



Estudio de la regulación transcripcional en el desarrollo vascular. El papel de los receptores de brasinoesteroides y los factores de transcripción *R2R3-MYB*

Jorge Enrique Salazar Henao

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN EL DESARROLLO
VASCULAR. EL PAPEL DE LOS RECEPTORES DE BRASINOESTEROIDES Y LOS
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN *R2R3-MYB***

Jorge Enrique Salazar Henao

Barcelona, octubre de 2013



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

**"ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN EL DESARROLLO
VASCULAR. EL PAPEL DE LOS RECEPTORES DE BRASINOESTEROIDES Y LOS
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN *R2R3-MYB*"**

Memoria presentada por Jorge Enrique Salazar Henao para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Trabajo realizado en el Departamento de Genética Molecular del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), con el apoyo del Comisionado para Universidades e Investigación del Departamento de Innovación, Universidades y Empresa de la Generalidad de Cataluña y del Fondo Social Europeo. BECA FI 2008.

Directores de tesis:

Dra. Ana I. Caño-Delgado

Dr. David Caparrós Ruiz

Doctorando:

Tutor de tesis:

Jorge Enrique Salazar Henao

Dr. Albert Ferrer

A Maria T. Martinez

Agradecimientos

Quiero primero agradecer a la Dra. Ana Caño con quien inicié en el mundo de la biología molecular de plantas y de quien aprendí la rigurosidad y el orden a la hora de realizar experimentos, es algo que recuerdo con gratitud y cariño. Ana, tus orientaciones son un referente para mi, ya que eres una persona con una gran visión a largo plazo.

Seguidamente quiero agradecer al Dr. David Caparrós Ruiz por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación. Sus enseñanzas acerca de la construcción de una aproximación, la planeación del trabajo y la optimización del uso de recursos han sido cruciales en mi formación y creo que son fundamentales, considerando que la investigación básica debe ser lo más costo efectiva posible, ya que se desarrolla principalmente con recursos públicos. Además, desde el punto de vista personal hecharé de menos trabajar con una persona tan amigable y cercana, los cafés, las bromas y los *update* sobre el Sabadell FC.

También quiero agradecer al Pr. Pere Puigdomènech por su invaluable apoyo y consejo en el desarrollo de este trabajo.

Considero que mi paso por el laboratorio del Pr. Grotewold generó un antes y un después en mi forma de hacer ciencia y ha sido una de las mejores experiencias a nivel científico y personal que he tenido. Por lo cual, quiero agradecer al Pr, Erich Grotewold por acogerme en su grupo, por todas sus enseñanzas tanto a nivel científico como profesional y su apoyo en el inicio de nuevos proyectos. Su vocación por la ciencia y rigurosidad, son inspiradoras.

También quiero agradecer a la Dra. Montserrat Pagès por su continuo apoyo y confianza en el proyecto que realice en colaboración con su grupo. Su participación en las distintas discusiones fue muy enriquecedora y formativa. Me produce bastante admiración su capacidad científica y gerencial.

En cuanto al programa de Doctorado que curse en la UB, quiero agradecer a la Dra. Josefa Badia Palacín, por su ayuda constante y por hacernos la vida mucho más fácil a los estudiantes. Es muy grato tratar con alguien con tanta calidad humana y capacidad de gestión.

Quiero mencionar también a la Dra. Marta Riera, con quien colabore en uno de los proyectos que hacen parte de esta tesis y conozco hace bastante tiempo. Muchas gracias, por todo el apoyo brindado, ha sido un gusto conocerla y trabajar conjuntamente.

Muchas gracias a los Doctores Jesús Herney Moreno y Marta Lucia, sus consejos y apoyo han sido muy valiosos para mí. Son personas que admiro y respeto profundamente. Quiero agradecer también al Dr. Oscar Arango que siempre ha estado dispuesto incondicional a apoyarme. De igual modo, quiero darle las gracias a la Dra. Marta Marulanda, que siempre está dispuesta a ayudar a los interesados en el campo de la Biología Molecular.

En relación a mis compañeros de grupo Pep, Norma, Confraria, Albert, Costas e Irina quiero expresarles mis mejores deseos, con todos conservo buenos recuerdos. En cuanto a Mary Paz, me quedo sin palabras... ha sido un gusto conocerla, eres una excelente científica y persona. También quiero hacer una especial mención de mi compañero de proyecto, Reinhard Lehner, ya que ha sido divertido y enriquecedor trabajar juntos. Es una suerte tener un socio tan responsable y eficiente. Recuerdo de igual modo con especial cariño a Maria, Judit, Guio, Nahuel y Elena, con quienes un buen tiempo compartí espacio físico.

De igual modo quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio Joan, Silvia, Nuria Mir y Pedro, por su constante ayuda y colaboración. Es muy grato encontrarse con alguien tan amable como Joan, aprender de la forma de actuar de alguien con tanta eficiencia como Silvia y trabajar con alguien tan colaborador como Pedro.

A mis amigos del laboratorio **Rosa**, les quiero decir que no me he ido y ya les empiezo a hechar de menos. Me la he pasado muy bien con todos a pesar de que Mireia intentara obligar a tomar chupitos de tequila, Aaron me presionara para estar de fiesta un poco más y Peris Peris me pusiera a pagarle las birras. Ha sido un gusto conocer también a Mauricio, Rosany, Marcelo y Lidia. En cuanto a Patricia, creo que nos ha quedado faltando tomarnos muchas birras juntos. De igual modo, a Merce, Maite, Jordi, Nuria Sanchez, Adrian Troncoso, Helene, Laura Castaño, Tilia, Natalia, Joan Planas, Pulido, Rosa y Marçal siempre los recordaré. A Michael, Tomasso, Elena y Agnese, mis casi compañeros del laboratorio azul (siempre estuve de ocupa) también los quiero mencionar, vivimos bastantes cosas juntos.

About the lab mates, I always remember them with appreciation. The teachings of Dr. Kengo Morohashi have been very valuable in my training. Kengo, I have a deep admiration for your work, you're a Samurai in science. I would also like to thank to Daniel, Katja, Betina, Andres, Lorena, and Virginia, for their cooperation during my stay in the Grotewold's laboratory.

Entre los más cercanos amigos que conocí en este tiempo y que considero un poco mi familia están Belmiro, Bea (Chuli), Inés, Nicolas, Imen, Aguila, Isa Casas, Kathe Mejia, Santandreu, Karel y Briardo. Espero seguir encontrándome por el camino, los aprecio un montón.

Anahit (bicho malo), podría decir muchas cosas pero lo resumiré solo en una, con verte se me dibuja una sonrisa y me mejora el día. Eres una de las personas más especiales y leales que he conocido y a tu familia la considero un poco la mía.

Al Olinguito ibericus (*Bassaricyon Parlanchin*) quiero agradecerle por escucharme todas las historias que conlleva una tesis. Conocerle hace que valga un poco más la pena esta etapa de mi vida. Maria Jose te he visto evolucionar desde aquella época en que te atacaba el pánico por las gotillas en la punta de la pipeta hasta ahora que cada día te conviertes más en una gran científica. Estoy seguro de que llegarás muy lejos y espero estar cerca para verlo.

A mi familia con quien siempre he contado y son un bastión en mi vida les quiero dedicar este proyecto. Mi tío Nevardo ha sido una fuente de inspiración y un ejemplo de racionalidad y rectitud para mí. Siempre lo tengo presente. Mi tía Amanda siempre ha estado ahí y realmente somos muy buenos amigos. Mi tío Jaime a parte de hacerme reír un montón con sus historias macondianas me ha enseñado muchas cosas con ellas. Mis tías Margarita, Ofelia y mi tío Evelio, son una parte muy importante de mi vida. Asimismo, quiero mencionar a mis primos Adriana, Paula, Arles, Patricia, Jhon y mis casi sobrinos Camilo, Nico, Laura, Jaime y Mateo. A mis amigos de siempre y espero que para siempre, Mauricio, Andres, Jorge Ivan, Emilio, Diana y Leuman, les quiero expresar también mi profundo aprecio. De otra parte, también quiero mencionar a German, Idaly, Gloria, Patricia, Martin, Tomas, Ulises y Leonidas, a los cuales también considero mi familia.

Quiero agradecer a Isa que todos estos años ha sido mi compañera de batalla. Eres una persona con una lealtad y transparencia a toda prueba, por la que siento una profunda admiración como persona y como científica. Recuerdo muy cerca en el tiempo cuando eramos unos chiquillos radicales en la universidad, sin embargo cuanto tiempo ha pasado... Hemos crecido juntos y vivido tanto juntos, que tu eres un poco yo y yo soy un poco tu.

Quiero agradecer a mi madre, que ha sido un pilar fundamental en mi vida y ha estado siempre incondicionalmente. Gracias, mamá por hacer de mi la persona que soy ahora. Eres una mujer muy valiosa, luchadora y bondadosa.

Finalmente quiero agradecer a la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), tanto por la beca FI con la que desarrolle esta investigación como por la BECA BE-DGR 2010, con la cual realice una estancia en el laboratorio del Pr. Grotewold en Ohio State University en Columbus, Ohio. De igual modo, quiero agradecer al Centre de Recerca en Agrigenòmica por el contrato que me brindo para culminar el proyecto.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción general	19
1.1. Regulación transcripcional	20
1.2. Sistema vascular de las plantas	25
1.3. Justificación y objetivos de la investigación	34
1.3.1. Estudio de la regulación espacial de la familia de receptores de brasinoesteroides en <i>Arabidopsis</i>	34
1.3.2. Análisis del papel de los factores de transcripción <i>R2R3-MYB</i> del subgrupo 4 en la regulación de la síntesis de lignina.....	35
Capítulo 2. Estudio de la regulación espacial de la familia de receptores de Brassinosteroides BRI1-like en <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.1 Introducción.....	38
2.2 Materiales y métodos	41
2.2.1 Material Vegetal	41
2.2.3 Aislamiento de ADN Plasmídico	43
2.2.4 Digestión de ADN con Enzimas de Restricción.....	43
2.2.5 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	43
2.2.6 Extracción de fragmentos de ADN desde gel de agarosa	44
2.2.7 Cuantificación de ácidos nucleídos	44
2.2.8 Clonación de fragmentos de ADN provenientes de <i>Arabidopsis</i> mediante recombinación	44
2.2.9 Transformación de <i>Arabidopsis</i> por inmersión floral.....	46
2.2.10 Selección de plantas transgénicas	46
2.2.11 Tinción histológica: Localización histoquímica de la actividad β - glucuronidasa (<i>GUS</i>).....	47
2.2.12 Ensayos de transformación transiente de protoplastos provenientes de mesofilo de <i>Arabidopsis</i>	48
2.2.13 Ensayos reporteros de luciferasa	49
1.2.14 Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	49
1.2.15 Adquisición de imágenes de fluorescencia mediante Microscopia Confocal	50
2.2.16 Análisis informáticos y procesamiento de datos	50
2.3. Resultados	52

2.3.1	Análisis de expresión de la región 5' reguladora de <i>BRL3</i> en el tejido vascular de <i>Arabidopsis</i> .	52
2.3.2	Regulación por BL de la expresión vascular de <i>BRL3</i>	57
2.3.3	La expresión de <i>BRL3</i> es modulada de modo dosis dependiente por BRs	59
2.3.4	Interacciones genéticas y moleculares de BES1 con el promotor de <i>BRL3</i>	63
2.3.5	Propuesta de modelos de regulación de <i>BRL3</i> por BES1	66
2.4	Discusión de resultados	68
2.4.1	Expresión tejido-especifica de <i>BRL3</i> y <i>BRL1</i>	68
2.4.2	Regulación por BL de la expresión vascular de <i>BRL3</i>	69
2.4.3	BES1 regula la expresión de <i>BRL3</i> a través de su unión a una caja BRRE	70
Capítulo 3. Los R2R3-MYB <i>ZmMYB11</i>, <i>ZmMYB31</i> y <i>ZmMYB42</i>, en la ruta de la síntesis de lignina		73
3.1	Introducción	74
3.1.1	Biosíntesis de lignina	74
3.1.2	Regulación transcripcional de la biosíntesis de pared celular secundaria y la lignificación	78
3.1.3	Los factores de transcripción de plantas <i>R2R3-MYB</i> del subgrupo cuatro y su papel en la regulación de la biosíntesis de la pared celular secundaria	86
3.2	Materiales y métodos	90
3.2.1	Amplificación de ADN	90
3.2.2	Clonaje de la proteína <i>ZmMYB11</i>	90
3.2.3	Clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína <i>ZmMYB11</i> fusionada a etiquetas N-terminal 6-histidina (6xHIS) y Glutathione-S-transferase (GST)	91
3.2.4	Visualización de las proteínas por tinción de <i>Coomassie blue</i>	94
3.2.5	Producción y purificación del anticuerpo α MYB11	94
3.2.6	Análisis de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	95
3.2.7	Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	98
3.2.8	Análisis de material proveniente de ChIP	100
3.2.9	Preparación de librerías para ChIP-Seq empleando la plataforma Solexa-Illumina	108
3.2.10	Experimentos de expresión transiente en protoplastos de <i>Zea mays</i>	111
3.2.11	Clonación de fragmentos de ADN provenientes de <i>Zea mays</i> mediante recombinación	113

3.2.12 Análisis de datos	114
3.3 Resultados	119
3.3.1 Caracterización general de <i>ZmMYB11</i>	119
3.3.2 Cistoma de los <i>R2R3-MYB</i> <i>ZmMYB11</i> , <i>ZmMYB31</i> y <i>ZmMYB42</i> , en la ruta de la síntesis de lignina.....	129
3.4 Discusión de resultados.....	163
3.4.1 Relevancia biológica y validez técnica del Cistoma construido para los <i>MYB-R2R3</i> <i>ZmMYB11</i> , <i>ZmMYB31</i> y <i>ZmMYB42</i>	163
3.4.2 Preferencias de posición y secuencia diana en la unión a ADN de <i>ZmMYB11</i> , <i>ZmMYB31</i> y <i>ZmMYB42</i>	165
3.4.3 Cistoma de los <i>MYB-R2R3</i> <i>ZmMYB11</i> , <i>ZmMYB31</i> y <i>ZmMYB42</i> en la ruta de la síntesis de lignina.....	166
4. El modulo regulador AC-GATA/C en el promotor de ZmCOMT media la respuesta al Ácido Jasmónico	171
4.1 Introducción.....	172
4.2 Materiales y métodos	175
4.2.1 Análisis de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	175
4.2.2 Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	176
4.2.3 Análisis de material inmunoprecipitado mediante ChIP qPCR y ChIP Nano-qPCR.....	176
4.2.4 Extracción y purificación de ARN de maíz.....	177
4.2.5 Generación de cDNA.....	177
4.2.6 Cuantificación de niveles de expresión mediante qPCR	177
4.2.7 Experimentos de expresión transiente en protoplastos de maíz.....	178
4.2.8 Ensayos de interacción proteína-proteína	178
4.2.9 Generación de construcciones de fragmentos de ADN de <i>Zea mays</i>	180
4.2.10 Análisis de datos	182
4.3 Resultados	185
4.3.1 Identificación de las regiones de unión de <i>ZmZIM91</i> al promotor de <i>ZmCOMT</i>	185
4.3.2 <i>ZmMYB11</i> y <i>ZmZIM91</i> forman un heterodímero.....	185
4.3.3 <i>ZmMYB11</i> necesita el motivo EAR para interactuar con <i>ZmZIM91</i>	187
4.3.4 <i>ZmMYB11</i> se degrada en presencia de MeJA	187

4.3.5 ZmMYB11 necesita el motivo EAR para ser regulado por MeJA.....	189
4.3.6 El modulo AC-GATA/C esta conservado en el promotor del gen <i>ZmCOMT</i> de varias especies de plantas.....	191
4.3.7 ZmMYB11 y ZmZIM91 interactúan con la región que contiene las secuencias AC y GATA/C en el promotor de <i>ZmCOMT</i>	193
4.3.8 El heterodimero ZmMYB11 y ZmZIM91 reprime la expresión dirigida por el promotor <i>ZmCOMT</i>	196
4.3.9 El Metil Jasmonato induce la expresión de <i>ZmCOMT</i> y reduce la capacidad de ZmMYB11 y ZmZIM91 de unirse a su promotor	198
4.3.10 El modulo AC-GATA/C se encuentra enriquecido en la región 5' de genes de la ruta de la síntesis de lignina	198
4.4 Discusión de resultados.....	201
5. Conclusiones generales	205
Bibliografía	208

Anexos

Anexo 1. Spatial regulation of the BRI1 Receptor Like Kinase 3 (BRL3) by BES1, a major component in the brassinosteroid signalling pathway.

Anexo2. AtMYB7, a new player in the regulation of UV-sunscreens in *Arabidopsis thaliana*.

