcador de citocininas se utilizó la línea marcadora TCS::GFP proporcionada por Bruno Müller, la cual contiene seis repetidos directos de la siguiente secuencia: **AAAATCTACAAATCTTTTTGGATTTTGTGGATTTTCTAGC** (los pentámeros clave del tipo B de los ARR_s están resaltados en negritas). Esta secuencia fue clonada bajo el control de un promotor mínimo 35S de virus del mosaico de la coliflor, con una caja TATA seguido por la región codificante de la proteína verde fluorescente (Muller y Sheen, 2008). Se analizaron mediante microscopia confocal frutos de la línea TCS::GFP en diferentes etapas de desarrollo, del estadio 8 al 17, y se determinó el patrón de fluorescencia en ellos (Figura 6).

Mediante el análisis de los frutos de la línea TCS::GFP se determinó que las citocininas se encuentran principalmente en el tejido medio del fruto o septum en estadios muy jóvenes (8-12), los cuales se caracterizan por la elongación del gineceo y comienzo de la diferenciación de tejidos. Posteriormente, en estadios de desarrollo más avanzados (13-17), donde ya ha ocurrido la autopolinización, la diferenciación de tejidos continua y el desarrollo del gineceo comienza a parecerse más a la estructura de un fruto maduro, las citocininas se localizan en la zona de dehiscencia del fruto o margen de las valvas.

Esto sugiere que las citocininas juegan un papel muy importante en el desarrollo del tejido medio del fruto en estadios jóvenes de desarrollo, anteriores a la antesis, permitiendo que se dé la división, elongación y diferenciación celular en cada tejido; y conforme las etapas de desarrollo avanzan y los tejidos comienzan a diferenciarse las citocininas se sitúan específicamente en el margen de las valvas, donde posiblemente estén favoreciendo la formación de la hendidura entre el replum y las valvas.

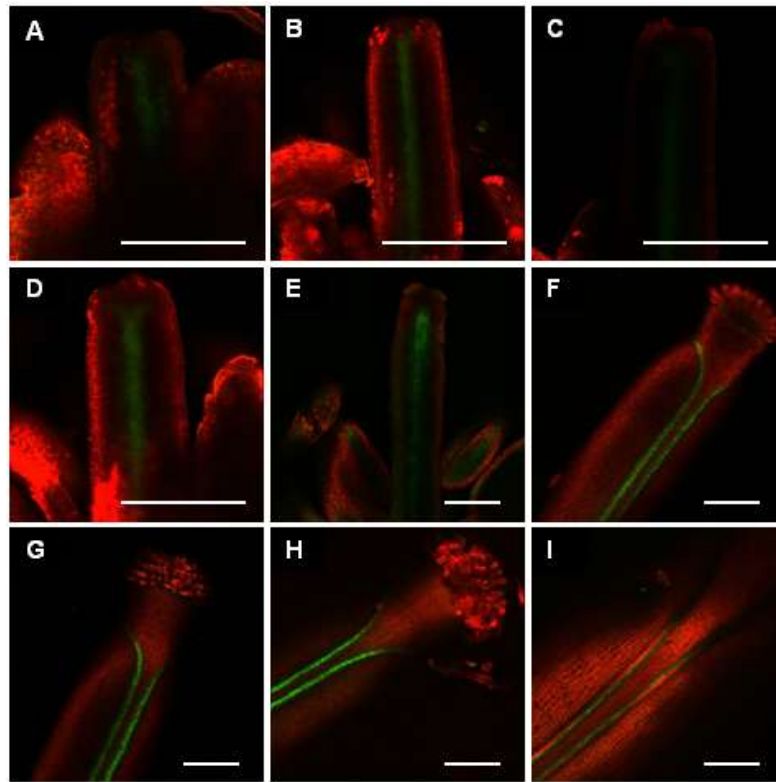


Figura 6. Expresión del marcador de citocininas TCS::GFP en diferentes estadios de desarrollo del fruto de *Arabidopsis*. (A) – (E) gineceo de capullos florales, estadios 8, 9, 10, 11 y 12; se aprecia la actividad de la GFP en el tejido medio del gineceo. (F) gineceo de flor abierta auto polinizada, estadio 13; a partir de este estadio la señal de la GFP se sitúa en el margen de las valvas. (G) gineceo de flor abierta donde ha ocurrido la fertilización, estadio 14. (H) gineceo elongado, estadio 15. (I) fruto verde maduro, estadio 17. Barra 200 μm .

VI.2 Expresión en el fruto del marcador de auxinas DR5::GFP

Una vez analizado el patrón de expresión de las citocininas se procedió a determinar el patrón de expresión de las auxinas mediante la línea marcadora DR5::GFP.

El análisis se realizó en gineceos jóvenes del estadio 9 para las líneas DR5::GFP y TCS::GFP, encontrándose que las auxinas se sitúan alrededor del fruto, mientras que las citocininas están en la parte media. Por otro lado, en frutos maduros, la

actividad de la GFP reveló expresión de auxinas en el replum, un poco en las valvas y una señal muy tenue en el margen de las valvas; mientras que las citocininas mostraron sólo expresión en el margen de las valvas (Figura 7).

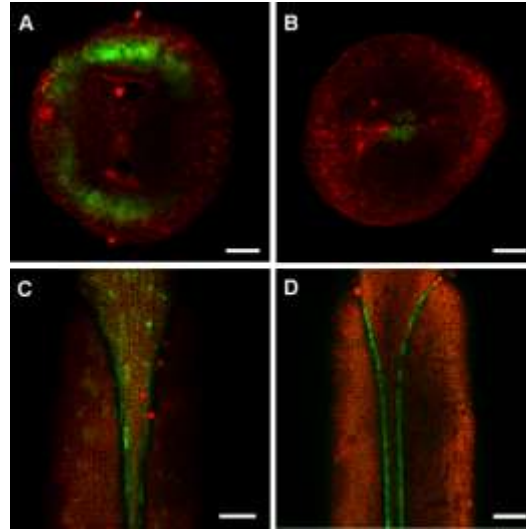


Figura 7. Comparación entre el patrón de expresión del marcador de auxinas DR5::GFP y el marcado de citocininas TCS::GFP. (A) Vista desde arriba de la actividad de la GFP en un gineceo joven del estadio 9 de la línea DR5::GFP y en (B) de la línea TCS::GFP. (C) Actividad de la GFP en el replum de un fruto maduro de la línea DR5::GFP y en (D) actividad de la GFP en el margen de las valvas de un fruto maduro de la línea TCS::GFP.