Anexo 3. Material suplementario capítulo 3.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del concepto de promotor dinámico.....	23
Figura 2. Patrón del tejido vascular durante el crecimiento y desarrollo postembrionario y sus reguladores más representativos.....	27
Figura 3. Visión general de la especificación celular del procambium/cambium y la diferenciación celular xilema/floema.....	31
Figura 4. Estructura de la región 5' de <i>BRL3</i> y análisis mediante delección de su patrón de expresión.....	54
Figura 5. Estructura de la región 5' de <i>BRL1</i> y análisis mediante delección de su patrón de expresión.....	57
Figura 6. Efecto de los BRs en la regulación transcripcional de <i>BRL3</i>	59
Figura 7. Efecto de los BRs en la regulación transcripcional de <i>BRL1</i>	60
Figura 8. Efecto del BL en el patrón de expresión generado por ProBRL3 en el meristemas de la raíz.....	62
Figura 9. Regulación de <i>BRL3</i> por BES1.	64
Figura 10. Regulación de la percepción de BRs por parte de <i>BRL3</i> a través de BES1.....	67
Figura 11. Ruta de biosíntesis de los monolignoles en angiospermas.	75
Figura 12. Diagrama de la red transcripcional que regula la biosíntesis de pared celular secundaria en Arabidopsis (A) y monocotiledóneas (B).....	80
Figura 13. Estructura general de las proteínas MYB-R2R3 del subgrupo cuatro.....	88
Figura 14. Diseño experimental de la generación de librerías de CHIP de maíz.....	108
Figura 15. Árbol filogénico de los <i>R2R3-MYB</i> del subgrupo cuatro en Arabidopsis y las gramíneas monocotiledóneas maíz, <i>Oryza sativa ssp. japonica</i> , <i>Brachypodium distachyon</i> , <i>Sorghum bicolor</i> y <i>Panicum virgatum</i>	120
Figura 16. Patrón de expresión de los <i>R2R3-MYB</i> del subgrupo cuatro en tejidos de maíz.....	121
Figura 17. <i>ZmMYB11</i> tiene un patrón de expresión ubicuo y se induce por herida. ...	122
Figura 18. Localización subcelular de <i>ZmZMYB11</i> , <i>ZmZMYB31</i> y <i>ZmZMYB42</i> en protoplastos de maíz.....	123
Figura 19. Sensibilidad del anticuerpo purificado α MYB11.....	125
Figura 20. Especificidad del anticuerpo purificado α MYB11.....	125
Figura 21. Capacidad del anticuerpo purificado α <i>ZmMYB11</i> de reconocer la proteína <i>ZmMYB11 in vivo</i>	126
Figura 22. <i>ZmMYB11</i> une <i>in vivo</i> al promotor de <i>ZmCOMT</i>	127

Figura 23. ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42 se unen <i>in vivo</i> al promotor de ZmA1..	128
Figura 24. ZmMYB11 reprime la expresión de <i>ZmCOMT</i> en experimentos de expresión transiente en protoplastos de maíz.	129
Figura 25. Esquema de trabajo adelantado para generar un catalogo de genes de interés en la síntesis de lignina.	130
Figura 26. Árbol filogénico de la familia PAL en Arabidopsis y maíz.	133
Figura 27. Patrón de expresión de la familia PAL en diferentes tejidos de maíz.	133
Figura 28. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia <i>R2R3-MYB</i> del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia PAL.....	134
Figura 29. Árbol filogénico de la familia C4H en Arabidopsis y maíz.....	135
Figura 30. Patrón de expresión de la familia <i>C4H</i> en diferentes tejidos de maíz.	136
Figura 31. Árbol filogénico de la familia 4CL en Arabidopsis y maíz.	137
Figura 32. Patrón de expresión de la familia <i>4CL</i> en diferentes tejidos de maíz.....	138
Figura 33. Árbol filogénico de la familia CCR en Arabidopsis y maíz.	140
Figura 34. Patrón de expresión de la familia <i>CCR</i> en diferentes tejidos de maíz.	140
Figura 35. Árbol filogénico de la familia CAD en Arabidopsis y maíz.	142
Figura 36. Patrón de expresión de la familia <i>CAD</i> en diferentes tejidos de maíz.....	142
Figura 37. Árbol filogénico de la familia HCT en Arabidopsis y maíz.....	144
Figura 38. Patrón de expresión de la familia <i>HCT</i> en diferentes tejidos de maíz.	145
Figura 39. Árbol filogénico de la familia C3H en Arabidopsis y maíz.....	146
Figura 40. Patrón de expresión de la familia <i>C3H</i> en diferentes tejidos de maíz.	147
Figura 41. Árbol filogénico de la familia CCoAOMT en Arabidopsis y maíz.....	148
Figura 42. Patrón de expresión de la familia <i>CCoAOMT</i> en diferentes tejidos de maíz.	148
Figura 43. Árbol filogénico de la familia <i>F5H</i> en Arabidopsis y maíz.	150
Figura 44. Patrón de expresión de la familia <i>F5H</i> en diferentes tejidos de maíz.	150
Figura 45. Árbol filogénico de la familia <i>COMT</i> en Arabidopsis y maíz.	152
Figura 46. Patrón de expresión de la familia <i>COMT</i> en diferentes tejidos de maíz.....	152
Figura 47. Árbol filogénico de la familia <i>CesA</i> en Arabidopsis y maíz.	153
Figura 48. Patrón de expresión de la familia <i>CesA</i> en diferentes tejidos de maíz.....	154
Figura 49. Dianas y sitios de unión <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los <i>R2R3-MYB</i> ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.....	157

Figura 50. Cistoma de los genes de la ruta de la síntesis de lignina y miembros de la familia CesA de los <i>R2R3-MYB</i> <i>ZmMYB11</i> , <i>ZmMYB31</i> y <i>ZmMYB42</i>	158
Figura 51. Cistoma de <i>ZmMYB11</i> en la ruta de la síntesis de lignina.	159
Figura 52. Cistoma de <i>ZmMYB31</i> en la ruta de la síntesis de lignina.	159
Figura 53. Cistoma de <i>ZmMYB42</i> en la ruta de la síntesis de lignina.	160
Figura 54. Librerías de ChIP de <i>ZmMYB11</i> , <i>ZmMYB31</i> , <i>ZmMYB42</i> y <i>ZmInput</i>	161
Figura 55. Dianas descritas para <i>ZmMYB31</i> y <i>ZmMYB42</i>	164
Figura 56. Propuesta de metaboloma asociado con el patrón de represión de <i>ZmMYB11</i>	168
Figura 57. Propuesta de metaboloma asociado con el patrón de represión de <i>ZmMYB31</i>	169
Figura 58. Propuesta de metaboloma asociado con el patrón de represión de <i>ZmMYB42</i>	170
Figura 59. Análisis de ChIP qPCR de la unión de <i>ZmMYB11</i> y <i>ZmZIM91</i> al promotor de <i>ZmCOMT</i>	185
Figura 60. <i>ZmMYB11</i> y <i>ZmZIM91</i> pueden interactuar a nivel proteína-proteína.....	186
Figura 61. <i>ZmMYB11</i> requiere el motivo EAR para su interacción con <i>ZmZIM91</i>	187
Figura 62. <i>ZmMYB11</i> son degradados bajo tratamientos con MeJA en protoplastos de maíz.	189
Figura 63. El MeJA modula las proteínas <i>ZmMYB11</i> y a <i>ZmZIM91</i>	189
Figura 64. <i>ZmMYB11</i> requiere del motivo EAR para su regulación por MeJA.	190
Figura 65. Visualización del modulo regulador en cis (CRM) del promotor de <i>COMT</i> conservado entre gramíneas.....	192
Figura 66. <i>ZmZIM91</i> y <i>ZmMYB11</i> interactúan con la región que contiene las secuencias AC y GATA/C en el promotor de <i>ZmCOMT</i>	194
Figura 67. <i>ZmZIM91</i> y <i>ZmMYB11</i> co-ocupan un modulo regulador en el promotor de <i>ZmCOMT</i>	195
Figura 68. <i>ZmMYB11</i> y <i>ZmZIM91</i> reprimen fuertemente la expresión de <i>ZmCOMT</i> en experimentos de expresión transiente en protoplastos de maíz.	197
Figura 69. El MeJA modula la expresión de <i>ZmCOMT</i> y la capacidad de unión a ADN de sus represores <i>ZmZIM91</i> y <i>ZmMYB11</i>	199
Figura 70. Enriquecimiento del modulo AC-GATA/C en la región 5' de genes de la ruta de la síntesis de lignina.	200
Figura 72. Modelo propuesto de la regulación de <i>ZmCOMT</i> por MeJA.	204

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los cebador usados para la construcción de las delecciones del promotor de <i>BRL1</i> y de <i>BRL3</i>	45
Tabla 2. Construcciones elaboradas en la investigación de material proveniente de <i>Arabidopsis</i>	45
Tabla 3. Secuencia de los cebadores usados para realizar CHIP qPCR empleando inmunoprecipitaciones de BES1.....	50
Tabla 4. Reacción de semi qPCR para amplificación con muestras de CHIP.....	100
Tabla 5. Secuencia de los cebadores usados para realizar CHIP qPCR empleando inmunoprecipitaciones de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.....	107
Tabla 6. Secuencia de los cebadores usados para el estudio de los <i>R2R3-MYB ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42</i>	113
Tabla 7. Construcciones empleadas para el estudio de los <i>R2R3-MYB ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42</i>	114
Tabla 8. Enzimas de la vía de los fenilpropanoides identificadas como dianas de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42 mediante CHIP Seq.	162
Tabla 9. Factores de Transcripción de la vía de los fenilpropanoides identificadas como dianas de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42 mediante CHIP Seq.	162
Tabla 10. Secuencia de los cebadores usados para realizar análisis de expresión mediante qPCR.....	178
Tabla 11. Construcciones utilizadas en el estudio de la regulación del modulo AC - GATA/C.....	182

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia C4H.	136
Cuadro 2. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia 4CL.	138
Cuadro 3. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia CCR.	141
Cuadro 4. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia CAD.	143
Cuadro 5. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia HCT.	145
Cuadro 6. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia CCoAOMT. ...	149
Cuadro 7. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia F5H.	150
Cuadro 8. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia COMT.	152
Cuadro 9. Análisis <i>in vivo</i> del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia Cesa.	155

ABREVIATURAS

°C:	Grados centígrados
4CL:	4-Coumarato: CoA ligasa
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
Ara:	Arabinosa
ARN:	Ácido ribonucleico
BiFC:	Complementación bimolecular de la fluorescencia
BL:	Brasinolido
BR:	Brasinoesteroide
BRs:	Brasinoesteroides
BSA:	Albúmina sérica bovina
C3H:	Shikimato p-coumarílico 3-hidroxilasa
C4H:	Cinamato 4-hidroxilasa
CAD:	Cinamil alcohol dehidrogenasa
CaMV 35S:	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
CBI:	Inhibidor de biosíntesis de celulosa
CCoAOMT:	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
CCR:	Cinamoil-CoA reductasa
CesA:	Celulosa sintasa
ChIP:	Inmunoprecipitación de Cromatina
ChIP-Seq:	Inmunoprecipitación de cromatina seguida de masiva paralela secuenciación
COMT:	Ácido cafeico/5-hidroxiciniferaldehído O-metiltransferasa
CRERs:	Regiones enriquecidas en elementos reguladores cis
CREs:	Elementos reguladores en cis
CRMs:	Modulo regulador en cis
Dam-ID:	Identificación de metiltransferasa de adenina del ADN
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DTT:	Ditiotreitol
E.coli:	<i>Escherichia coli</i>
F5H:	Ferulato 5-hidroxilasa, Ácido ferúlico 5-hydroxilasa
g:	Gramo
GFP:	Proteína fluorescente verde
Glc:	Glucosa
GRNs:	Red reguladora genética
GST:	Glutation-S-transferasa
GUS:	β -glucoronidasa
HCT:	p-Hidroxicinnamoil-CoA: quinato shikimato p-hidroxicinnamoil
HEPES:	Ácido 4(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
JA:	Ácido Jasmónico
JAs:	Jasmonatos
kb:	kilobases
l:	Litro
LUC:	Luciferasa
MeJA:	Metil jasmonato
mg:	Miligramo

ml:	Mililitro
ng:	Nanogramo
NGS:	Nuevas tecnologías de secuenciación
PAGE:	Electroforesis en gel de acrilamida
PAL:	Fenilalanina amonía-liasa
pb:	Pares de bases
PbMs:	Unión de proteínas a un micro arreglo de ADN
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Polyethylene glycol
PMSF:	Fenilmetanosulfonil fluoruro
qPCR:	PCR cuantitativa
rpm:	Revoluciones por minuto
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
SD:	Desviación estándar
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel desnaturizante SDS/poliacrilamida
SELEX:	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial
STA:	Amplificación específica de diana
TF:	Factor de transcripción
TFBS:	Sitio de unión de un factor de transcripción
TFBSs:	Sitio de unión de factores de transcripción
TFs:	Factores de transcripción
TSS:	Sitio de inicio de transcripción
Y1H:	Ensayo de híbrido simple en levadura
µg:	Microgramo
µl:	Microlitro

Capítulo 1. Introducción general

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

Voltaire

1.1. Regulación transcripcional

Muchos procesos biológicos en la planta como son el desarrollo, la respuesta a estímulos ambientales y la homeostasis son regulados a nivel transcripcional. El control transcripcional es ejecutado por la interacción entre factores de transcripción (TFs) y microRNAs, que actúan en *trans* como reguladores y los elementos *cis*-regulados (CREs), que son secuencias de ADN en la periferia de los genes diana. Cada gen tiene en su región adyacente un conjunto de elementos reguladores que proporcionan una multitud de sitios de unión para factores de transcripción (Kim & Park 2011).

Los TFs se unen a ADN en diferentes combinaciones e interaccionan tanto entre ellos, como con otras moléculas, dando lugar junto a los microRNAs a redes de regulación genética (GRNs) que permite modular la expresión génica espacial y temporalmente, en respuesta a las necesidades intrínsecas e extrínsecas del organismo. La expresión génica es controlada en muchos niveles, sin embargo el más extendidamente investigado es la regulación transcripcional (Aasland et al 1996, Agostini et al 1999, Lee & Young 2000).

De modo general los TFs pueden dividirse en generales y específicos. Los primeros actúan en cooperación con la ARN polimerasa II y están implicados en la transcripción de un amplio número de genes (Lee & Young 2000) y los segundos se unen a subconjuntos de genes diana para dar lugar a patrones espacio-temporales de expresión génica (Kadonaga 2004).

Los TFs son típicamente compuestos de dos regiones funcionales en una de las cuales hay un dominio de unión ADN y en la otra, dominios reguladores (Mitchell & Tjian 1989). El dominio de unión a ADN reconoce secuencias específicas y ayuda a fijar el factor de transcripción al ADN (Kim & Park 2011). Además, los dominios les permiten a los TFs interactuar entre ellos y con otras proteínas que no se unen a ADN pero hacen parte del complejo transcripcional y son denominados co-factores.

Los CREs han sido tradicionalmente clasificados de acuerdo a su función y a la arquitectura genómica en promotores, potenciadores, silenciadores y aisladores (Kim & Park 2011). Los promotores se dividen en dos tipos núcleo "core" y proximal, dependiendo de las proteínas con las que interactúan y la distancia a los sitios de inicio de transcripción (TSS).

En plantas, como en otros sistemas eucariotas, 50 pb aguas arriba y 50 bp aguas abajo del TSS ha sido considerada como la zona que contiene el núcleo del promotor (Mejia-Guerra et al 2012, Novina & Roy 1996, Vandepoele et al 2006). Al núcleo se une la familia de factores II (TFII) permitiendo seguidamente, la coordinación de los componentes del complejo de inicio de la transcripción facilitando el reclutamiento de la RNA polimerasa II y la iniciación la transcripción (Juven-Gershon et al 2008, Smale & Kadonaga 2003, Thomas & Chiang 2006).

El promotor proximal se encuentra en dirección 5' del núcleo del promotor e interacciona con TFs específicos interviniendo en la estabilidad de la unión de los TFs generales al núcleo del promotor (Gill 2001, Kim & Park 2011). Es de anotar, que la identificación de regiones regulatorias realizando análisis por delección en múltiples genes ha mostrado que las secuencias entre -300 a -50 pb del TSS tienen un efecto positivo en la actividad del promotor mientras que la zona entre -1000 a -500 bp del TSS tiene un efecto negativo (Barrett et al 2012, Cooper et al 2006).

Sin embargo, los resultados aportados por los recientes avances en el análisis *in vivo* a nivel genómico de interacciones de TF-promotor y varios fenotipos de desarrollo asociados con cambios estructurales en la organización del genoma que afectan a un *loci* de desarrollo en los que potenciadores remotos están involucrados, han mostrado que probablemente la idea de que el promotor es la región aguas arriba del TSS no es totalmente correcto, ya que no captura la compleja estructura tridimensional de la cromatina a través de la que las secuencias distantes se pueden plegar y quedar próximas a los complejos reguladores (Dathe et al 2009, Klopocki et al 2008, Mejia-Guerra et al 2012, Spilianakis et al 2005, Spitz & Furlong 2012). Se ha encontrado por

ejemplo, que elementos regulatorios a lo largo del genoma a 100 kb de distancia influyen en la expresión de un gen (Louwers et al 2009).

En los últimos años se ha evidenciado también debido a los resultados de diversas publicaciones que la regulación de la expresión génica en eucariotas es un proceso en el que regiones tales como la 5' UTR, los intrones y la 3' UTR, tienen un papel relevante en la regulación de la transcripción (Barrett et al 2012, Bolduc & Hake 2009, Cheng et al 2005, Kaufmann et al 2010, Mejia-Guerra et al 2012, Ng et al 2009). En plantas, uno de los casos de regulación en *cis* aguas abajo del 5' TSS mas estudiado es el efecto potenciador del primer intrón y la 5' UTR (Mejia-Guerra et al 2012).

Los potenciadores se encuentran a menudo lejos de los promotores y de los TSS. La función de estos es promover la transcripción, lo que logran mediante el reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas que abren estructuralmente la cromatina (Jiang & Pugh 2009). Por su parte, los silenciadores cumplen un papel antagónico al de los potenciadores pero tienen una forma de trabajo similar, estos rodean la secuencia codificante y otros CREs, para proteger las estructuras de los genes y las estructuras reguladoras de la influencia de los efectos externos (Kim & Park 2011).

Otro elemento que interviene en la regulación genética es el modo en que los sitios de unión de factores de transcripción (TFBSs) se organizan en el genoma formando módulos regulatorios en *cis* (CRMs) (Kirchhamer et al 1996). Los CRMs son definidos como una secuencia de ADN que contiene TFBSs agrupados en estructuras modulares (típicamente entre 50 pb y hasta 1,5 kilobases, kb), que actúan para regular diversos aspectos del proceso de transcripción (Bolouri & Davidson 2002, Jeziorska et al 2009). El papel de un TF comúnmente está determinado no solo por el propio TF, sino por el orden de los TFBSs a los que se une y al contexto celular en el que actúan, pudiendo un TF actuar como un activador o un represor de la expresión dependiendo de las condiciones en que se encuentre (Hunziker et al 2010, Kim & Park 2011, Madan Babu & Teichmann 2003, Singh & Hannenhalli 2010).

Entender cómo opera un CRM involucra conocer su arquitectura, identificar los factores que modulan su actividad y la medición de su capacidad para regular la transcripción. Los CRMs se localizan desde unos pocos kb hasta cientos de kb aguas arriba del núcleo del promotor (Bien-Willner et al 2007, Jack et al 1991, Jeziorska et al 2009), en la secuencia codificante (Tumpel et al 2008), dentro de intrones (Zimmerman et al 1994), en la zona 3' UTR (Palmer et al 2007, Yochum et al 2008), así como en diferentes cromosomas donde un CRM es capaz de interferir en los elementos en *trans* (Lomvardas et al 2006, Spilianakis et al 2005, Xu et al 2006).

El concepto de promotor dinámico abarcando todos los CREs y los CRMs que modulan la expresión génica puede ser el más acertado para describir la regulación en *cis*, incluyendo los conocimientos obtenidos en los últimos años (Mejia-Guerra et al 2012) (Figura 1). Sin embargo, en general se considera que hay una gran cantidad de elementos regulatorios importantes ubicados cerca del TSS del gen regulado y por tanto, se emprenden abordajes experimentales centrados en esta zona (Kim & Park 2011).

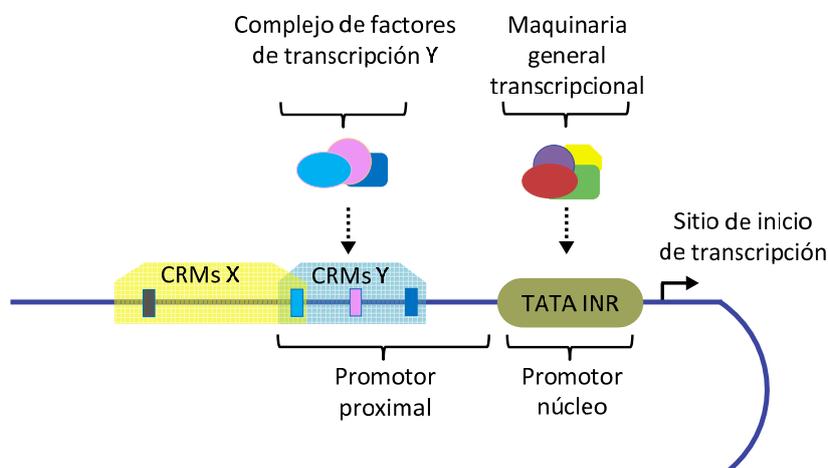


Figura 1. Representación del concepto de promotor dinámico.

Se representan los diferentes componentes de la regulación en *trans* que son la ARN polimerasa II y los factores de transcripción generales y específicos. Igualmente, se simbolizan los elementos *cis*-regulados (CREs), que son el promotor núcleo, el promotor proximal, los potenciadores, los silenciadores, los aisladores y finalmente, los módulos regulatorios en *cis* (CRMs).

De acuerdo a la escala temporal en que actúan, en términos generales las GRNs se pueden dividir en GRNs de desarrollo y GRNs sensoras. Las GRNs de desarrollo operan en los procesos de división y diferenciación celular y determinan cambios irreversibles

en los patrones de expresión genética, efectuando modificaciones que perduran por encima de una generación celular. Por el contrario, las GRNs sensoras inicial un proceso que parte de la percepción de una señal e intervienen dentro del rango de una generación celular, por ejemplo, un estrés causado por un cambio medio ambiental se traduce en una modificación en la expresión de uno o varios genes y finaliza con la síntesis proteica. Las GNRs proveen un vínculo causal específico entre secuencias genómicas reguladoras y procesos de desarrollo o respuestas a estímulos ambientales (Davidson & ebrary Inc. 2006, Davidson & Levine 2008, Levine & Davidson 2005, Oliveri et al 2008). Además, los componentes individuales de un complejo proceso de desarrollo son en general controlados por subcircuitos de la GRNs (Davidson & Levine 2008).

Con el fin de identificar GRNs se estudian las complejas interacciones entre múltiples TFs y sus genes diana, a través de diferentes tipos celulares, contextos y momentos específicos. Las interacciones TF-ADN pueden ser estudiadas usando dos aproximaciones diferentes pero ampliamente complementarias las cuales son las centradas en los TF (proteína-ADN) y las centradas en los genes (ADN-proteína) (Arda & Walhout 2010).

Los métodos enfocados en el estudio proteína-ADN inician con uno o varios TF y buscan identificar el fragmento de ADN genómico con los que estos interactúan, siendo ejemplos de este abordaje la inmunoprecipitación de la cromatina (Chromatin immunoprecipitation, ChIP), la identificación ADN adenina metiltransferasa (ADN adenine methyltransferase identification, DamID) y la unión de proteínas a un micro arreglo de ADN (Protein-binding microarrays, PbMs).

Una de las principales técnicas empleadas actualmente para estudiar las interacciones ADN-proteína *in vivo* es el ChIP, el cual se basa en inmunoprecipitar selectivamente una proteína de interés para determinar las secuencias de ADN asociadas con ella. El ChIP ha sido ampliamente utilizado para determinar modificaciones post-traduccionales en las histonas, variaciones en las histonas, TFBS y modificaciones de la

cromatina en el genoma o en un locus dado debido a la acción de enzimas (Collas 2009).

Posteriormente aprovechando las nuevas tecnologías de secuenciación (NGS), se creó un método denominado ChIP-Seq, que combina la inmunoprecipitación de cromatina con la secuenciación en paralelo a gran escala, (Barski et al., 2007; Johnson et al., 2007). En este método los fragmentos diana de un factor de transcripción son primero enriquecidos mediante la inmunoprecipitación y seguidamente, son unidos a adaptadores, amplificados mediante PCR y finalmente secuenciados, para generar cientos de millones de lecturas cortas (reads) de ADN. Estas lecturas son seguidamente alineadas con el genoma y empleando un algoritmo de búsqueda de picos (peak-finding) pueden ser usadas para establecer a escala genómica la localización de los sitios de unión del TF o modificaciones en las histonas (Kim & Park 2011). En el análisis de ChIP-Seq, los sitios biológicamente interesantes son identificados mediante la búsqueda de los *loci* en el genoma donde las lecturas de ADN provenientes del ChIP están sobre-representados (Xu et al 2010).

Finalmente, los métodos orientados a analizar las interacción ADN-proteína inician con uno o más fragmentos de ADN y desean establecer que TF interactúan con ellos, entre estos métodos se puede mencionar el híbrido simple en levadura (Yeast One-Hybrid, Y1H) y la delección de la región 5' de un gen y su fusión a un gen reportero.

1.2. Sistema vascular de las plantas

El tejido vascular de la planta tiene como funciones principales conformar una estructura física que sirve de sostén, permite el transporte de sustancias como agua y nutrientes y facilita la defensa. El sistema vascular constituye una red de células que interconectan todos los principales órganos de la planta y está constituido por el xilema y el floema que son dos tejidos totalmente diferenciados, así como por tejidos meristemáticos también llamados procambium/cambium, que tienen características pluripotentes (Figura 2). El xilema transporta agua y minerales desde la raíz hasta las partes aéreas de la planta y el floema es esencial para transportar productos

fotosintéticos (azúcares, ARN, proteínas y otros compuestos orgánicos), desde la fuente hasta los órganos. Los meristemos apicales de la raíz y el tallo son establecidos durante el desarrollo embrionario mientras que los meristemos laterales (procambium y cambium vascular), aparecen en etapas posteriores de desarrollo y son el resultado de procesos de reclutamiento celular y re-diferenciación controlados por hormonas (Schuetz et al 2013).

El desarrollo del sistema vascular de las plantas se puede dividir en primario y secundario. Durante el desarrollo primario se forman en el tallo y la raíz, el xilema y el floema a partir del procambium (Ye 2002, Ye et al 2002, Zhang et al 2011). Las células individuales de procambium se someten a divisiones periclicinales (paralelas al plano de la elongación celular), para generar el tejido procambial, donde se forman el xilema y el floema, y se mantiene un subconjunto de células en un estado indiferenciado que funcionan como células madre vasculares que permiten la formación de tejidos vasculares en zonas de elongación rápida o en la expansión de órganos (Schuetz et al 2013).

Posteriormente, el cambium vascular que es un meristemo lateral dedicado al desarrollo vascular secundario (Zhang et al 2011) se desarrolla a partir de células del procambium y del parenquima, que recuperan la capacidad de dividirse y forman una capa de células meristemáticas entre el xilema y el floema primario en los haces vasculares (Figura 2) (Ursache et al 2013). El tejido vascular secundario se define como el tejido vascular que surge del cambium vascular (Groover 2005, Ursache et al 2013). Las células del cambium comienzan a proliferar y dan lugar al floema secundario hacia el exterior y al xilema secundario hacia el interior (Zhang et al 2011). Aunque las actividades de la división celular en el cambium son más pronunciadas en especies de árboles perennes, también se producen en plantas herbáceas.

El único caso excepcional son las monocotiledóneas, que a diferencia de otras plantas con flores y gimnospermas, el cambium no se desarrolla probablemente debido a la pérdida de la capacidad de formación de cambium antes de su divergencia (Cano-Delgado et al 2010).

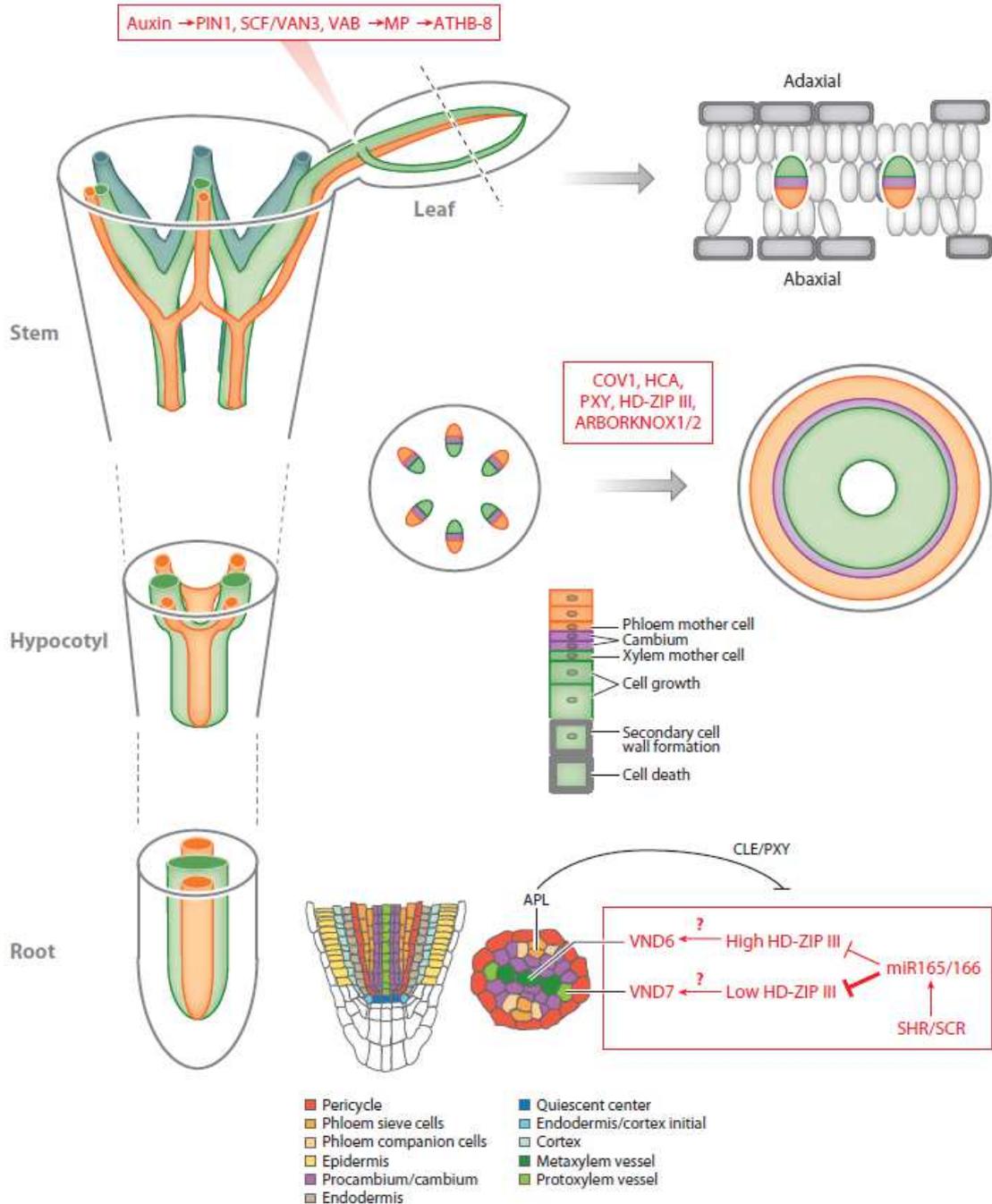


Figura 2. Patrón del tejido vascular durante el crecimiento y desarrollo postembrionario y sus reguladores más representativos.

(Cano-Delgado et al 2010). Los tejidos vasculares están conectados como una sola red en las plantas; sin embargo, su organización cambia en diferentes partes del cuerpo de la planta. (izquierda) Como los tejidos vasculares están conectados en la planta. (derecha) Representación detallada de la organización de los tejidos vasculares en la hoja, el tallo y la raíz. Las rutas o los reguladores representativos en el patrón vascular son simbolizados con un cuadro rojo. APL (ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT); ATHB-8 (class III homeodomain transcription factor 8); CLE (CLAVATA3-like small protein ligands); COV1 (CONTINUOUS VASCULAR RING 1); HD-ZIP III (class III homeodomain-leucine zipper); HCA (HIGH CAMBIAL ACTIVITY); miR (microRNA); MP (MONOPTEROS); PIN1 (auxin efflux carrier); PXY (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM); SCF/VAN3 (SCARFACE); SCR (SCARECROW); SHR (SHORT ROOT); VAB (VAN3 binding protein) y VND (VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN).

El procambium proporciona durante el crecimiento primario células madre vasculares y el cambium vascular y sus células asociadas, tienen un papel similar en el crecimiento secundario en el que la planta continúa creciendo y madurando (Ursache et al 2013). Durante las etapas finales de la diferenciación vascular las células precursoras del floema y del xilema se someten a distintos programas de desarrollo y terminan diferenciándose en elementos maduros del xilema y del floema (Figura 2 y 3) (Esau & Gill 1969).

Los mecanismos por los que ciertas células procambiales son seleccionadas para diferenciarse en floema se desconocen. Sin embargo, la estabilidad del patrón vascular en la mayoría de especies sugiere que las señales de posición y condiciones de crecimiento son de importancia crítica (Bauby et al 2007).

El floema primario comprende los tubos criboso y las células acompañantes, las células del parénquima del floema y las fibras del floema. Este está compuesto por el protofloema, que madura en las partes de la planta que aún están creciendo en extensión y sus elementos cribosos pronto se vuelven inactivos y el metafloema que se diferencia más tarde y completa su maduración después de que el órgano ha terminado su crecimiento longitudinal (Figura 3). Los tejidos del floema maduro consisten en tubos cribosos, células acompañantes del floema y en muchos casos, en las fibras del floema. Los elementos cribosos se encargan del transporte de metabolitos desde tejidos de origen, como hojas, a sumideros metabólicos, como raíces y semillas. Durante la diferenciación, los elementos cribosos pierden muchos de sus orgánulos, incluyendo el núcleo, pero se mantienen fisiológicamente vivos, debido a que se acopla citoplásmicamente a las células acompañantes a través de numerosos plasmodesmos, para que ellas mantengan su competencia metabólica (Schuetz et al 2013).