Las auxinas y las citocininas regulan una diversidad de procesos en las plantas, con frecuencia actuando en conjunto para producir una respuesta integrada que tiene su efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta (Zhang y col; 2011). Aun no se conoce como se integran estas señales, sin embargo los resultados encontrados en este trabajo muestran un patrón diferencial de expresión entre estas dos hormonas y sugieren la existencia de una relación antagónica entre ellas, al menos durante el desarrollo del fruto.

VI. 3 Sistema de Transactivación.

Para probar si las citocininas están involucradas en alguna fase del desarrollo del

fruto manipulamos los niveles de citocininas mediante cruza de transactivación. En ellas expresamos el gen de biosíntesis de citocininas, *ISOPENTENIL TRANSFERASA* (*At IPT7*), y el gen de degradación de citocininas, *CITOCININA OXIDASA3* (*At CKX3*). Para monitorear los efectos de las citocininas en las diferentes partes del fruto, expresamos estos genes usando los promotores de los genes *BREVIPEDICELLUS* (*pBP*), el cual se expresa en el replum; *AGAMOUS-LIKE8/FRUITFUL* (*FUL*), indicado como *pAGL8*, expresado específicamente en las valvas y *AGAMOUS-LIKE5/SHATTERPROOF2* (*SHP2*) indicado como *pAGL5*, que se expresa en el margen de las valvas. Monitoreamos tanto sus efectos en el desarrollo como los patrones de expresión, mediante cruza con el gen reportero *GUS* (Figura 8).

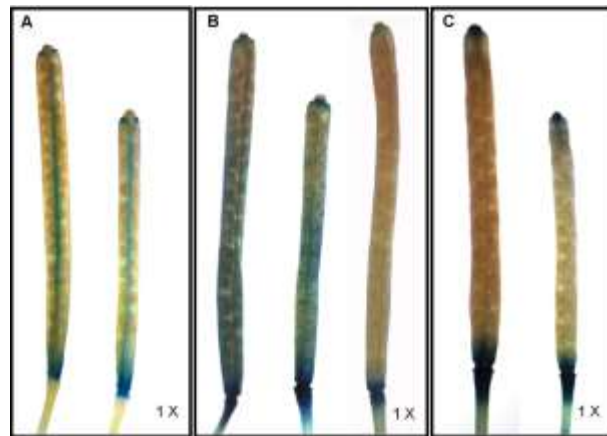


Figura 8. Patrones de expresión de los promotores *SHP2* (*pAGL5*), *FUL* (*pAGL8*) y *pBP* en frutos jóvenes y maduros. (A) frutos de la cruz *pAGL5* x *op:GUS* que muestran la actividad de *GUS* en el margen de las valvas. (B) actividad de *GUS* en las valvas y parte apical y basal del fruto en la cruz *pAGL8* x *op:GUS*. (C) actividad de *GUS* en parte apical y basal del fruto y muy tenue en el replum en la cruz *pBP* x *op:GUS*.

La morfología general de las plantas obtenidas mediante las cruza de transactivación se puede observar en la Figura 9. En ella se aprecia que las líneas donde se promueve la síntesis de citocininas (*pAGL8* x *op:IPT7* y *op:IPT7* x *pAGL5*) presentan un tallo ensanchado, hojas más pequeñas y aserradas y el fruto es más

pequeño, abultado y en algunos casos la parte apical presenta una curvatura; mientras que las plantas en donde hay degradación de citocininas tienen un fenotipo silvestre.

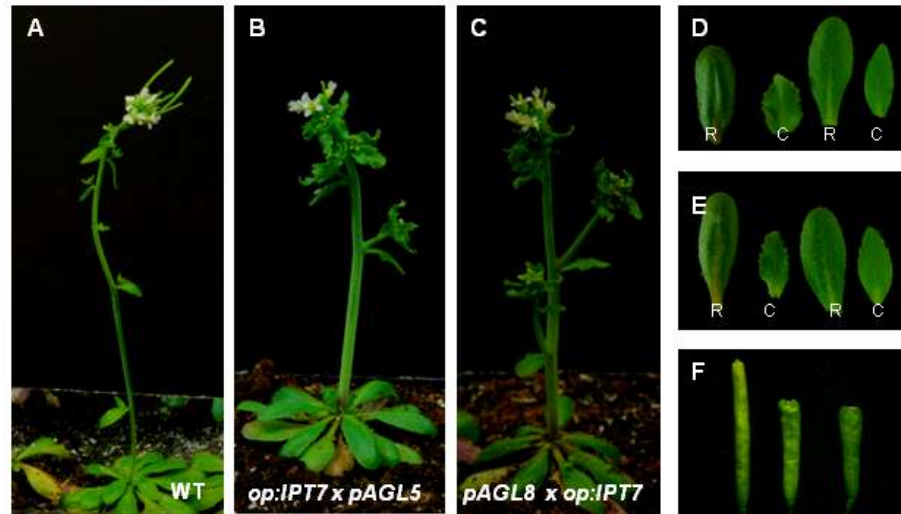


Figura 9. Fenotipo en líneas de transactivación. Fenotipo silvestre (A) en comparación con el fenotipo en las líneas de síntesis de citocininas con los promotores pAGL5 (B) y pAGL8 (C). En (D) y (E) se muestran las diferencias morfológicas en hojas de la roseta y caulinas, denotadas por R y C. Del lado izquierdo se muestran las hojas de las líneas *op:IPT7 x pAGL5* en D y *pAGL8 x op:IPT7* en E y del lado derecho las hojas de la planta silvestre. En (F) se muestran las diferencias morfológicas en el fruto, de izquierda a derecha: fruto silvestre, fruto *op:IPT7 x pAGL5* y fruto *pAGL8 x op:IPT7*.