Las traqueidas formadas durante el desarrollo de la planta, se distinguen estructuralmente como conductos de protoxilema y de metaxilema. El protoxilema se forma en el desarrollo primario de la planta y tienen engrosamientos de la pared celular secundaria por deposiciones localizadas anulares o en espiral, que son patrones

de refuerzo que permiten a estas células continuar alargándose dentro de las áreas en crecimiento activo de la planta (Schuetz et al 2013). Por su parte, el metaxilema se encuentra cuando aún la planta es joven y está en crecimiento y seguidamente, madura cuando el tejido vegetal finaliza su alargamiento. Este se caracterizan por un patrón picado o reticulado de deposición de la pared celular secundaria, que no permite la elongación celular continua (Figura 3) (Schuetz et al 2013).

Los tejidos maduros del xilema se compone de tres tipos de células principales: Elementos del xilema traqueales (vaso), fibras del xilema y células del parénquima del xilema. Los Elementos traqueales, facilitan el transporte de agua y solutos entre los órganos y las fibras proporcionan soporte estructural para la planta, poseyendo ambos tejidos gruesas paredes celulares secundarias. Las células del parénquima del xilema carecen de paredes celulares secundarias bien definidas y están implicados en una variedad de procesos biológicos, incluyendo ayudar a la lignificación de las paredes celulares secundarias de los elementos traqueales y las fibras. Estos tres tipos de células se forman a partir de células precursoras del xilema, que se derivan a partir de células procambiales/cambiales, pero solo los elementos traqueales y las fibras se someten a la extensa formación de la pared celular secundaria, denominada xylogenesis (Schuetz et al 2013) (Figura 3).

El desarrollo del xilema secundario se produce a través de diferentes pasos que implican la proliferación celular del cambium, especificación y expansión de las células del xilema, deposición de pared celular secundaria y la muerte celular programada para formar huecos en forma de tubo (Zhang et al 2011).

La pared celular es el rasgo más característico de las células vegetales. En las plantas la pared celular diverge en cuanto a su composición polimérica tanto entre especies como entre tipos celulares y puede clasificarse como primaria o secundaria, dependiendo si es extensible o no, durante el crecimiento de los órganos (Lee et al 2011).

Introducción general

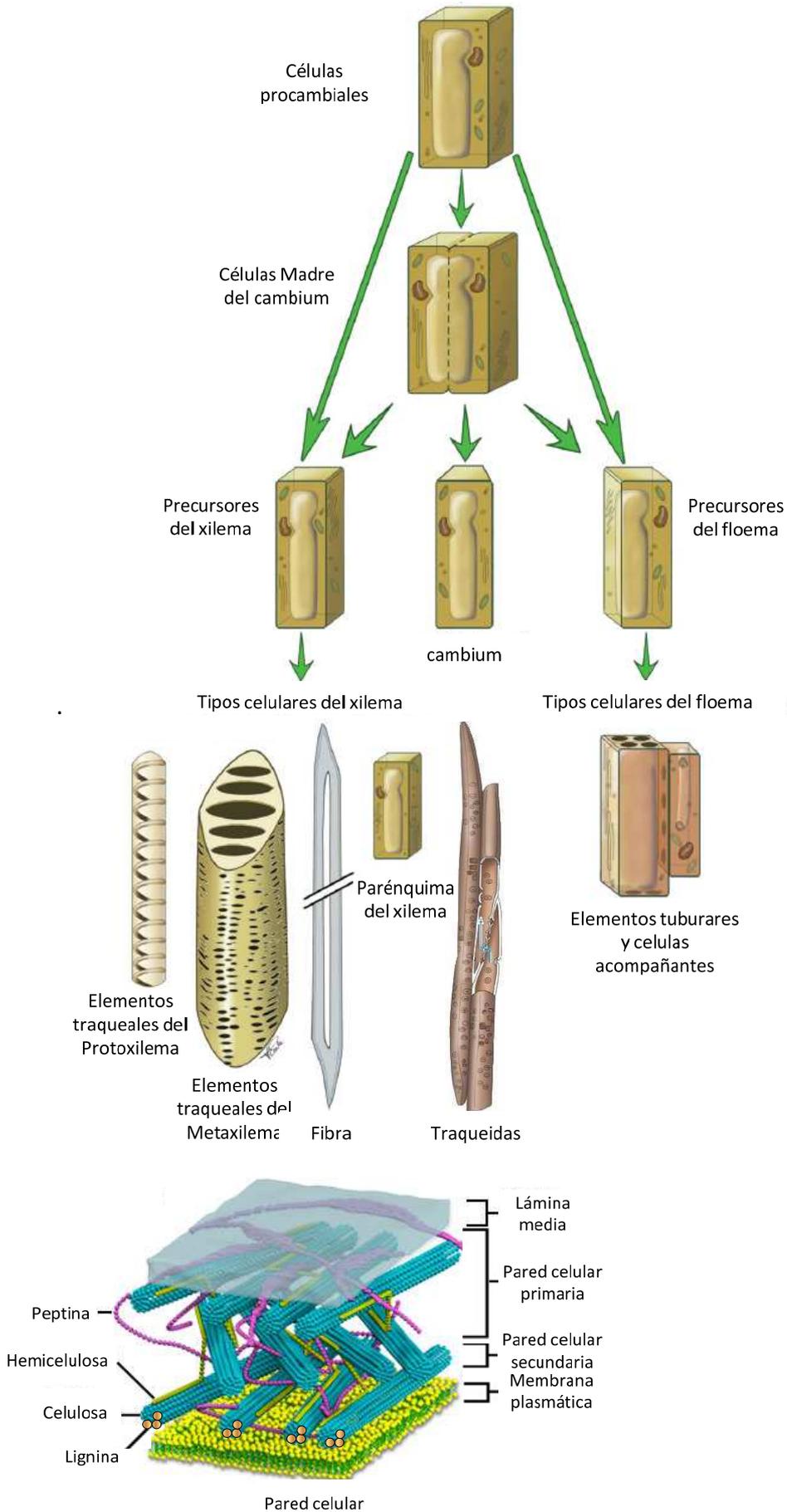


Figura 3. Visión general de la especificación celular del procambium/cambium y la diferenciación celular xilema/floema.

(Adaptado. Schuetz et al 2013). Las células del procambium pueden formarse por la diferenciación de células del parénquima o por la división de células existentes del procambium, durante el crecimiento primario. El cambium vascular y las células asociadas se derivan del procambium vascular durante la transición al crecimiento secundario. Las células del procambium/cambium se diferencian en los distintos tipos de células del xilema o del floema. En la parte inferior se presenta una representación de la pared celular vegetal (Adaptado. <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/imagenes/CC31/antioxidantes2.jpg>).

Todas las células de la planta contienen una pared celular compuesta por una matriz de microfibrillas de celulosa, hemicelulosas, y otros polímeros de pared celular, sin embargo existen diferencias significativas entre los tipos de polímeros y su abundancia, siendo un ejemplo de esto las variaciones presentes en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Handakumbura & Hazen 2012, Vogel 2008). Cantidades relativamente altas de xiloglucano, pectinas y proteínas estructurales, se encuentran en las paredes primarias de eudicotiledóneas, monocotiledóneas no commelinoides, y gimnospermas, mientras que monocotiledóneas commelinoides como las gramíneas contienen glucurono-arabinoxylan, pequeñas cantidades de proteínas de pectina y estructurales y altos niveles de hydroxycinnamates (Vogel 2008).

La pared es secretada por la célula viva como una serie de capas, de manera que la capa más vieja está hacia afuera y la capa más joven hacia adentro junto al protoplasma. Las 3 capas principales de la pared celular, desde el exterior hacia el lumen celular son: la lámina media, la pared primaria y la pared secundaria (Figura 3).

La lamina media es una capa fina depositada durante la división celular, que puede ser compartida por varias células y está formada principalmente por pectinas y proteínas. Posteriormente, se genera la pared primaria que es depositada inmediatamente después de la división celular, antes de que la célula complete su crecimiento. Las células que poseen este tipo de pared están asociadas a protoplastos vivos, tienen la capacidad de volver a dividirse por mitosis y sus paredes pueden experimentar cambios reversibles.

Finalmente, se encuentra la pared secundaria la cual solamente está presente en algunos tipos celulares. Una vez empieza a depositarse la pared secundaria la célula

detiene su crecimiento y elongación. Su presencia está restringida a células de los tejidos vascular y mecánico, en los cuales la pared secundaria es características de las traqueidas, las fibras y las esclereidas del esclerénquima. Regularmente, consta de tres capas con características físicas y químicas diferentes, llamadas desde afuera hacia adentro S1 (capa externa), S2 (capa media o central) y S3 (capa interna).

La pared celular primaria de las plantas superiores está formada por una matriz y fibras, constituidas principalmente por celulosa, hemicelulosas, pectina y otras proteínas estructurales. A diferencia, la pared celular secundaria está compuesta esencialmente de celulosa, hemicelulosa y lignina.

La lignina es uno de los componentes más importantes de la pared secundaria, y después de la celulosa, es el polímero vegetal más abundante. Este compuesto se sintetiza a través de la ruta de los fenilpropanoides y se localiza en la pared celular secundaria de tejidos vascular y mecánico. Además, este polímero interviene en la integridad estructural de la planta, el eficiente transporte hídrico y como barrera contra ataques microbianos (Sarkanen & Ludwig 1971a).

En relación a su composición la lignina es un complejo aromático de carácter fenólico, que es principalmente derivado de tres alcoholes: coumaryl, coniferyl y sinapyl, que se denominan comúnmente como monolignoles. Estos alcoholes se transportan a la pared celular y se polimerizan para dar lugar al polímero lignina. Una vez polimerizados los monolignoles se denominan subunidades: H, G y S, en función del alcohol del que provienen.

En el control del desarrollo vascular intervienen distintos niveles de regulación entre los que están el transcripcional, el hormonal, post-transcripcional y post-traduccional. Sin embargo, está demostrado que hay una correlación entre las clases de genes que se expresan en los distintos momentos del desarrollo y las diferentes etapas y tipos de tejidos dentro de los tejidos vasculares secundarios (Schrader et al 2004). Además, diferentes estudios han mostrado que las hormonas vegetales auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, jasmonatos (JAs) y brasinoesteroides, son señales importantes en

el desarrollo de la planta, estando involucrados en la inducción y mantenimiento de cambium y en la formación de tejidos vasculares secundarios (Ursache et al 2013). Por tanto, se puede afirmar que tanto la regulación transcripcional como hormonal, son claves en el desarrollo vascular.

Una de las familias de factores de transcripción mejor caracterizada que interviene en la ruta de la síntesis de lignina es la de los *R2R3-MYB*. Esta posee un dominio de unión a DNA MYB repetido y en la región C terminal dominios reguladores. Los *R2R3-MYB* forman una familia multigénica muy amplia, que se agrupan en 22 subgrupos filogenéticos (Stracke et al 2007).

Los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro han sido considerados como una de las familias más relevantes en la represión de la síntesis de lignina. En el grupo del Dr. David Caparrós se han caracterizado tres de ellos, los cuales son *ZmMYB31*, *ZmMYB42* y *ZmMYB8*. Los resultados obtenidos indican que *ZmMYB31* (Fornale et al 2010b) y *ZmMYB42* (Gray et al 2012, Sonbol et al 2009), se unen *in vivo* a genes de la ruta de la lignina en maíz y que su expresión heteróloga en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) produce plantas con una modificación en el polímero lignina. Asimismo, se concluyó que probablemente *ZmMYB8* no está involucrado en la regulación de la vía de síntesis de lignina. Recientemente, se ha iniciado en dicho grupo el estudio de *ZmMYB11* y se ha encontrado que se expresa de forma ubicua y se induce por herida, dos características típicas de genes que intervienen en la ruta de la lignina.

En este trabajo se estudia el desarrollo vascular de las plantas desde la perspectiva de la regulación transcripcional, partiendo tanto de una ruta metabólica como es la vía de la síntesis de lignina, como de la regulación de la señalización por hormona, específicamente por brasinosteroides.

1.3. Justificación y objetivos de la investigación

1.3.1. Estudio de la regulación espacial de la familia de receptores de brasinoesteroides en Arabidopsis

Los brasinoesteroides (BRs) regulan múltiples procesos en la planta incluyendo la elongación celular, la división celular, la diferenciación vascular, la fotomorfogénesis, la senescencia y la respuesta a estrés (Clouse & Sasse 1998, Divi & Krishna 2009, Li & Chory 1999, Mandava 1988). Los mutantes deficientes en BRs presentan un fenotipo que incluye enanismo, hojas verdes oscuras y redondeadas, retraso en el desarrollo, reducción de la fertilidad y alteración de la estructura vascular (Clouse et al 1996, Schumacher & Chory 2000). El gen *Brassinosteroid Insensitive 1* (BRI1) codifica un componente clave del complejo receptor de BRs (Li & Chory 1997). Los mutantes *bri1* son enanos y muy similares a los mutantes de biosíntesis de BRs, con la diferencia de que no recuperan un fenotipo silvestre si se les aplica de manera exógena Brasinolido (BL) (Clouse et al 1996, Kauschmann et al 1996, Li & Chory 1997, Noguchi et al 1999).

En diversos cultivos de interés agronómico se encontró que los BRs pueden estimular el crecimiento vegetal, aumentar el rendimiento de la producción de biomasa, acelerar la maduración del fruto e incrementar la resistencia de la planta a las plagas y a factores de estrés abiótico como la salinidad, la sequía y las bajas temperaturas. (Mandava 1988, Sasse 1992, Fujioka y Sakurai 1997). Es necesario anotar también que la mayoría de la biomasa vegetal proviene del xilema, en cuya diferenciación intervienen activamente los brasinoesteroides, cumpliendo un papel no solo en el aumento de biomasa sino también en sus características. Además, recientemente han sido publicadas investigaciones que indican que los BRs pueden modular la composición y estructura de la pared secundaria (Hossain et al 2012) y que regulan positivamente el contenido de celulosa (Xie et al 2011).

Entender los mecanismos a través de los cuales las hormonas controlan el desarrollo del cambium y la formación del xilema, pueden ser empleado para realizar modificaciones empleando la ingeniería genética con el fin de optimizar el uso de la biomasa con fines comerciales (Ursache et al 2013). Considerando todo lo anterior

podemos afirmar que los brasinoesteroides cumplen funciones importantes en la planta, lo que se refleja en que puede tener diversos usos en el campo biotecnológico, tanto mediante su aplicación exógena como por la modificación de su vía de síntesis y percepción. La segunda parte de este proyecto que es acerca de la regulación transcripcional de dos miembros de la familia de receptores BRI1, los genes *BRL1* y *BRL3*, se efectuó bajo la dirección de la Dra. Ana Isabel Caño Delgado y para realizarla se utilizó una aproximación centrada en los genes (DNA-proteína), ya que se orientó a estudiar la región genómica reguladora de *BRL3* y *BRL1*.

El objetivo fundamental de este proyecto de investigación es:

- Identificar elementos relevantes en la regulación transcripcional de los receptores de esteroides *BRL1* y *BRL3*, involucrados en la diferenciación vascular.

1.3.2. Análisis del papel de los factores de transcripción *R2R3-MYB* del subgrupo 4 en la regulación de la síntesis de lignina

***R2R3-MYB* → Pared celular → Biomasa lignocelulósica**

La energía solar es uno de los principales recursos energéticos disponibles, ya que desde la perspectiva temporal humana es inagotable y además, presenta ventajas como el poder ser empleado de múltiples formas, siendo una de estas su uso para el proceso de fotosíntesis vegetal y posterior, almacenamiento de la energía en los polímeros de la pared secundaria (celulosa, hemicelulosa y lignina), que conforman la denominada biomasa lignocelulósica (Puigdomènech & Caparrós-Ruiz 2011).

La lignocelulosa es el tipo de biomasa terrestre más abundante y puede emplearse como un recurso renovable a través del aprovechamiento sustentable de bosques, plantaciones forestales, cultivos agrícolas en zonas de bajo potencial agronómico y residuos de la agricultura y la silvicultura. El uso de tierras de poco interés agrícola y el de residuos de otras actividades, tiene la finalidad de que la utilización de material vegetal como combustible no interfiera en la producción de alimentos y por el contrario, aumente la rentabilidad de los productores rurales.

La biomasa como fuente de energía presenta como ventajas ser un recurso renovable, geográficamente bien distribuido y con la potencialidad de ser ambientalmente favorable, en cuanto a la generación de gases de efecto invernadero (Rubin 2008). La energía contenida en la biomasa lignocelulósica puede ser utilizada de diferentes modos entre los cuales están su uso para la obtención de combustibles líquidos (Bioetanol). No obstante, para emplear la biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de biocombustibles líquidos es necesario reducir la complejidad de estos biopolímeros y transformarlos en moléculas más simples, para lo cual la lignina es una característica no deseada, ya que dificulta la descomposición de los polímeros de la pared celular para obtener los azúcares que la componen (Zhong & Ye 2009).

De igual forma, la presencia de lignina es no deseada para el uso de la biomasa para la alimentación animal. Por tanto, es relevante estudiar la regulación del desarrollo vascular y la síntesis de lignina, con miras a realizar mejoras de biotecnología, por lo cual el estudio de los represores de los genes encargados de la síntesis de monolignoles es el propósito de la primera parte de este proyecto.

La segunda parte de esta investigación que es sobre la regulación de la síntesis de lignina por parte de los TF *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro, se llevo a cabo bajo la dirección del doctor David Caparrós Ruiz y en ella se empleo principalmente un abordaje centrado en los TF (proteína-DNA).