La función de las citocininas como reguladoras de la morfología y complejidad de la hoja y su relación con el incremento en el grosor del tallo han sido anteriormente descritas. Se dice que las citocininas promueven una actividad morfogénica en el margen de la hoja, por lo cual se forman las aserraciones, y que las diferencias en el tamaño del tallo pueden deberse al efecto que tienen las citocininas en el incremento de la actividad del cambium (Shani y col, 2010; Bartrina y col, 2011). Sin embargo el papel que juegan las citocininas en el desarrollo del fruto no ha sido explorado, por lo cual decidimos hacer un análisis detallado de los frutos de estas líneas de transactivación, en los que claramente se observa un fenotipo.

Las diferencias morfológicas en los frutos se analizaron detalladamente mediante microscopia electrónica encontrando que las cruces en donde se promueve la síntesis de citocininas pAgl8 x opIPT7 (AGL8pro:LhG4 >> OP:IPT7) y opIPT7 x pAGL5 (OP:IPT7 >> AGL5pro:LhG4) presentan un ensanchamiento del replum, mientras que las cruces donde hay degradación de citocininas pAGL8 x op:CKX3 (AGL8pro:LhG4 >> OP:CKX3) y opCKX3 x pAGL5 (OP:CKX3 >> AGL5pro:LhG4) presentan un replum más pequeño en comparación con la planta silvestre del ecotipo Landsberg *erecta* (Figura 10).

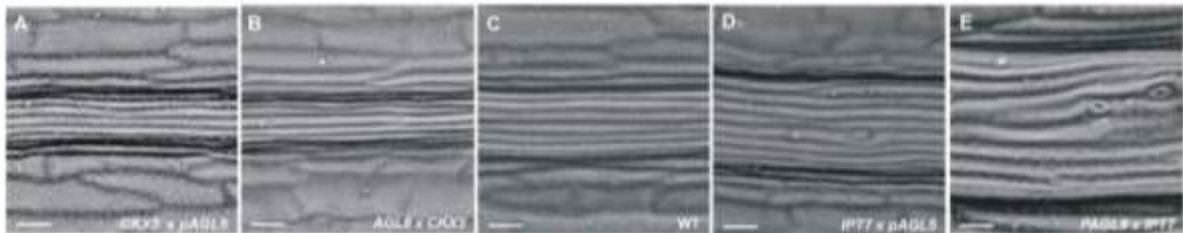


Figura 10. Microscopia electrónica del replum en líneas de transactivación y planta silvestre. En (A) y (B) líneas donde ocurre degradación de citocininas, en A la degradación ocurre en las valvas y en B ocurre en el margen de las valvas; (C) tamaño del replum en la planta silvestre WT LER. (D) y (E) líneas donde se promueve la síntesis de citocininas en D la síntesis ocurre en las valvas y en E ocurre en el margen de las valvas.

Para determinar la frecuencia con que el patrón en la medida del replum se repetía se midieron 10 frutos de la planta silvestre y de cada cruce. Se utilizaron los siguientes criterios de medición: la anchura del replum, la distancia de valva a valva y el número de células en el replum. Posteriormente mediante una prueba estadística de T se determinó que la diferencia en tamaño del replum era significativa para las 4 cruces de síntesis y degradación de citocininas en valva y margen de las valvas, no siendo significativa cuando la síntesis de citocininas ocurría en el replum, con respecto a la planta silvestre (Figura 11).

Todos estos resultados muestran que las citocininas son capaces de influenciar el crecimiento del replum, debido quizá a la participación que tienen estas hormonas

en el control del ciclo celular. Otro fenómeno interesante que encontramos en la línea pAGL8 x op:IPT7 fue la formación de estomas en el replum. A lo largo del fruto los estomas aparecen en las valvas y en el estilo, pero no en el replum, lo que sugiere que las citocininas pueden estar participando en cambiar la identidad de las células del replum promoviendo una identidad celular de estilo.