Los objetivos principales de la investigación los presentamos a continuación:

- Identificar *in vivo* genes dianas de los miembros de la familia *R2R3-MYB* *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42* empleando ChIP (Inmunoprecipitación de Cromatina), con el fin de conocer su patrón de unión y su grado de solapamiento en cuanto a las regiones diana.
- Detectar probables módulos regulatorios en la ruta de la síntesis de lignina en los que esté implicado *ZmMYB11*.

**Capítulo 2. Estudio de la regulación espacial de la familia de receptores de
Brassinosteroides BRI1-like en *Arabidopsis thaliana***

Inteligencia es la habilidad de adaptarse a los cambios.

Stephen Hawking

2.1 Introducción

Los brassinoesteroides (BRs) son hormonas vegetales de naturaleza esteroidea que están involucradas en la regulación de múltiples procesos fisiológicos y propios del desarrollo de las plantas, como la elongación y división celular, la diferenciación vascular, la senescencia, el tiempo de floración, la fertilidad masculina, el desarrollo del polen, el tamaño de la semilla, la fotomorfogénesis, la diferenciación de órganos y la modulación de la respuesta de la planta a numerosas señales ambientales (Cano-Delgado et al 2010, Kim & Wang 2010). Estudios genéticos en *Arabidopsis* han llevado a la identificación de mutantes afectados en la síntesis de BRs o transducción de señales que también revelaron un papel esencial de los BRs en la elongación celular y la diferenciación (Fukuda 1997, Yamamoto et al 1997). En un rastreo genético fue identificado un mutante de pérdida de función insensible a BRs, que presentaba una mutación en el gen BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) y exhibía un fenotipo de enanismo, hojas verdes oscuras y redondeadas así como reducción de la dominancia apical y la fertilidad de la planta (Clouse 1996, Li & Chory 1997).

Mediante la técnica de paseo cromosómico se identificó que el gen *BRI1* codifica para una proteína receptora del tipo kinasa rica en secuencias repetidas de leucina (LRR-RLK, por las siglas en inglés de Leucine Rich Repeat Receptor-Like Kinase) que contiene tres dominios fundamentales; el dominio LRR extracelular (con un total de 25 regiones ricas en Leu), un segmento transmembrana y un dominio intracelular kinasa del tipo Ser/Thr (Clouse 1996, Li & Chory 1997). Los BRs son percibida en la superficie celular, donde se unen directamente al dominio extracelular de BRI1 (Wang et al 2001). Recientes estudios estructurales de BRI1 (LRR) y su complejo con brasinolido han confirmado el papel de BRI1 como un receptor de membrana plasmática de los BRs y proporcionado datos importantes en el reconocimiento de hormonas esteroideas por las plantas (Hothorn et al 2011, She et al 2011).

Se han identificado 233 receptores de tipo LRR-RLK en el genoma de *Arabidopsis* (Shiu & Bleecker 2001, Shiu & Bleecker 2003), pero sólo unos pocos se han estudiado a nivel funcional. Además, la mayoría de estos receptores no tienen un ligando conocido.

A diferencia, la evidencia genética y bioquímica ha demostrado que BRI1 es un componente esencial de un complejo receptor que une brassinólido (BL), el compuesto BR más activo (Altmann 1998, Fujioka & Yokota 2003, Noguchi et al 2000) y con más alta afinidad descrito hasta la fecha (Wang et al 2001).

Tras la unión directa de BL al dominio extracelular (Kinoshita et al 2005), BRI1 forma un heterodímero con el co-receptor BRI1 ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1/SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 3 (BAK1/SERK3), otra proteína LRR-RLK (Li et al 2002, Nam & Li 2002, Russinova et al 2004). La señal de BRs es modulada dentro de la célula mediante un mecanismo de desfosforilación, ocurriendo en presencia de BRs la de-fosforilación de los genes BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) y BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) (Gampala et al 2007, Li et al 2002, Mora-Garcia et al 2004, Wang et al 2002, Yin et al 2002). BES1 y BZR1 son dos miembros de la familia específica de factores de transcripción de planta basic-helix-loop-helix que actúan como homo o heterodímero (He et al 2005, Li et al 2009, Yin et al 2002, Yu et al 2008). Las proteínas BES1/BZR1 de-fosforiladas se acumulan en el núcleo, donde regulan la transcripción de genes regulados por BRs (Wang et al 2002, Yin et al 2002).

Análisis de elementos reguladores en cis efectuados a promotores regulados por BES1 y BZR1, han indicado que pueden unirse tanto a elementos de respuesta a BR (BRRE) como a E-box (Sun et al 2010, Yu et al 2011). La unión de BES1 a las cajas BRRE es mucho más fuerte que a las E-box, ya que BES1 necesita formar un heterodímero para poder unirse de manera eficiente a los elementos de E-box (Yin et al 2005). Los elementos BRRE están enriquecidos en su mayoría en genes reprimidos por BR, en contraste los elementos E-box están enriquecidos en su mayoría en genes inducidos por BR (Sun et al 2010, Yu et al 2011).

Aunque se consideró inicialmente que BZR1 actuaba como un represor transcripcional (He et al 2005), mientras que BES1 cumplía un papel como activador transcripcional (Yin et al 2005), recientes análisis a nivel genómico han mostrado claramente que ambos, pueden funcionar como activadores o represores (Sun et al 2010, Yu et al 2011). Dado que las cajas BRRE y E-box, están enriquecidas tanto en genes inducidos como reprimidos por BR, probablemente elementos adicionales en la secuencia del promotor y/o proteínas que interactúan con BES1 y BZR1, determinan si estos factores de transcripción activan o reprimen la expresión génica (Sun et al 2010, Ye et al 2011, Yu et al 2011).

Posteriormente fueron identificados tres homólogos de BRI1 en Arabidopsis, *BRL1*, *BRL2* y *BRL3* (Cano-Delgado et al 2004, Clay & Nelson 2002). *BRL2* corresponde al gen previamente identificado como Vascular Highway 1 (VH1), que parece ser necesario para mantener la diferenciación provascular en las hojas (Clay & Nelson 2002). La ausencia de *BRL2* causa defectos en la formación del patrón de venas, produce un anormal transporte vascular en las hojas y altera la respuesta a auxinas y brasinoesteroides (Ceserani et al 2009, Clay & Nelson 2002). A diferencia *BRL2*, *BRL1* y *BRL3* codifican para receptores localizados en la membrana que pueden unir con alta afinidad BL (Cano-Delgado et al 2004). Además, *BRL1* y *BRL3* fueron capaces de restaurar el fenotipo WT del mutante *bri* cuando fueron expresados bajo el promotor de BRI1, demostrando que ambos, *BRL1* y *BRL3*, son receptores funcionales (Cano-Delgado et al 2004, Zhou et al 2004). Recientemente se han realiza estudios estructurales que profundizan en el mecanismo de percepción de BRs por parte BRI1 y *BRL1* (She et al 2013).

Al contrario que BRI1, que parece expresarse de forma ubicua (Friedrichsen et al 2000), *BRL1* y *BRL3* presentan expresión enriquecida en el tejido vascular (Cano-Delgado et al 2004). En el análisis de plantas Arabidopsis transformadas con un fragmento del promotor de *BRL1* de 1,72 kb fusionado con el gen reportero GUS se observó expresión en la punta de la raíz en las células de la columela y en las iniciales vasculares en la zona meristemática, desde donde la expresión continua por el hipocótilo y las venas medias de los cotiledones. Para caracterizar *BRL3* fue utilizado

un fragmento de promotor de 750 pb fusionado al gen reportero GUS, que presento expresión en la raíz en dos filas de células del protofloema y en los cotiledones en las venas secundarias y la punta, en plántulas de *Arabidopsis* (Cano-Delgado et al 2004). Este patrón de expresión único de BRL1 y BRL3 sugiere que cumplen un papel en el desarrollo provascular de la planta a través de la señalización por BR. En contraste con el papel muy bien caracterizado de BRI1 en el desarrollo vascular, la función precisa de BRL1 y BRL3 todavía queda por identificar. Por otra parte, varios estudios indicaron que el gen BRI1 presenta una represión de la expresión después del tratamiento con BR (Goda et al 2002, Mussig et al 2002, Nemhauser et al 2006, Nemhauser et al 2004, Sun et al 2010, Vert et al 2005, Yu et al 2011) y resultados similares fueron obtenidos para BRL3 (Mussig et al 2002, Sun et al 2010, Vert et al 2005, Yu et al 2011).

En este estudio, hemos identificado elementos en cis de la región 5' no traducida de BRL3 (ProBRL3) y BRL1 (ProBRL1) y caracterizado sus patrones de expresión específicos en el tejido vascular. En el caso de ProBRL3 hemos sido capaces de demostrar que presenta un patrón de expresión espacial dosis dependiente de BR, mientras que la expresión de ProBRL1 parece ser independiente de BR. En general la expresión de ProBRL3 fue reprimida por la aplicación exógenamente de BL y sólo a niveles muy bajos se pudo detectar un aumento de la misma. La represión en la expresión ProBRL3 se debió principalmente a la unión de BES1 al elemento en cis BRRE (Lehner, Salazar-Henao, et al, 2013; Anexo 1).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material Vegetal

Para la realización de este proyecto se han utilizado plantas silvestres de *Arabidopsis* del ecotipo Columbia 0 (Col-0). Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura (18 - 22 °C), humedad (45 %) y fotoperiodo inductivo, el cual fue de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL). El proceso de esterilización de las semillas de *Arabidopsis* consistió en sumergirlas en lejía comercial (hipoclorito de sodio en solución acuosa) diluida al 35% en agua miliQ

durante 5 minutos y luego, en agua miliQ autoclavada por 5 minutos cuatro veces. Las semillas una vez esterilizadas se sembraron en placas de Petri con medio MS (Murashige & Skoog 1962). El medio MS se genero con 4,41 g/L MS+vitaminas (Duchefa), 20 g/L sacarosa y 0,5 g/L MES. Para generar medio sólido se añadieron 2 g/L gelrita. El pH se ajusto a 5,8 con KOH. El medio fue autoclavado por 20 minutos a 120 °C.

2.2.2 Métodos de transformación de Bacterias

2.2.2.1 Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

Para efectuar la transformación, se añadió entre 50 y 100 ng de DNA plasmídico o de producto de recombinación, a una alícuota de células competentes *E. Coli* de 50 µl (DH5α™-T1R, Invitrogen) y se procedió a incubar la mezcla por 30 minutos en hielo. La muestra se sumergió por exactamente 30 segundos en un baño con agua a 42 °C y luego se inserto en hielo. A continuación, se agregaron 500 µl de medio LB (Luria-Bertani-Medium) y se realizó una incubación durante 60 min a 37 °C en agitación. Finalmente, se sembraron 250 µl de cultivo en placas de LB (con el antibiótico correspondiente para la selección de transformantes) y se incubaron a 37°C, en posición invertida, durante la noche (12-16 h). El medio LB se preparo con 10 g/L triptona , 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L NaCl. El pH fue ajustado a 7.5 con NaOH. Para la preparación de medio solidó se adiciono 15 g/L de agar bacteriológico. Finalmente, el medio fue autoclavado por 20 minutos a 120 °C.

2.2.2.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

El método empleado fue primero añadir a 0,1 ml de suspensión de células transformables de *Agrobacterium tumefaciens* (Cepa C58-pGV2260, Deblaere et al 1985) previamente descongeladas en hielo, 1 o 2 µl del DNA plasmídico (1 a 100 ng), segundo, transferir la mezcla a una cubeta de electroporación y luego introducir ésta en el electroporador (BioRad Gene–Pulser), tercero, aplicar inmediatamente un pulso eléctrico de 1,7 volts y cuarto, agregar en un lugar estéril 1ml de YEB, trasladar la

mezcla a un tubo de 1,5 ml e incubar a 28 °C durante 2h. Por último, se sembraron en placas de Petri con YEB, suplementado con los antibióticos correspondientes. La incubación de las placas se realizo a 28 °C, en posición invertida, durante 48 h. El Medio YEB (Hanahan's SOC medium) se produjo con 5 g/l extracto de carne, 1 g/l extracto de levadura, 5 g/l peptona, 5 g/l sacarosa y 2 mM sulfato de magnesio. Seguidamente, se ajusto el pH 7,2 con NaOH/HCl. El medio fue autoclavado por 20 minutos a 120 °C.

2.2.3 Aislamiento de ADN Plasmídico

Para la extracción y purificación de ADN plasmídico se utilizo el kit comercial QIAprep®Miniprep (Qiagen), que se basa en la lisis alcalina y el uso de columnas con una matriz de intercambio iónico. El protocolo seguido fue el proporcionado por el fabricante.

2.2.4 Digestión de ADN con Enzimas de Restricción

La digestión con enzimas de restricción se empleo para la separación de fragmentos de ADN, con el fin de verificar la presencia de elementos dentro de una construcción. Una unidad de enzima es la cantidad necesaria de enzima para digerir 1 µg de ADN durante 1 hora a 37 °C, en el tampón apropiado. Las enzimas que han sido empleados durante este trabajo pertenecen a las casas comerciales Fermentas o Roche.

2.2.5 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La separación de fragmentos de ADN se llevo a cabo empleando electroforesis en gel de agarosa. La composición de los geles fue de TAE 1X y un porcentaje de agarosa del 1%. En el caso de que la electroforesis efectuadas para realizar extracción del ADN se elaboro el gel con un 0,8 % de agarosa. La solución se sometió a temperatura de ebullición para disolver la agarosa, posteriormente se enfrió hasta 55 °C y se le agrego 0,5 µl/ml de bromuro de etidio, para la visualización del los ácidos nucleídos por luz U.V. (254 nm). Las muestras de DNA para facilitar su vertimiento en gel se mezclaron con tampón de carga. La migración se realizo, normalmente, a un voltaje 80-100 V durante el tiempo necesario. El TAE 1X se preparo con 40 mM Tris Base, 20 mM HAc y

2 mM EDTA pH 8 y el tampón de carga 10X, se obtuvo con 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 50% glicerol, 10 mM EDTA pH 8.

2.2.6 Extracción de fragmentos de ADN desde gel de agarosa

Para la extracción de fragmentos de ADN de gel de agarosa, después de la migración, se cortaron las bandas esperadas con una cuchilla quirúrgica y se usó el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

2.2.7 Cuantificación de ácidos nucleídos

Los ácidos nucleídos se cuantificaron mediante espectrofotometría usando un NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer y el programa informático ND-1000 V3.1.0. (NanoDrop Technologies Inc.).

2.2.8 Clonación de fragmentos de ADN provenientes de Arabidopsis mediante recombinación

Para la generación de construcciones se empleó la tecnología Gateway de Invitrogen que se basa en la recombinación sitio-específica para la movilización de segmentos de ADN entre vectores. Con esta tecnología es posible transferir uno o más fragmentos de ADN hacia diferentes vectores de expresión al mismo tiempo mediante reacciones de recombinación. Específicamente, las reacciones llevadas a cabo son la PB y la LR. El proceso consistió en obtener los insertos empleando PCR y posteriormente, mediante recombinación PB con los pDONR 207 o 221 (Invitrogen) generar un clon de entrada, que a su vez es utilizado para una recombinación LR con los vectores de destino, para generar un clon de expresión. Los vectores plasmídicos utilizados fueron los pDONR 207 y 221 (Gateway, Invitrogen) y los vectores de destino pHGWS7 de fusión de promotor a los genes reporteros *GUS* y *GFP* (Karimi et al 2002) y pGWB635 de fusión de promotor al gen reportero *Firefly luciferase*. El pDONR se recombina con el producto de PCR para generar un vector de entrada (*Entry clone*) y el vector de destino (*Destination vector*) se usa para producir un clon de expresión. En la tabla 1 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados y en la tabla 2 se presentan las construcciones

elaboradas. Adicionalmente, se emplearon en esta investigación la construcción 35S::BES1-D:GFP, que estaba disponible en el laboratorio de la Dra. Ana I. Caño Delgado y se generó dentro del vector pB7m34GW (MultiSite Gateway, Invitrogen) y el vector PHTT672 (*Renilla luciferase*) que está basado en el vector pRL-null de Promega.

Cebador	Secuencia
JE pBRL1 AC 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctaaaatgctactttggc
JE pBRL1 5 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctcatcaaccaagtaac
JE pBRL1 6 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctgtgacctcacttgcc
JE pBRL1 7 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctactcctcaattacgcaa
JE D pBRL1 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctagcacttatctccttgc
JE C pBRL1 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctagacaacctctgttgc
JE pBRL1 3'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaagaaagctgggtcatttggcacagcaagag
JE pBRL3 0 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctcgtggggattagtgtgta
JE pBRL3 1 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctggaaaccgaactat
JE PBRL3 AC 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctgtctcatagttttgc
JE pBRL3 3 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctacacgcttccttat
JE pBRL3 4 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctcttgaacaagacttg
JEB pBRL3 5'	<u>ggggacaagtttg</u> tacaaaaaagcaggctgagagacaacactgtcg
JE pBRL3 3'	<u>ggggaccactttg</u> tacaagaaagctgggtcgttattagcccaca

Tabla 1. Secuencia de los cebador usados para la construcción de las delecciones del promotor de *BRL1* y de *BRL3*.