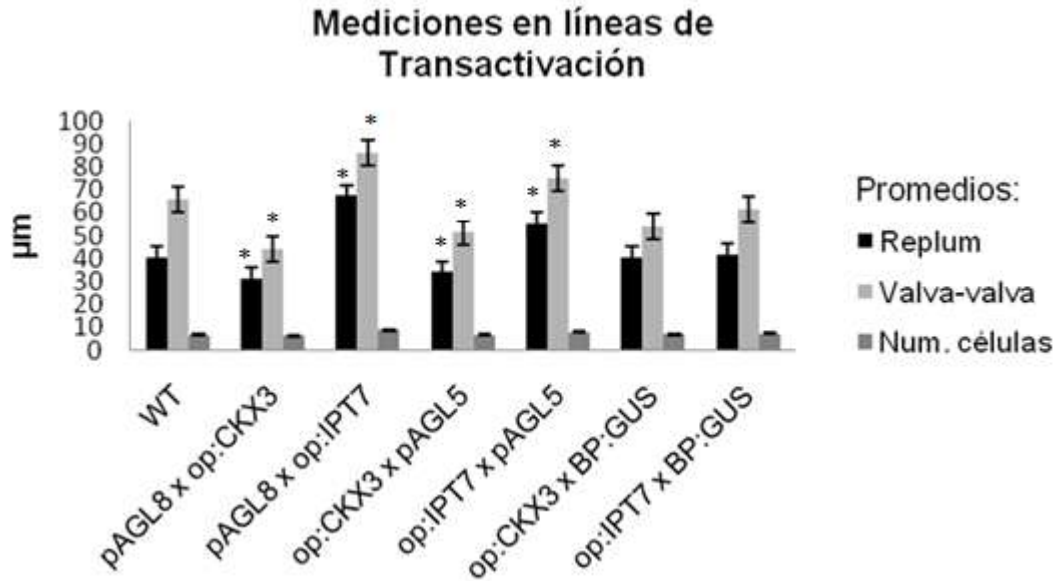


Figura 11. Gráfico que muestra las diferencias en tamaño de replum, distancia de valva a valva y número de células en las diferentes cruces de transactivación. Los asteriscos denotan las diferencias obtenidas mediante la prueba de T para las diferentes cruces de síntesis y degradación de citocininas en valva, margen de las valvas y replum, en comparación con la planta silvestre.

VI.4 Tratamientos con citocininas en plantas silvestres y mutantes de genes *WIP2* y *WIP5*.

Para analizar el efecto que las citocininas tienen en la morfología del fruto aplicamos mediante aspersion una solución 100µM de N⁶-Bencilaminopurina (BAP) durante 4 semanas diariamente por la mañana en plantas silvestres y en las mutantes de *wip2*, *wip5* y *wip 2 wip 3*. Observamos los cambios morfológicos a lo largo del tratamiento en toda la planta y con especial atención en el fruto. Tanto las

plantas silvestres como las mutantes mostraron una alta sensibilidad al tratamiento con citocininas, desarrollando la proliferación de tejido a partir del replum y una reducción en el tamaño de los frutos con respecto al control (Figura 12). Una observación interesante fue que los frutos mutantes mostraron ser más responsivos al tratamiento con citocininas que los frutos silvestres.

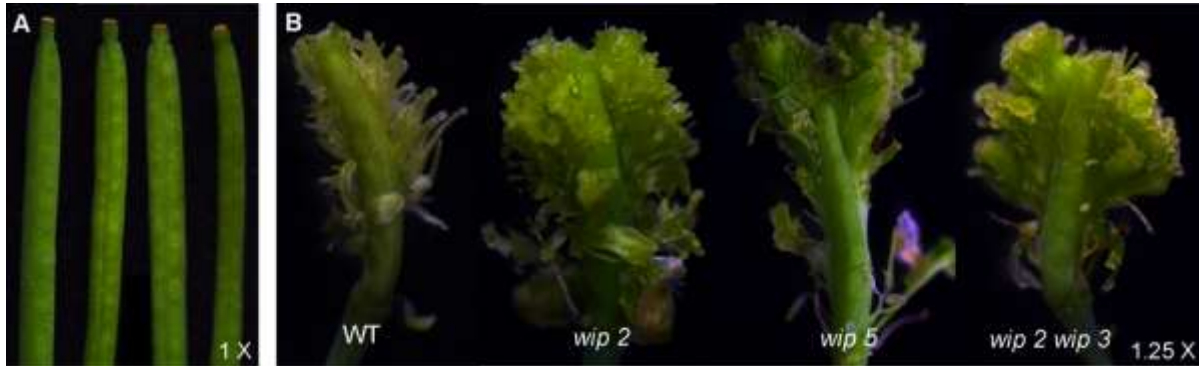


Figura 12. Respuesta en los frutos silvestres y mutantes (*wip2*, *wip5* y *wip2 wip3*) al tratamiento con BAP. (A) Frutos de la planta control de izquierda a derecha fruto silvestre, *wip2*, *wip5* y doble mutante *wip2 wip3*. (B) Frutos silvestres y mutantes *wip2*, *wip5* y *wip2 wip3*; después del tratamiento con BAP. Puede notarse que el tejido ectópico que comienza a crecer a partir del replum del fruto.

Finalmente se hizo un análisis detallado mediante microscopía en los frutos silvestres. Los frutos tratados con BAP respondieron de manera notoria a la aplicación exógena de citocininas. Después del tratamiento los frutos empezaron a desarrollar proliferación de tejido a partir del replum, diferenciándose en la punta a tejido estilar y de estigma; las valvas no presentaron este tipo de afectación, los óvulos cambiaron de forma y en el caso de la flor las anteras no se desarrollaron adecuadamente, siendo más pequeñas que en el control y los pétalos eran un poco más alargados mientras que el pistilo siguió el mismo comportamiento que el fruto maduro (Figura 13).

Para verificar lo que estaba ocurriendo en el tejido medio de los frutos tratados con BAP, se fijaron algunos de estos frutos, se hicieron cortes transversales con

micrótopo y se tiñeron con la tinción azul de alcian, posteriormente se analizaron los cortes en el microscopio óptico.