Las bases subrayadas corresponden a los sitios de recombinación attB.

Delección	Clon de entrada (nombre oligo)	Vector de expresión
5'D 27	JE pBRL1 (Caño-Delgado et l., 2004)	5'D 27 -1641 bp pHGWFS7
5'D 29	JE5	5'D 29 -978 bp pHGWFS7
5'D 30	JE6	5'D 30 -790 bp pHGWFS7
5'D 31	JE7	5'D 31 -625 bp pHGWFS7
5'D 32	JED	5'D 32 -479 bp pHGWFS7
5'D 34	JEC	5'D 34 -334 bp pHGWFS7
5'D 20	JE0	5'D 20 -1719 bp pHGWFS7
5'D 21	JE1	5'D 21 -1098 bp pHGWFS7
5'D 23	JE pBRL3 (Caño-Delgado et l., 2004)	5'D 23 -755 bp pHGWFS7
5'D 24	JE3	5'D 24 -498 bp pHGWFS7
5'D 25	JEB	5'D 25 -384 bp pHGWFS7
5'D 26	JE4	5'D 26 -218 bp pHGWFS7
5'D 20	JE0	5'D 20 -1719 bp pGWB635
5'D 21	JE1	5'D 21 -1098 bp pGWB635
5'D 25	JE B	5'D 25 -384 bp pGWB635

Tabla 2. Construcciones elaboradas en la investigación de material proveniente de *Arabidopsis*

2.2.9 Transformación de *Arabidopsis* por inmersión floral

La obtención de plantas de *Arabidopsis* transformadas con los distintos fragmentos de ADN de la región 5' de los genes *BRI1*, *BRL1* y *BRL3*, fusionados a los genes reporteros *GUS/GFP*, se efectuó por inmersión floral (Clough & Bent 1998). Las células de *Agrobacterium* previamente transformados con las construcciones recombinadas en el vector pHGWS7, se inocularon en 300 ml de medio YEB, que contenía los antibióticos espectomicina 50 ug/ml, rifampicina 100 ug/ml y carbenicilina 100 ug/ml y se incubaron a 28 °C durante 24 h. Seguidamente, se centrifugo el medio a 5000 rpm por 10 minutos, se elimino el sobrenadante y se resuspendieron las células de *Agrobacterium*, en 100 ml de un medio compuesto por sacarosa 5,55% (p/v), 10 mM MgCl₂, Siluet L-77 0,015% (v/v) y agua miliQ.

Posteriormente, tres macetas con seis plantas en periodo de floración (tres eventos independientes), se sumergieron en el cultivo resuspendido y se agitaron boca abajo, cada una durante un tiempo diferente, siendo estos de 30 segundos, 1 minuto y dos minutos, respectivamente, con un intervalo de 5 minutos y en tres ocasiones. Después, las plantas se ubicaron en posición horizontal dentro de bandejas y se cubrieron con plástico transparente para mantener la humedad durante 24 h. Tras ese periodo, a las plantas se les retiro el plástico y se regaron con agua.

2.2.10 Selección de plantas transgénicas

Para la selección de transformantes se sembraron las semillas T1, en medio MS suplementado con higromicina 30 µg/ml y se eligieron alrededor de 30 plantas resistentes al antibiótico por cada construcción. Para la identificación de líneas con la inserción de una sola copia del transgen, se llevo a cabo un test de segregación a las semillas de la progenie obtenida. Se sembraron alrededor de 48 semillas T2 por cada línea y el total de líneas independientes con probamente una sola copia del transgen que se genero para caracterizar cada construcción fue mínimo de cinco.

El análisis estadístico de la segregación de las plantas T2, se efectuó calculando el valor χ^2 con la corrección de Yates, cuya fórmula es la siguiente:

$$\chi^2_{\text{corr}} = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

Donde,

O= Frecuencias observadas

E=Frecuencias esperadas

Gl (grados de libertad)=1

Se utilizo el valor de 0.1 de probabilidad como el valor límite o crítico. Si el valor obtenido corresponde a una probabilidad mayor de 0,1, (Valor de Chi-cuadrado= 2,7) la desviación obtenida no se considero significativa y se atribuyo al azar, estableciendo que los datos se ajustan aceptablemente a la hipótesis. Esto significa que al menos hay una probabilidad de más del 10% de que la desviación obtenida entre los valores observados y esperados se deba al azar.

2.2.11 Tinción histológica: Localización histoquímica de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

La localización histoquímica de la actividad *GUS* (Jefferson et al 1987), se empleo para establecer el patrón de expresión del gen reportero *GUS* fusionado a los diferentes fragmentos de la región 5' de los genes de la familia BRI1, en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

Se empleo el siguiente procedimiento (Sieburth 1993): Se colocaron las plántulas en pocillos de un recipiente multititulación que contenía acetona al 90% a 4 °C durante 20 minutos, se efectuaron tres lavados con agua miliQ también a 4 °C y se deposito el tampón *GUS* (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónico [X-Gluc] 1mM; tampón fosfato 100 mM pH 7,0; ferricianuro potásico 0,5 mM y de ferrocianuro potásico 0,5 mM). A continuación, se sometieron las muestras a vacío durante 7 min dos veces, modificando la posición de la placa en la segunda ocasión. La incubación de la reacción se efectuó a 37 °C durante 12 horas. Luego se retiro la solución GUS, se reemplazo por agua miliQ y las plántulas se decoloraron mediante lavados con etanol al 70% hasta que toda la clorofila desapareciera. Con el fin de aumentar el nivel de detalle de las imágenes se efectuó en algunos casos la tinción mPS-PI de acuerdo al protocolo

descrito por Truernit et al 2008. Se realizó la caracterización inicial de entre 5 y 6 líneas de cada delección con el fin de elegir dos líneas representativas. Posteriormente, se efectuó una caracterización detallada de las dos líneas seleccionadas de cada delección en colaboración con el Dr. Reinhard Lehner.

2.2.12 Ensayos de transformación transiente de protoplastos provenientes de mesofilo de Arabidopsis.

Como material de partida fueron usadas hojas de plantas de Col 0 de Arabidopsis de 3 semanas crecidas en placas de MS 0,5. A continuación se siguió el protocolo sugerido por (Sheen 2002). En primer lugar, se procedió a cortar las hojas en trozos pequeños con cuchillas quirúrgicas y sobre una superficie de vidrio para no generar herida ya que reduce la eficiencia de obtención de protoplastos. Posteriormente se colocan los trozos de hojas en un erlenmeyer que debe contener la solución enzimática (1-1.5 % celulasa R10, 0.2-0.4% macerozima R10 (Yakult Honsha, Tokyo, Japan), 0.4 M manitol, 20 mM KCl, 20 mM MES, pH 5.7. Calentar la solución enzimática a 55 °C por 10 minutos y llevar a temperatura ambiente incubando en hielo antes de adicionar 10 mM CaCl₂ y 0.1% BSA) y se aplica vacío durante 15 minutos. El erlenmeyer con el material vegetal se pone en agitación a 50 rpm, durante 2 horas en oscuridad, luego para liberar los protoplastos se aumentan las revoluciones por minuto durante 30 minutos más. Los protoplastos son filtrados a través de un filtro de 35µm de poro y lavados con 10 ml de solución W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES (pH 5.7)) para transfección con PEG. A continuación se centrifugan los tubos a 100 x g por 2 minutos y se remueve el sobrenadante cuidadosamente para no tocar el pellet (protoplastos) dejando 1 ml de sobrenadante. Se lavan con 10 ml de solución W5, se resuspenden delicadamente, de nuevo se llevan a la centrifuga a 100 x g por 2 minutos y se repite el lavado una vez más, mantener en 1 ml y contar los protoplastos para resuspenderlos en solución MMg (0.4 M manitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES (pH 5.7)) a una concentración final de 1-2 x 10⁵/ml. Todos los pasos de la transformación de los protoplastos se realizan a 23 °C y usando PEG (40%, v/v: 4 g de PEG4000 (Fluka, #81240) , 3 ml H₂O, 2.5 ml de 0.8 M manitol y 1 ml de CaCl₂), como se presenta a continuación: Adicionar 10 µl de DNA (10-20 µg de DNA plasmídico), añadir 100 µl de

protoplastos a tubos eppendorf de microcentrifuga (2×10^4 de protoplastos), mezclar bien y agregar 110 μ l de solución PEG/Ca, mezclar bien e incubar a 23 °C durante 30 minutos. Posteriormente, diluir con 440 μ l de solución W5 y mezclar bien cuidadosamente, centrifugar a 300 x g por 1 minuto y remover el PEG, dejar 100 μ l aproximadamente. Resuspender los protoplastos cuidadosamente con 1 ml de solución W5 y por último, incubar las muestras durante 14 horas a temperatura ambiente, en oscuridad y en posición horizontal.

2.2.13 Ensayos reporteros de luciferasa

Se emplearon protoplastos de *Arabidopsis* transfectados con diferentes regiones del promotor de *BRL3* fusionadas al gen reportero *Firefly luciferase* y con las construcciones efectoras 35S::bes1-D:GFP y 35S::GFP (Control). Además, en las transfecciones se inserto el vector 35S::Renilla con el propósito de emplear la actividad *Renilla luciferase* para normalizar los resultados. Los ensayos se efectuaron utilizando el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison, WI). Los protoplastos transformados se almacenaron entre 18-22 horas. Posteriormente se analizo la eficiencia de transformación cuantificando el numero de protoplastos transformados y no transformados, utilizando un microscopia confocal y la detección de la proteína GFP. Se efectuó una centrifugación a 2200 rpm por 2 minutos, se descarto el sobrenadante y se adicionaron 80 μ l de *Passive lysis buffer*. A continuación, se practico un vortex fuerte durante 10 minutos a temperatura ambiente y una centrifugación a 10000 rpm por 2 minutos a 4 °C. Finalmente, el ensayo se realizo siguiendo el protocolo del fabricante y para la medición de la bioluminiscencia se utilizo el luminómetro Centro LB 960 (Berthold).

1.2.14 Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para los experimentos de ChIP se empleo como material de partida plantas transgénicas 35S::BES1-D:GFP y Col-0, cultivadas en medio ½ MS (12 horas luz/12 horas oscuridad) durante 6 días. Las plántulas fueron fijadas con 1% de formaldehido y los núcleos fueron extraídos como describieron Deal & Henikoff 2011. Las inmunoprecipitaciones se efectuaron utilizando anticuerpos anti-GFP de acuerdo a

Gendrel et al 2005. La detección de productos de PCR se realizó utilizando Absolute qPCR SYBR Green mix (Thermo scientific) y un termociclador BioRad. Se realizaron cuatro réplicas biológicas diferentes para cada región de interés. Los experimentos de CHIP efectuados en Arabidopsis fueron efectuados en colaboración con el estudiante de doctorado Josep Vilarrasa. Los oligos empleandos se muestran en la tabla3.

Nombre cebador	Secuencia cebador	Observaciones
BRL3rg1F	GAAGCGTGAGACGTTCGTG	Zona 1
BRL3gr1R	AACGTCCCAAAGCAAATCAT	Zona 1
BRL3rg2F	TCTCCCCTAACCTGTAAACTCA	Zona 2
BRL3rg2R	CCCACCTAATAGTATTCGTGCAA	Zona 2
3'UTR_BRL3F	ATTTTCGTCCTATTTTGGTGTT	Control negativo
3'UTR_BRL3R	TCAAGAAATTAAGTAAAAACCCTTCA	Control negativo
UBC30F	CAAATCCAAAACCCTAGAAACCGAA	Control negativo
UBC30R	AACGACGAAGATCAAGAACTGGGAA	Control negativo

Tabla 3. Secuencia de los cebadores usados para realizar CHIP qPCR empleando inmunoprecipitaciones de BES1

F' y R': Significa que el cebador está ubicado en la cadena directa o reversa, respectivamente.

1.2.15 Adquisición de imágenes de fluorescencia mediante Microscopia Confocal

La caracterización de los patrones de expresión se efectuó empleando el Microscopio Confocal FV 1000 Olympus del Servicio de Imágenes del CRAG.

2.2.16 Análisis informáticos y procesamiento de datos

2.2.16.1 Identificación de secuencias conservadas en cis

Para la identificación de patrones en secuencias de ADN, se empleo el programa MEME (version 4.8.1) que analiza las secuencias por similitud entre ellas y produce una descripción (motivo) de cada uno de los motivos identificados (Bailey & Elkan 1994) (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>). Este algoritmo representa los motivos como la probabilidad de cada letra dependiendo de la posición en matrices que describen la probabilidad de cada posible letra en cada posición en el patrón. Los parámetros empleados fueron cualquier número de repeticiones, tamaño mínimo del motivo mayor o igual que 6 y tamaño máximo del motivo menor o igual que 9.

2.2.16.2 Búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción

Para la identificación de elementos reguladores se utilizó el programa dna-pattern que escanea secuencias en la búsqueda de patrones predeterminados (Thomas-Chollier et al 2008). (<http://rsat.ulb.ac.be/>).

2.2.16.3 Procesamiento de datos de luciferasa

Los ensayos fueron normalizados mediante la división de la actividad del gen reportero *Firefly* (F) por la actividad del gen control *Renilla* (R), generando el ratio F/R. Se realizaron tres replicas técnicas y tres replicas biológicas. Para calcular un valor normalizado de *fold change* entre grupos, en este caso entre muestra control (fragmento de mayor tamaño de la región 5' del gen) y muestras tratadas (fragmentos truncados del promotor o muestras co-transfectadas con un efector), se empleó la siguiente ecuación (Schagat et al 2007): $\Delta \text{Fold Activity} = \text{Promedio (F/R) muestra tratada} / \text{Promedio (F/R) muestra control}$.

2.3. Resultados

2.3.1 Análisis de expresión de la región 5' reguladora de BRL3 en el tejido vascular de Arabidopsis.

Estudios previos han demostrado que la región -755 bp con respecto al sitio de inicio de traducción de AtBRL3, fue suficiente para dirigir la expresión del gen reportero *GUS* (ProBRL3 -755::GUS), al tejido vascular en líneas transgénicas de Arabidopsis (Cano-Delgado et al 2004). Considerando que en la raíz ProBRL3 -755::GUS presenta actividad *GUS* en dos filas de células del protofloema y que ha sido mostrado que es necesario un equilibrio en la señalización por BRs para mantener el tamaño del meristemo y en general crecimiento de las raíces (Gonzalez-Garcia et al 2011), se propuso investigar si los BRs regulaban el patrón de expresión del receptor BRL3, configurando un mecanismo de autorregulación. Para tal fin se realizaron una serie de deleciones de la región 5' de *BRL3* que fueron fusionadas a los gen reporteros en tandem *GFP* y *GUS* y se busco establecer que elementos reguladores estaban involucrados en la respuesta a BRs, la expresión vascular y si había una relación entre la regulación por BRs y el patrón espacial.

Para identificar elementos en cis importantes es la regulación de *BRL3*, se efectuó un análisis *in silico* de la secuencia de ADN de su región 5', prestando especial atención a los sitios de unión de factores de transcripción implicados en la respuesta a BRs, BREE y E-box (Figura 4. A). Posteriormente, se produjeron seis líneas transgénicas independientes de Arabidopsis T3 homocigotas de cada una de las siguientes deleciones de la región 5' de *BRL3* nombradas de acuerdo a su distancia al sitio de inicio de traducción: -1719 pb (ProBRL3 -1719::GUS), -1098 bp (ProBRL3 -1098::GUS), -755 pb (ProBRL3 -755::GUS), -498 pb (ProBRL3 -498::GUS), -384 pb (ProBRL3 -384::GUS) y -218 pb (ProBRL3 -218::GUS) y se efectuó un análisis inicial de los patrones de actividad *GUS* en plántulas de 6 días que permitió seleccionar dos líneas representativas de cada uno de los fragmentos de promotor, a las cuales se les efectuó una caracterización detallada de la expresión *GUS* (Figura 4. A y B).

La familia de receptores de Brassinosteroides BRI1-like

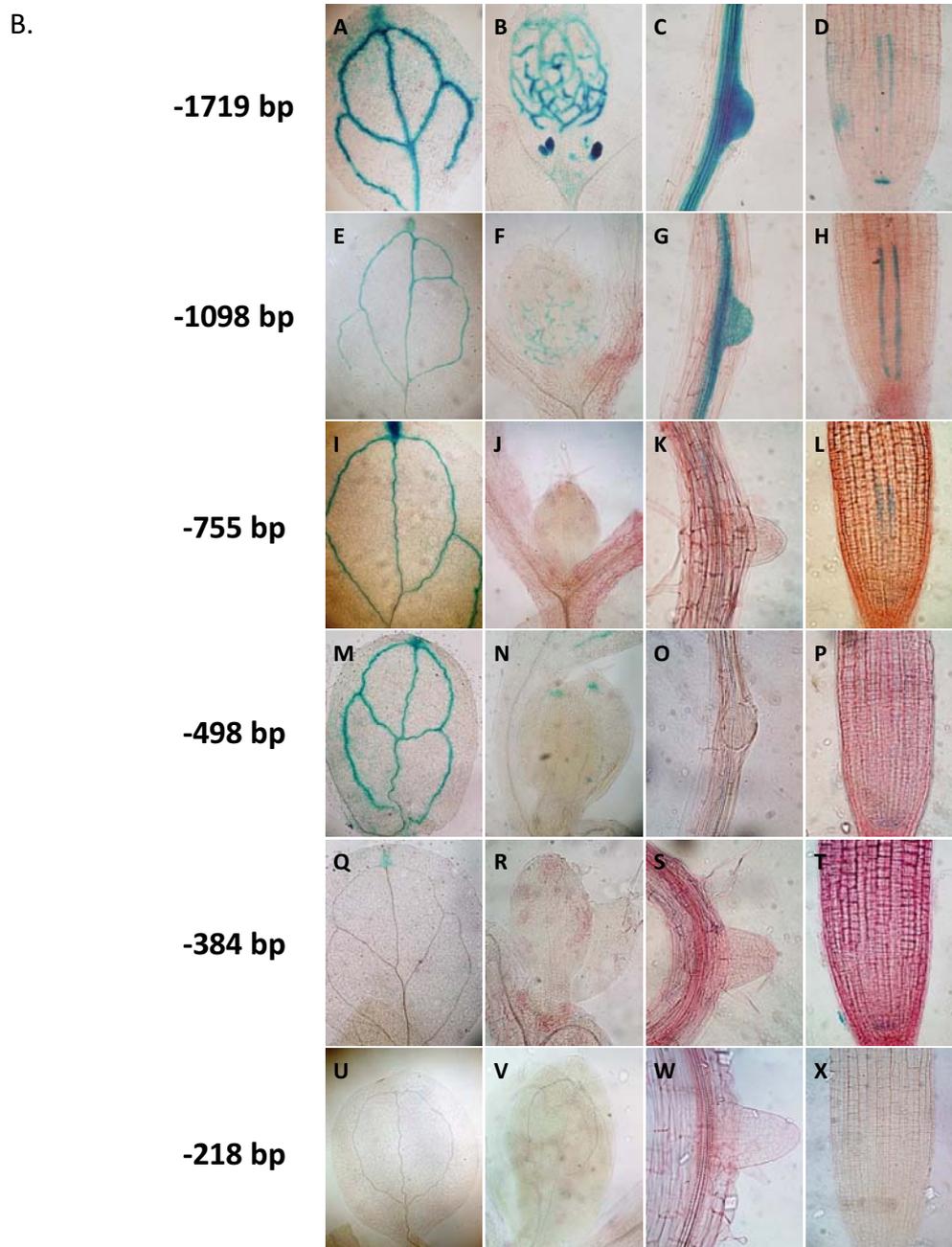
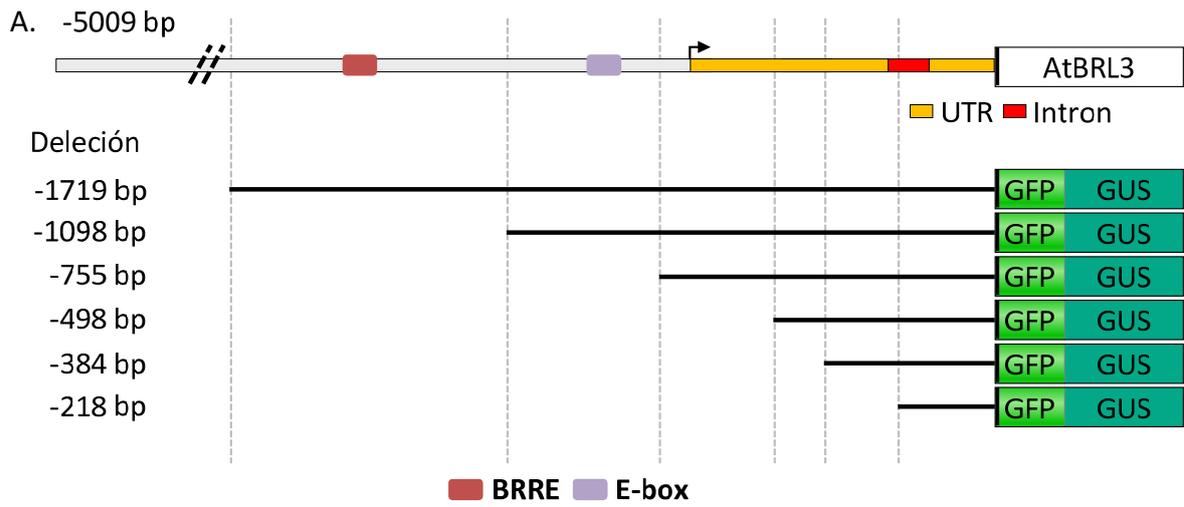


Figura 4. Estructura de la región 5' de *BRL3* y análisis mediante delección de su patrón de expresión.

A. Diagrama esquemático de la región 5' de *BRL3*. En la parte superior se representa el sitio de inicio de transcripción con una flecha y se marca con color naranja y rojo, el área correspondiente a la UTR y al Intrón, respectivamente. Así mismo, se indica la presencia de cajas asociadas con respuesta a BRs, BREE (-1441 bp a -1436 bp, con respecto al sitio de inicio de traducción) y E-box (-892 bp a -887 bp, con respecto al sitio de inicio de traducción). Los asteriscos señalan que los elementos en cis se encuentran en la cadena antisentido (3'-5') y su ausencia que se ubican en la cadena codificante (5'-3'). En la parte inferior se muestran las sucesivas delecciones efectuadas a la región 5' de *BRL3* y su fusión con los genes reporteros *GFP* y *GUS*. B. Patrón de expresión de las delecciones realizadas a la región aguas arriba de *BRL3*. Se presenta un ensayo histoquímico de actividad *GUS* de plantas transformadas con las construcciones ProBRL3: -1719::GUS (B. A-D), -1098::GUS (B. E-H), -755::GUS (B. I-L), -498::GUS (B. M-P), -384::GUS (B. Q-T) y -218::GUS (B. U-X), efectuado en cotiledones, meristemo apical del tallo (SAM), raíces laterales y zona de diferenciación y meristemática de la raíz. El análisis de dos líneas homocigotas T3 de plántulas de 6 días que contienen la misma construcción, muestran patrones idénticos de tinción *GUS*. Las muestras fueron incubadas en la solución de tinción por 16 horas. Las muestras fueron incubadas en la solución de tinción por 16 horas. → La línea con mayor longitud estudiada (-1719::GUS), posee actividad *GUS* en los cotiledones en las venas y las puntas, en el SAM, en las regiones donde emergen las raíces laterales, en la zona de diferenciación y en dos filas celulares del protofloema y el QC, en la zona meristemática. Al remover la región 621 pb contigua (-1098::GUS), se elimina la expresión del gen reportero *GUS* en el SAM y en el QC. En la siguiente delección (-755::GUS), se observa *GUS* en dos filas celulares del protofloema, pero de un modo más reducido en comparación con -1719::GUS y -1098::GUS y no se detecta actividad *GUS* en las raíces laterales y la zona de diferenciación. En las delecciones -498::GUS y -384::GUS, se puede identificar expresión *GUS* únicamente en las venas y las puntas de los cotiledones o puntas del cotiledón, correspondientemente. En plantas transgénicas generadas con la delección más corta (-218::GUS), la expresión fue completamente abolida.

La construcción ProBRL3 -1719::GUS correspondiente a la secuencia de ADN más larga muestra actividad *GUS* en los cotiledones en las venas y la punta, el meristemo apical del tallo, la región donde las raíces laterales emergen, la zona de diferenciación y la zona meristemática en dos filas de células del protofloema y el centro quiescente (QC) (Figure 4. B. A-D). En cambio, en la delección ProBRL3 -1098::GUS se pierde la tinción *GUS* en el meristemo apical del tallo y el QC (Figure 4. B. E-H). En la línea ProBRL3 -755 bp se detecta expresión *GUS* en los cotiledones en el tejido vascular y la punta, la zona de diferenciación y de modo más restringido en dos filas de células del protofloema (Figure 4. B. I-L). Por su parte, la delección ProBRL3 -498 bp presenta actividad *GUS* únicamente en los cotiledones en las venas y la punta (Figure 4. B. M-P). Finalmente, en las construcciones -384 bp y -218 bp desaparece por completo la expresión del gen reportero (Figure 4. B. Q-T y U-X, respectivamente).

Estos resultados muestran que la región mínima necesaria para conducir la expresión del gen reportero *GUS* de forma extendida es la de ProBRL3 -755 bp, sin embargo, este patrón no es idéntico al generado por la construcción de mayor longitud ProBRL3 -

1719 bp. De acuerdo a estos resultados, se propone que la región comprendida entre -1719 bp y -1098 bp tiene elementos que regulan la expresión al meristemo apical del tallo y al QC, la existente entre -1098 bp y -755 bp, posee elementos que dirigen la expresión al área donde emergen las raíces laterales, la incluida entre -755 bp y -498 bp, es requerida para la expresión en el meristemo de la raíz y la localizada entre las delecciones -498 bp y -384 bp, para actividad en los cotiledones en las venas y la punta. Estas dos últimas regiones se encuentran localizadas parcialmente en la UTR, sugiriendo la presencia de elementos reguladores de la transcripción de BRL3 relevantes en dicha zona.

De igual manera, se llevo a cabo la caracterización del promotor de BRL1 con el fin de efectuar un análisis comparativo tanto de los patrones de expresión en el sistema vascular como de la respuesta a estímulos de BRL3 y BRL1. Para identificar elementos en cis involucrados en la regulación de *BRL1*, se realizo un análisis *in silico* de su región 5' y se generaron una serie de delecciones de ProBRL1 fusionadas a los genes reporteros *GFP/GUS* y nombradas de acuerdo a su distancia al sitio de inicio de traducción -1641 pb (ProBRL1 -1641::GUS), -978 pb (ProBRL1 -978::GUS), -790 pb (ProBRL1 -790::GUS), -479 pb (ProBRL1 -479::GUS) y -334 pb (ProBRL1 -334::GUS) (Figura 5. A). Las construcciones mencionadas se transformaron plantas WT de *Arabidopsis*, con el propósito de obtener 6 líneas T3 homocigotas independientes para hacer una caracterización inicial de los patrones de expresión. La caracterización se realizo en plántulas de 6 días de dos líneas independientes representativas (Figura 5. B). La construcción más larga estudiada de ProBRL1 (-1.641::GUS), presento expresión del gen reportero *GUS* en los cotiledones en las venas y la punta, en el SAM, en la punta de las raíces laterales y en la zona de diferenciación y no se detecto expresión en el meristemo de la raíz (Figura 5. B. A-D). La eliminación de 663 pb (-978::GUS) o 851 pb (-790::GUS), ocasiono la perdida de expresión *GUS* en el SAM así como en la punta de las raíces laterales, mientras que en las venas y la punta de la cotiledones se continuo detectando tinción *GUS* (Figura 5. B. E-H y I-L). La tinción *GUS* fue indetectable en plantas portadoras de la delecciones del promotor ProBRL1 inferiores a -479 bp, sugiriendo que la región entre -790 bp y -479 pb, contiene elementos en cis fundamentales para la expresión de BRL1 (Figura 5. B. M-P y Q-T).

La familia de receptores de Brassinosteroides BRI1-like

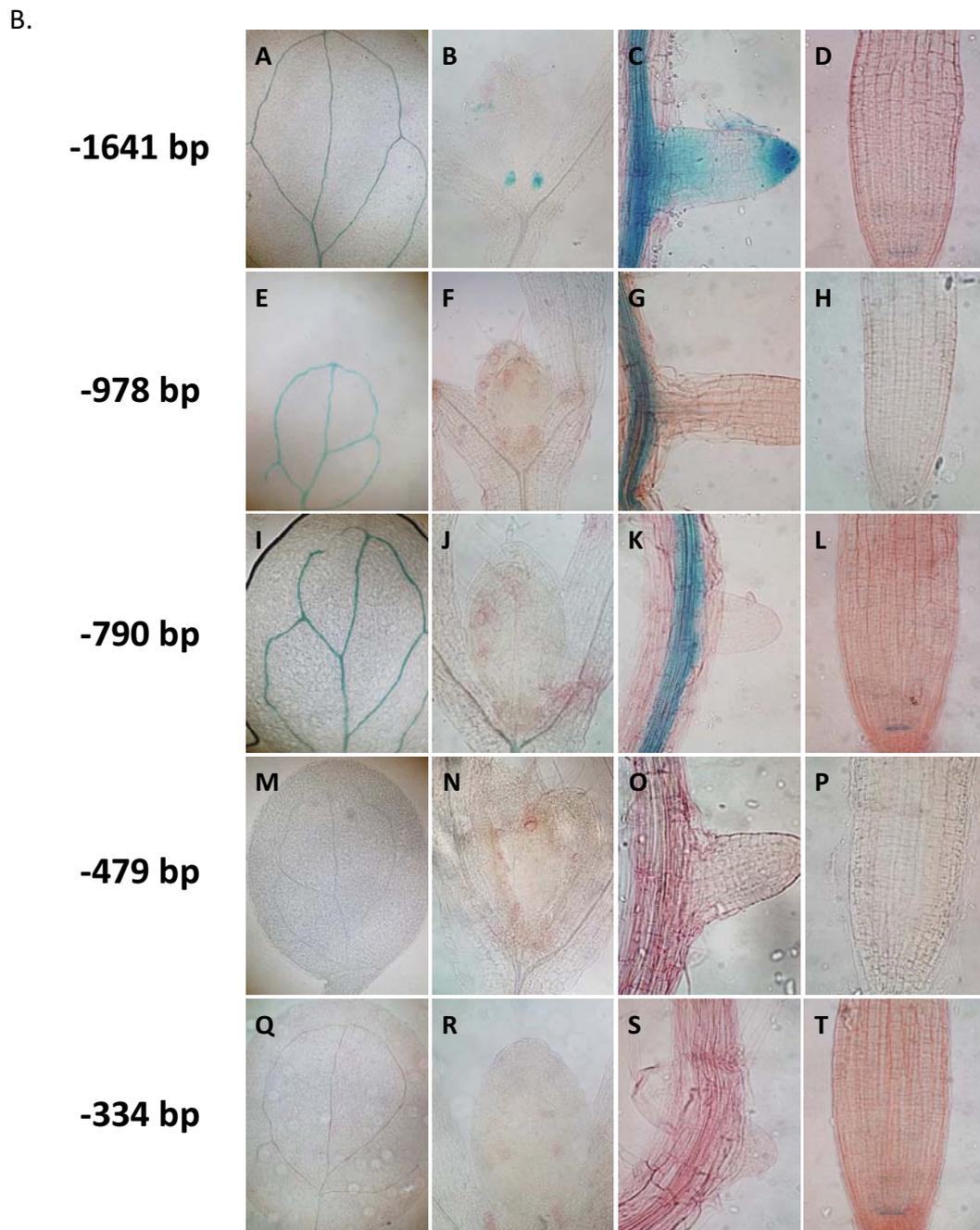
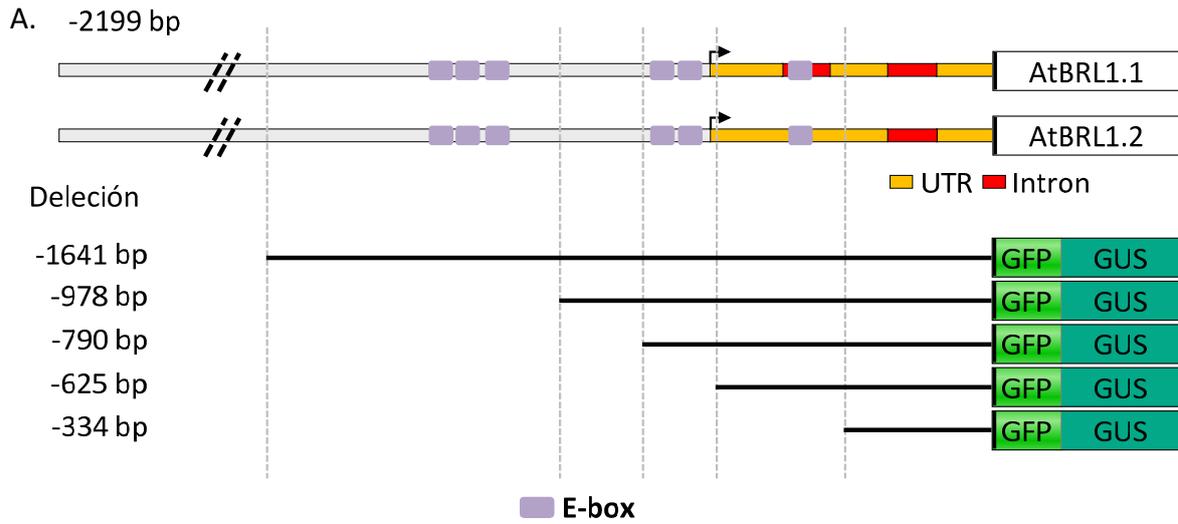


Figura 5. Estructura de la región 5' de BRL1 y análisis mediante delección de su patrón de expresión.