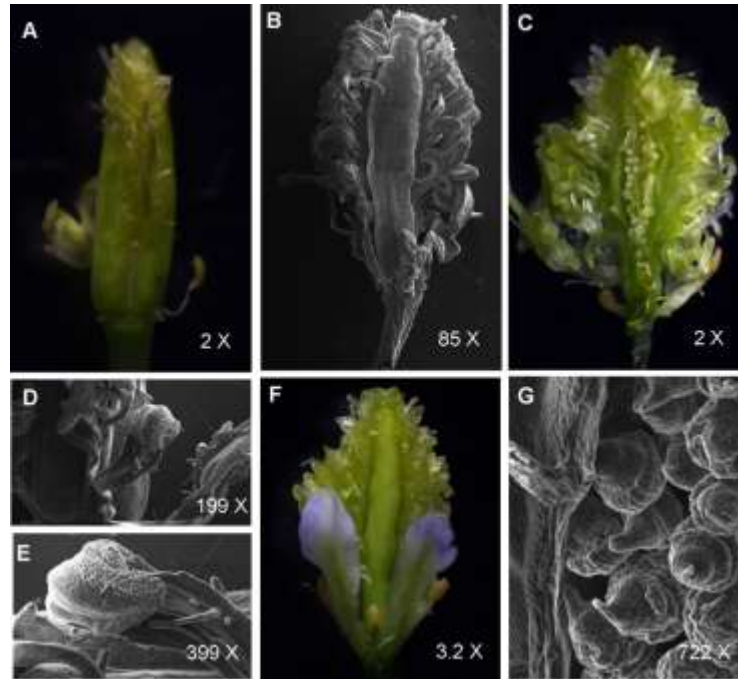


Figura 13. Morfología de fruto silvestre tratado con BAP. (A) vista de frente del fruto silvestre después de 4 semanas de tratamiento con BAP, puede apreciarse la proliferación de tejido creciendo a partir del replum. (B) Microscopía electrónica de uno de los lados del fruto, donde se aprecia que la valva no está muy afectada. (C) Corte longitudinal del fruto donde pueden verse los óvulos. (D) Microscopía electrónica que muestra un acercamiento en el fruto y donde puede verse claramente que el tejido sale directamente del replum. (E) Acercamiento de D donde se aprecia que el tejido que sale del replum se diferencia a estigma en la punta (F) Cambios morfológicos sufridos en la flor después del tratamiento, las anteras son más pequeñas y el pistilo sigue el mismo comportamiento que el fruto. (G) Microscopía electrónica de los óvulos.

Observamos una vez más que el tejido que comienza a crecer descontroladamente en estos frutos proviene del replum. Otra observación interesante fue que las puntas de este nuevo tejido tiñeron de color rojo, color del que normalmente tiñe el estigma que confirma la idea de que este nuevo tejido comienza a diferenciarse en la punta para adquirir la identidad de estilo y estigma. Otro fenómeno relevante fue

el hecho de que el tracto de transmisión no se unió al interior del fruto, lo que normalmente ocurre en frutos control (Figura 14).

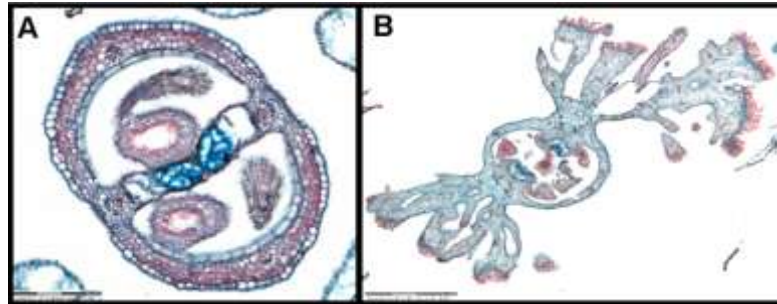


Figura 14. Cortes transversales en frutos silvestres sin y con tratamiento de BAP 100 μ M. (A) Corte transversal de un fruto silvestre, se aprecia el tracto de transmisión teñido de azul y los óvulos y el tejido restante teñido de rojo. (B) Corte transversal de un fruto silvestre tratado con BAP, puede observarse que el tracto de transmisión no se une, que el tejido carpeloide sale del replum y que en las puntas este tejido tiene identidad de estilo. La barra en A indica 150 μ m y en B 300 μ m.

Estos resultados demuestran el papel de las citocininas como factores promotores de la proliferación y más tarde de la diferenciación celular, características con las que fueron primeramente identificadas (D'Aloia y col, 2011). Recientemente se ha descrito también la actividad meristemática que tiene el replum en el fruto, característica que permite el desarrollo del tejido medio, el estilo y el estigma. (Balanzá y col, 2006; Girin y col, 2009). Por lo cual estos resultados sugieren que las citocininas podrían estar estimulando esta parte meristemática del fruto promoviendo el crecimiento y la diferenciación celular en dicho tejido, donde además parecen jugar un papel importante en dar la identidad de estilo a estas células.

Por otro lado, para determinar la respuesta del gen *WIP2* al tratamiento con citocininas se realizó un experimento en plántulas de la línea *WIP2*-GUS en placas con medio MS, con una concentración 100 μ M de kinetina (K) ó N6-bencilaminopurina (BAP), como citocininas. El tratamiento de inducción se realizó a

las 4, 24 y 38 hrs, después de este tiempo se procedió a teñir las plántulas con la tinción de GUS y observar en estereoscopio los patrones de tinción. Mediante este experimento se determinó que a las 4hrs de inducción con K el gen *WIP2* se expresa en el meristemo y conforme el tiempo de inducción aumenta hasta llegar a las 38hrs el patrón de tinción se vuelve más intenso en el meristemo y se difunde a nervaduras de las hojas y los cotiledones. Por otro lado, en el caso de la inducción con BAP, la expresión del gen aumenta un poco a las 24hrs situándose en el meristemo y nervadura de los cotiledones, sin embargo a las 38hrs de inducción decrece significativamente observándose una muy tenue tinción en el meristemo y en las nervaduras de las hojas (Figura 15).

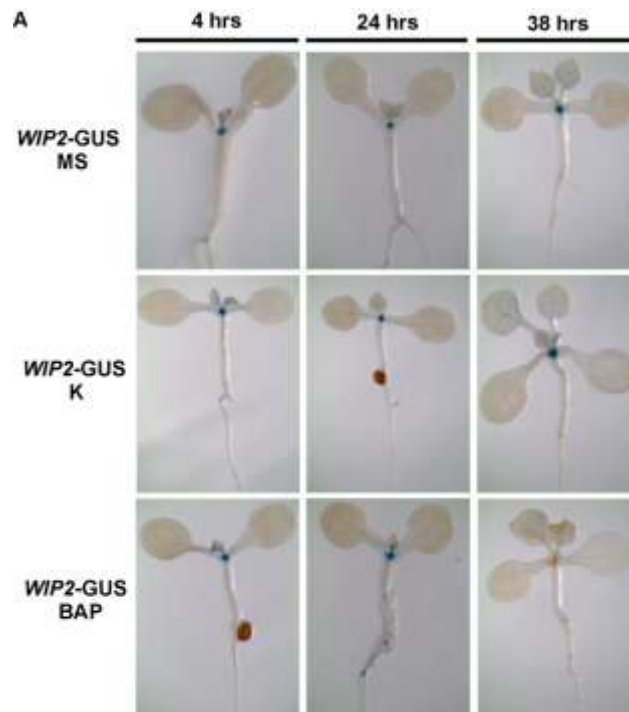


Figura 15. Inducción con K y BAP en plántulas de la línea *WIP2-GUS*. En la figura se muestra la inducción a las 4, 24 y 38 hrs, en el control las plantas sólo crecieron en medio MS y la actividad de GUS permanece constante a lo largo del tiempo en el meristemo y a partir de las 24 hrs la tinción se sitúa en las nervaduras de las hojas e hipocotílo. Por otro lado, las plantas tratadas con K muestran un aumento en la actividad de GUS a las 38 hrs en el meristemo, mientras que las plantas tratadas con BAP muestran un aumento en la intensidad de la señal de GUS a las 24 hrs y decrece significativamente a las 38 hrs de inducción.

Esto sugiere que el gen *WIP2* es capaz de responder al tratamiento con citocininas y que lo hace de manera diferencial dependiendo el tipo de citocinina que se trate.

VI.5 Análisis del fenotipo y de los patrones de expresión de genes *WIP*.

El patrón de la expresión de los genes *WIP2* y *WIP5* se hizo en plántulas mediante la tinción de GUS. Encontrándose que el gen *WIP2* se localiza en el meristemo y que el gen *WIP5* se encuentra en los cotiledones en estadios tempranos de desarrollo (Figura 16). Cabe mencionar que la tinción se realizó nuevamente en flores, hojas y frutos para estas líneas, donde no encontramos actividad significativa del promotor de dichos genes. También se observaron los fenotipos para las líneas de sobreexpresión de los genes *WIP2*, *WIP5* y la doble sobreexpresante *WIP2 WIP5* en la generación F1, obtenida mediante la cruce de las dos líneas anteriores. La morfología en las hojas tanto para las líneas de sobreexpresión sencillas como para la doble sobreexpresante muestran características similares; las hojas son aserradas y se curvan más que las hojas de la planta silvestre, (Figura 17).

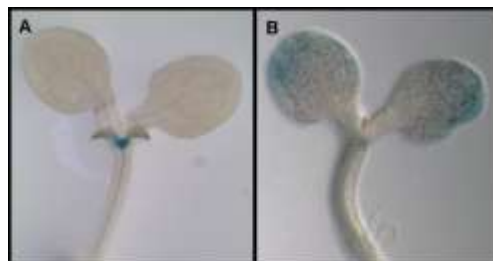


Figura 16. Patrón de expresión de los genes *WIP2* y *WIP5*. (A) actividad de GUS en el meristemo en una plántula de la línea *WIP2*-GUS. (B) actividad de GUS en los cotiledones en una plántula de la línea *WIP5*-GUS.

Estos resultados sugieren que, aunque el fenotipo en las líneas de sobreexpresión para estos genes es similar en hojas, no siendo así para fruto y aunque dentro de la familia de genes *WIP* el *WIP5* es el más y parecido al *WIP2*, la actividad de estos genes se lleva a cabo en distintas partes de la planta y posiblemente regulen

procesos de desarrollo que repercuten en fenotipos similares, aunque no necesariamente los mismos.

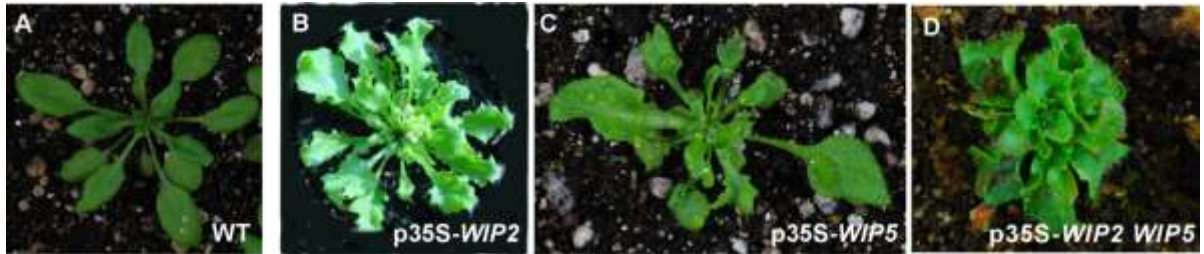


Figura 17. Fenotipo en hojas de líneas de sobreexpresión de los genes *WIP2* y *WIP5*. (A) Morfología de las hojas en una planta silvestre del ecotipo Columbia. (B) Fenotipo en línea de sobreexpresión p35S-*WIP2*, se aprecian las hojas de la roseta muy aserradas. (C) fenotipo en línea de sobreexpresión p35S-*WIP5*, las hojas son ligeramente aserradas y curvadas. (D) Fenotipo en la cruce de p35S-*WIP2* *WIP5* en la generación F1, las hojas son aserradas, curvadas y más pequeñas.

VII. DISCUSION.

Actualmente falta mucho por conocer acerca del papel que juegan las diferentes hormonas durante el desarrollo del fruto de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Una de las hormonas más descritas son las auxinas, pero aun no está bien entendido como se establecen los gradientes de auxinas a lo largo del gineceo (Alabadí y col, 2009); también ha comenzado a estudiarse el papel de las giberelinas (Dorcey y col, 2009; Arnaud y col, 2010). Sin embargo, estas no son las únicas moléculas que regulan estos procesos de desarrollo y en este trabajo se muestra el rol que tienen las citocininas durante el desarrollo del fruto.

Además de lo que se conoce del papel de las citocininas en los meristemos, y de su amplio uso en cultivo de tejidos, recientemente ha comenzado a ser elucidado el papel que juegan las citocininas durante otros procesos del desarrollo y estructuras de la planta. En particular, se ha encontrado que también participan en la transición a la floración, desarrollo de hojas, y semillas (Shani y col., 2010; Bartrina y col, 2011; D'Aloia, 2011), pero la función que ejercen estas hormonas durante el desarrollo del fruto no ha sido descrita.

En este trabajo estudiamos la localización y efecto de las citocininas en las diferentes etapas de desarrollo del fruto, encontrando que están principalmente ubicadas en tejido medio y margen de las valvas, donde pudieran estar interviniendo en el desarrollo y diferenciación de los diferentes tejidos de la zona media del fruto (tracto de transmisión, septum y replum). Por otro lado Sorefan y colaboradores en 2009; encontraron que la formación de un mínimo de auxinas era necesario para la especificación del margen de las valvas en la capa de separación donde ocurre la apertura del fruto de *Arabidopsis*; zona donde se encontró una remarcada expresión de citocininas. Esto sugiere una interacción antagónica entre estas hormonas. Es posible que esta interacción sea necesaria para la especificación de los tejidos en los que se detecta; pues coincide con lo

observado en otros tejidos en los cuales estas dos hormonas juegan papeles antagónicos.

Se sabe que las citocininas intervienen en procesos de elongación, diferenciación y división celular (Kiba y col., 2002; D'Aloia y col, 2011), actividad que se corroboró mediante las cruces de transactivación donde se muestra que la biosíntesis de citocininas en las plantas promueve el ensanchamiento del replum en el fruto, contrario a las plantas donde se promueve una degradación de la hormona. Estos resultados en conjunto con los obtenidos para los experimentos de aplicación exógena de citocininas en las inflorescencias de la planta revelan el papel que tienen estas hormonas en la estimulación de la parte meristemática del fruto o replum. Otra observación interesante fue el efecto que producen las citocininas aplicadas exógenamente en el tejido celular que crece a partir del replum, donde parecen tener una participación en la diferenciación de dichas células a tejido estilar y estigmático.

Por otra parte las plantas mutantes de genes *WIP* mostraron ser responsivas al tratamiento con citocininas; tanto en los experimentos en placa, donde hubo una respuesta diferencial debida al tipo de citocinina; como en los experimentos de aspersión, donde se indujo un efecto morfológico más severo en los frutos mutantes comparado con el fruto silvestre, lo que sugiere que la ausencia de estos genes potencia el efecto de las citocininas. Este efecto puede deberse, al menos para el caso del gen *WIP2*, a la interacción que tiene la proteína *WIP2* con los elementos señaladores de la vía de citocininas, los reguladores de respuesta del tipo A: *ARR-4* y *ARR-16* (Dortay y col, 2007), interacción que podría estar participando en la regulación de la respuesta a la señal provocada por la presencia de las citocininas.

Por otro lado, el fenotipo de aserramiento en las hojas en las líneas de sobreexpresión de los genes *WIP*, se relaciona con el efecto morfogenético que ejercen las citocininas en el margen de la hoja, esto sugiere un papel similar entre

estos genes. Sin embargo el patrón de expresión de estos genes no es similar, por lo cual quizá no estén interactuando o regulando los mismos procesos de desarrollo. También es necesario un análisis más detallado, tanto en las líneas de sobreexpresión como en las mutantes para entender la función de estos genes y establecer o descartar una participación directa con la vía de señalización de las citocininas.

Los resultados obtenidos nos brindan una idea de cómo pudieran estar actuando estas hormonas para generar una respuesta integrada durante el desarrollo del fruto y de la planta en general. A su vez este trabajo sienta las bases para estudios posteriores sobre desarrollo de fruto, interacción con otras hormonas o vías de co-regulación genética entre las mismas.

VIII. CONCLUSIONES

Las citocininas se encuentran en el tejido medio del fruto en estadios tempranos de desarrollo y en margen de las valvas en estadios más tardíos.

En el fruto de *Arabidopsis* las citocininas estimulan la parte meristemática en el replum promoviendo la proliferación celular y más tarde la diferenciación del estilo y el estigma.

Los genes *WIP* son responsivos a los tratamientos con citocininas.

La similitud en el fenotipo para las líneas de sobreexpresión de los genes *WIP2* y *WIP5* sugiere un papel similar entre estos genes en la vía de señalización de citocininas aunque en diferentes partes de la planta.

Este trabajo sienta las bases en el entendimiento del papel que tienen las citocininas durante el desarrollo del fruto.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Albadí, D., Blázquez, A. M., Carbonell, J., Ferrándiz, C. y Pérez-Amador, A. M. 2009. Instructive roles for hormones in plant development. *The International Journal of Developmental Biology*. Vol 53: 1597-1608.

Alvarez-Buylla. E. R., Benitez, M., Corvera, P. A., Chaos, C. A., de Folter, S., Gamboa de B. A., Garay, A. A., García, P. B., Jaimes, M. F., Pérez, R. R. V., Piñeyro, N. A. y Sanchez, C. E. 2010. <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0127>.

Appelhagen, I., Huet, G., Lu, GH., Strompen, G., Weisshaar, B. y Sagasser, M. 2010. Weird fingers: Functional analysis of WIP domain proteins. *Federation of European Biochemical Societies letters*. Vol. 584: 3116-3122.

Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, A. T., Lawrenson, T., Sablowski, R. y Ostergaard, L. 2010. Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*. Vol 24: 2127-2132.

Balanzá, V., Navarrete, M., Trigueros, M. y Ferrándiz, C. 2006. Patterning the female side of *Arabidopsis*: the importance of hormones. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 57(13):3457-3459.

Bartrina, I., Otto, E., Strand, M., Werner, T. y Schmölling, T. 2011. Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and, Thus, Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. Vol.23 (1):69-80.

Bastian, R., Dawe, A., Meier, S., Ludidi, N., Bajic, B. V. y Gehring, C. 2010. Gibberellic acid and cGMP-dependent transcriptional regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*. Vol. 5: 224-232.

Bishopp, A., Mähönen A. P. y Helariutta, Y. 2006. Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development*. Vol. 133: 1857-1869.

Capron A., Chatfield S., Provart N. y Berleth T. 2009. Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *American Society of Plant Biologist: The Arabidopsis Book*. American Society of Plant biologist, Rockville MD: 1-28.

- Crawford**, B. C. W., Ditta, G. y Yanofsky M. F. **2007**. *Current Biology*. Vol. 17: 1101-1108.
- D'Aloia**, M., Bonhomme, D., Bouche, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., Coupland, G. y Périlleux, C. **2011**. Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the *FT* paralogue *TSF*. *The plant journal*. Vol 65: 972-979.
- Davies**, J. P. **2004**. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal transduction, Action*. 3a. ed; Kluwer Academic publishers: 4-13.
- Divi**, U. K., Rahman, T. y Krishna, P. **2010**. Brassinosteroids-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* show interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *Biomed Central Plant Biology*. Vol. 19: 1-14.
- Dorcey**, E., Urbez, C., Blázquez, A. M., Carbonell, J. y Pérez-Amador, A. M. **2009**. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. Vol 58: 318-332.
- Dortay**, H., Gruhn, N., Pfeifer, A., Schwerdtner, M., Schmölling, T. y Heyl, A. **2007**. Toward and Interaction Map of Two-Component Signaling Pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteome Research*. Vol. 7: 3649-3660.
- Girin** T., Sorefan K. y Ostergaard L. **2009**. Meristematic sculpting in fruit development. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 60: 1493-1502.
- Griffiths**, J. F. A., Gelbart, M. W., Miller, H. J. y Lewontin, C. R. **2000**. *Génética Moderna*. McGraw-Hill, Interamericana: 104-108.
- Heh** y Bülow. **2008**. Internet Resources for Gene Expression Analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Current Genomics*. Vol 9: 375-380.
- Hirokazu**, T. **2009**. <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0072>
- Islan**, M. **2004**. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier. Vol.4. 435-439.
- Jaillais**, Y. y Chory, J. **2010**. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & Molecular biology* Vol. 17: 642-645.
- Joosen**, R. V. L., Ligterink, W. Hilhorst, H. W. M. y Keurentjes, J. J. B. **2009**. Advances in Genetical Genomics of Plants. *Current Genomics*. Vol. 10: 540-549.

- Kuromori**, T., Takahashi, S., Kondou, Y., Shinozaki, K., y Matsui, M. **2009**. Phenome Analysis in Plant Species Using loss-of-Function and Gain-of-Function Mutants. *Plant Cell Physiology*. Vol. 50: 1215-1231.
- Lin**, Z., Zhong, S. y Grierson, D. **2009**. Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 60: 3311-3336.
- Marsch** M. N. **2008**. Genómica Funcional de Plantas: Estudio del Desarrollo de Flores y Frutos. *Acta Universitaria*. Vol. 19: 21-29.
- Moore**, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J. y Palmes, K. **1998**. A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Plant Biology*. Vol 95: 376-381.
- Müller**, B. y Scheen, J. **2008**. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*. Vol. 453: 1094-1097.
- Normanly**, J. **2010**. Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Vol. 2: 1-18.
- Pierce**, B. **2009**. *Génética: Un enfoque conceptual*. 3a. ed; Médica Panamericana: 47-49.
- Rodríguez**, S. C., Somoza, R. I., Sibout, R. y Persson, S. **2010**. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends in Plant Science*. Vol. 15: 291-301.
- Roeder**, A. H. K. y Yanofsky, M. F. **2006**. Fruit Development in *Arabidopsis*: The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists, Rockville MD: 1-50.
- Sagasser**, M., Lu, GH., Hahlbrock, K. y Weisshaar, B. **2002**. A. thaliana TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *GENES & DEVELOPMENT*. Vol. 16: 138-139.
- Santner**, A. y Estelle, M. **2010**. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The Plant Journal*. Vol. 61: 1029-1040.
- Scheres**, B., Benfey, P. y Dolan, L. **2002**. Root Development: The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists, Rockville MD: 1-18.

- Shani, E., Gera-Ben, H., Burko S.S., Burko Y., Weiss, D., Ori, N. 2010.** <http://www.plantcell.org/cgi/reprint/tpc.110.078253v1>.
- Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, J. S., Ljung, K., Robles, P., Galván-Ampudia., S. C., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, F. M. y Ostergaard, L. 2009.** A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*. Vol 459: 583-586.
- Sundberg, E. y Ostergaard, L. 2009.** Distinct and Dynamic Auxin Activities During Reproductive Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Vol 1a: 1-15.
- To, J. P. C. y Kieber, J. J. 2008.** Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*. Vol 13: 85-92.
- Tsukaya H. 2002.** Leaf Development: The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologist, Rockville MD: 1-23.
- Van Norman, J. M. y Benfey P. N. 2009.** *Arabidopsis thaliana* as a Model Organism in System Biology. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*. Vol 1: 1-13.
- Weigel, D. y Glazebrook, J. 2002.** *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1-6.
- Wolters, H., y Jürgens, G. 2009.** Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics*. Vol.10: 305-317.
- Woodward, A. W. y Bartel, B. 2005.** Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*. Vol. 95: 707-735.
- Zhang, W., To, P. C. J., Cheng, C., Schaller, G. E., Kieber, J. J., 2011.** Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through the post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *Plant Journal*. Accepted article doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04668.x: 1-33.
- Zhu, Z. y Guo, H. 2008.** Genetic Basis of Ethylene Perception and Signal Transduction in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*. Vol. 50: 808-815.