A. Diagrama esquemático de la región 5' de *BRL1*. En la parte superior se representa el sitio de inicio de transcripción con una flecha y se marca con color naranja y rojo, el área correspondiente a la UTR y al Intrón, respectivamente, de las dos isoformas identificadas. Así mismo, se indica la presencia de cajas asociadas con respuesta a BRs, E-box (-1230 bp a -1225 bp, -1184 bp a -1179 bp, 1167 bp a 1162 bp, 779 bp a 774 bp, -717 bp a -712 bp y -443 bp a -438 bp, con respecto al sitio de inicio de traducción). Los asteriscos señalan que los elementos en cis se encuentran en la cadena antisentido (3'-5') y su ausencia que se ubican en la cadena codificante (5'-3'). En la parte inferior se muestran las sucesivas delecciones efectuadas a la región 5' de *BRL1* y su fusión con los genes reporteros *GFP* y *GUS*. B. Patrón de expresión de las delecciones realizadas a la región aguas arriba de *BRL1*. Se presenta un ensayo histoquímico de actividad *GUS* de plantas transformadas con las construcciones de ProBRL1: -1641::GUS (B. A-D), -978::GUS (B. E-H), -790::GUS (B. I-L), -625::GUS (B. M-P) y -344::GUS (B. Q-T), efectuado en cotiledones, meristemo apical del tallo, raíces laterales y zona de diferenciación y meristemática de la raíz. El análisis de dos líneas homocigotas T3 de plántulas de 6 días que contienen la misma construcción, muestran patrones idénticos de tinción *GUS*. Las muestras fueron incubadas en la solución de tinción por 16 horas. → La línea con mayor longitud estudiada (-1642::GUS), posee actividad *GUS* en los cotiledones en las venas y las puntas, en la parte inicial del SAM, en la punta de las raíces laterales y en la zona de la diferenciación. (B. A-C), sin embargo no presenta expresión *GUS* en la zona meristemática de la raíz (B. D). La eliminación de 663 pb (-978::GUS) o 851 pb (-790::GUS), genero la pérdida completa de actividad *GUS* en el SAM, así como en la punta de la raíz de las raíces laterales, mientras que se continuo identificando expresión *GUS* en las venas y la punta de la cotiledones (B. E-H y I-L). Las plantas transgénicas producidas con delecciones con una longitud menor a -790 bp, la actividad *GUS* fue completamente suprimida, lo que sugiere que la región entre -790 pb y -479 pb contiene elementos cis esenciales para dirigir la expresión (B. M-P y Q-T).

2.3.2 Regulación por BL de la expresión vascular de BRL3

Se ha descrito previamente que *BRL3* es una diana candidata de BES1 cuya expresión es reprimida por BRs (Yu et al 2011) y también, que es una diana candidata de BZR1 reprimida en presencia de BRs (Sun et al., 2010). Para investigar el efecto de los BRs en la expresión de *BRL3* y los probables elemento en cis involucrados, fueron tratadas con 4 nM BL plántulas de 6 días de todas las versiones truncadas de ProBRL3 durante 48 horas. Los análisis histoquímicos de ProBRL3 -1719:GUS después del tratamiento continuo con 4 nM BL, mostraron que la expresión del gen reportero se localizaba en los cotiledones en el tejido vascular y en la punta, en el meristemo apical, en las raíces laterales, en la zona de diferenciación y en el QC (Figure 6. A-D), siendo este patrón similar al del control sin tratar (Figure 4. B. A-D). Sin embargo, las líneas ProBRL3 -1719::GUS tratadas con BL muestran una expresión difusa en la estela y una reducción en la expresión en las dos filas de células del protofloema (Figure 6. D) a diferencia de lo observado en las líneas no tratadas (Figure 4. B. D), indicando que la expresión de *BRL3* es regulada por BRs. En las delecciones de ProBRL3 -1.098 bp, -755 bp, -498 bp y -384 bp, que carecen del elemento BRRE en la posición -1441 pb, no se observaron fuertes cambios en el dominio de expresión del gen reportero en las muestras que han

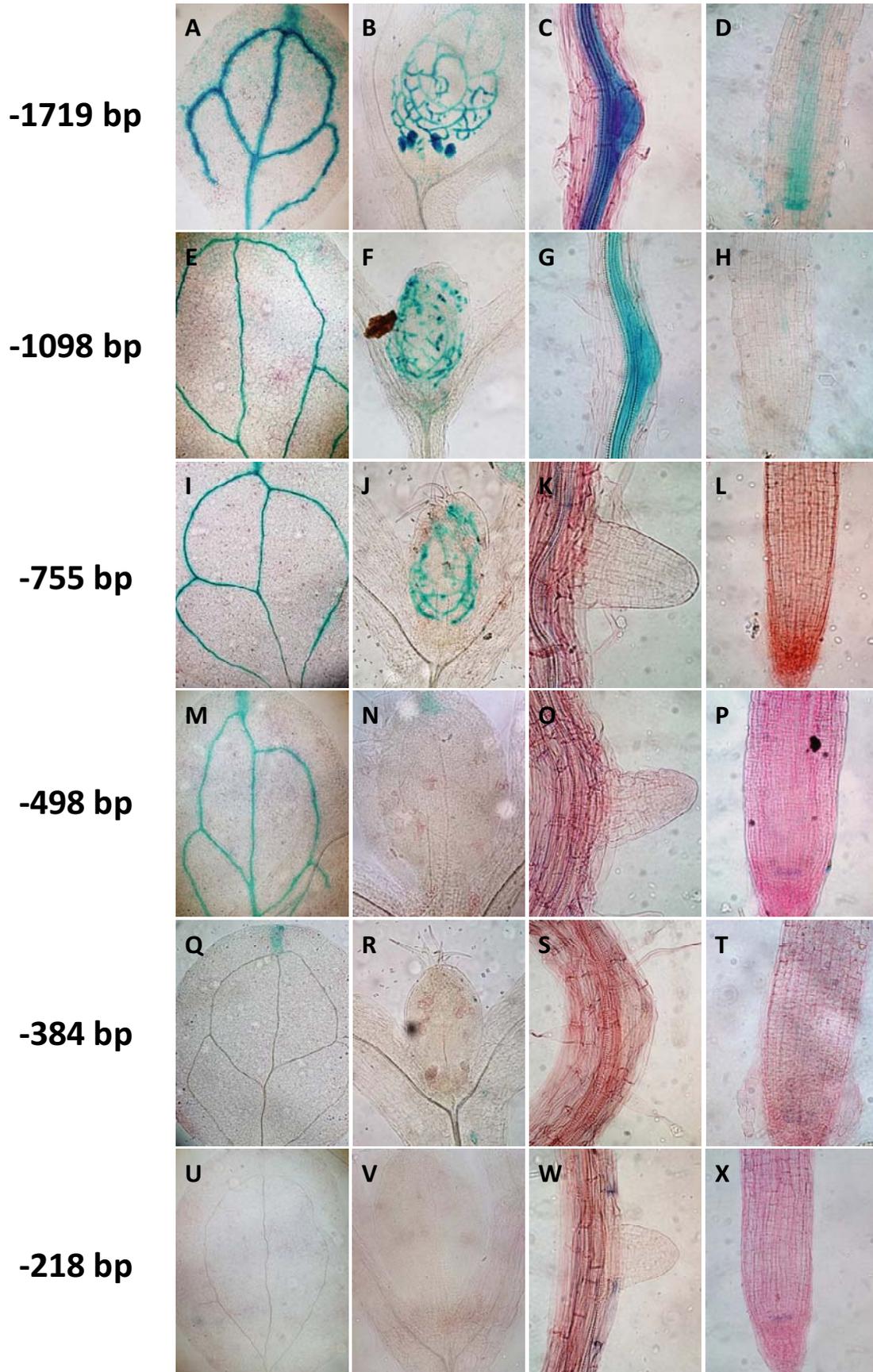


Figura 6. Efecto de los BRs en la regulación transcripcional de *BRL3*.

Se presenta un ensayo histoquímico de actividad *GUS* de plantas transformadas con las construcciones de ProBRL3 -1719::GUS (A-D), -1098::GUS (E-H), -755::GUS (I-L), -498::GUS (M-P), -384::GUS (Q-T) y -218::GUS (U-X), efectuado en cotiledones, SAM, raíces laterales y zona de diferenciación y meristemática de la raíz. El análisis de dos líneas homocigotas T3 de plántulas de 6 días que contienen la misma construcción, muestran patrones idénticos de tinción *GUS*. Las muestras fueron tratadas con 4 nM de BL por 48 horas e incubadas en la solución de tinción por 16 horas. → La línea -1719::GUS, muestra actividad *GUS* en los cotiledones en las venas y las puntas, en el SAM, en las raíces laterales, en la zona de diferenciación y en el QC. En cambio con las líneas no tratadas -1719::GUS, mostro un patrón de expresión difuso en la estela, mientras que no se observó expresión en las dos filas de células del protofloema. En las líneas -1098::GUS y -755::GUS, la expresión *GUS* fue similar a las líneas no tratadas, detectándose en los cotiledones en las venas y las puntas, en las raíces laterales y la zona de diferenciación. Sin embargo, en comparación con la línea -1719::GUS, estas dos líneas mostraron expresión *GUS* en las dos filas del protofloema, aunque la expresión fue mucho más restringida en relación a las no tratadas. El patrón de expresión de las líneas truncadas -498::GUS, 384::GUS y -218::GUS, no presento cambios con relación a las líneas no tratadas.

sido tratadas con BL en comparación con las que no (Figura 6. E-X). Pero cabe anotar que la expresión del gen reportero en las dos filas del protofloema de las construcciones ProBRL3 -1098 bp y -755 bp, se redujo espacialmente (Figura 6. H y L). Estos resultados en conjunto avalan la idea de que los BRs son capaces de reprimir la expresión de *BRL3* y que la región ProBRL3 entre -1719 y -1098, presenta elementos reguladores en cis necesarios para la respuesta a BRs.

Dado que *BRL1* y *BRL3* son receptores de BRs homólogos y tienen un patrón de expresión vascular (Cano-Delgado et al 2004), se podría suponer que la expresión de *BRL1* también está regulada por BRs. En cambio, en el caso de *BRL1* no se observaron cambios en la expresión de ProBRL1::GUS en las líneas tratados con BL (Figura 7) en comparación con las mismas líneas no tratadas (Figura 5), lo que sugiere que los BRs no son importantes para la regulación de *BRL1*. Esto es acorde con un trabajo publicado anteriormente que estableció que *BRL1* era una putativa diana de BZR1 que no estaba regulada por BRs (Sun et al 2010).

2.3.3 La expresión de *BRL3* es modulada de modo dosis dependiente por BRs

Inicialmente con el fin de caracterizar detalladamente el patrón de expresión de *BRL3* en la zona meristemática de la raíz y el efecto de los BRs en el mismo, a algunas deleciones de ProBRL3::GUS se les efectuó la tinción mPS-PI (Truernit et al 2008).

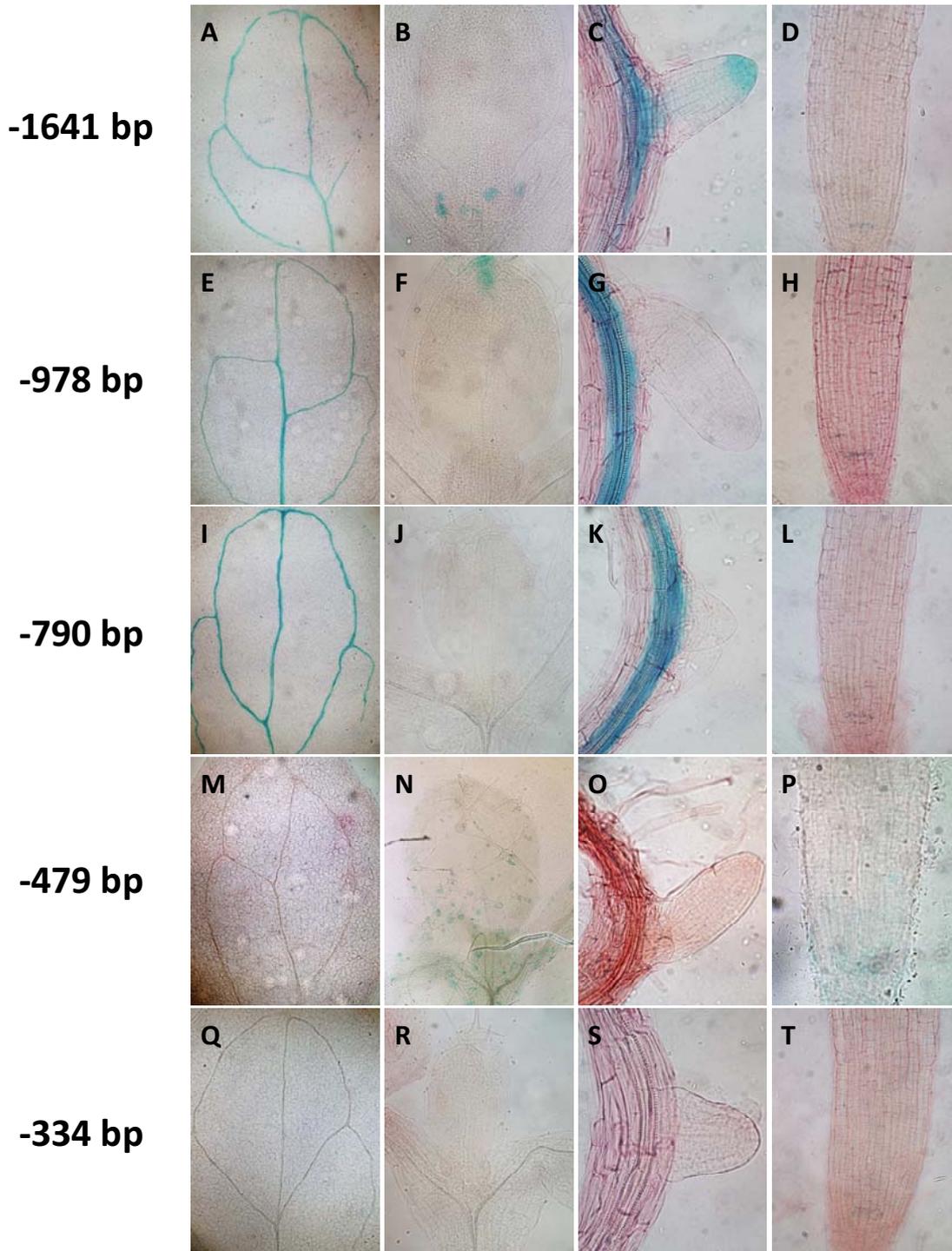


Figura 7. Efecto de los BRs en la regulación transcripcional de *BRL1*.

Se presenta un ensayo histoquímico de actividad GUS de plantas transformadas con las construcciones de ProBRL1 -1641::GUS (A-D), -978::GUS (E-H), -790::GUS (I-L), -625::GUS (M-P) y -344::GUS (Q-T), efectuado en cotilodones, SAM, raíces laterales y zona de diferenciación y meristemática de la raíz. El análisis de dos líneas homocigotas T3 de plántulas de 6 días que contienen la misma construcción, muestran patrones idénticos de tinción GUS. Las muestras fueron tratadas con 4 nM de BL por 48 horas e incubadas en la solución de tinción por 16 horas. → La línea -1642::GUS, muestra actividad GUS en los cotilodones en las venas y las puntas, en la parte inicial del SAM, en la punta de las raíces laterales y en la zona de la diferenciación (A-C) y no presenta expresión GUS en la zona meristemática de la raíz (D). Este patrón permaneció invariable entre las muestras tratadas y sin tratar, igual que en las otras delecciones efectuadas.

En la construcción de mayor longitud analizada de ProBRL3 que es de -1719 bp, el gen reportero *GUS* se observó en la transición desde el protofloema indiferenciado hasta el diferenciado en la capa de células del protofloema y en el QC (Figura 8. A-C). Un patrón de expresión similar en la capa de células del protofloema fue observado en las delecciones ProBRL3 -1098 bp y -755 bp, pero en esta última la señal fue más débil (Figura 8. F y H) y como era de esperarse no se detectó tinción *GUS* en el QC.

Después del tratamiento con 4 nM BL durante 48 horas, la actividad del gen *GUS* de la línea ProBRL3 -1719 bp fue desplazada de la capa de células del protofloema hacia la estela y el QC, donde se detecta *GUS* (Figura 8. D-E). En la transición al protofloema diferenciado, el gen *GUS* fue indetectable. El tratamiento con BL de las líneas ProBRL3 -1098 bp y -755 bp que carecen de la caja BRRE en la posición -1441 bp, no generó ninguna alteración del patrón de expresión *GUS* excepto como ya se había mencionado, que se presentó una extensión espacial menor del gen reportero en las dos filas del protofloema (Figura 8. G y I), lo que confirma la importancia de la región entre -1719 bp y 1098 bp en la que se encuentra un elemento BRRE en la expresión adecuada de *BRL3*.

El patrón de expresión de *BRL3* en la zona meristemática de la raíz está regulada por BRs presumiblemente a través de factores de transcripción que se unen a la caja BRRE (-1441 pb) y E-box (-892 bp), presentes en ProBRL3. Además, en diferentes estudios se ha mostrado que los BRs promueven la elongación y diferenciación celular y *BRL3* se expresa en la capa de células del protofloema en la zona de transición a las células diferenciadas del protofloema, lo cual es de especial interés si se considera que existe una regulación del tamaño del meristemo de la raíz y de la longitud de la raíz, dependiente de la dosis de BRs (Gonzalez-Garcia et al 2011). Con base en esta información surgió la cuestión de si la expresión de *BRL3* también era dependiente de la dosis de BR. Para investigar dicha hipótesis, la construcción ProBRL3 -1719::GUS fue tratada de forma continua con diferentes concentraciones de BL.

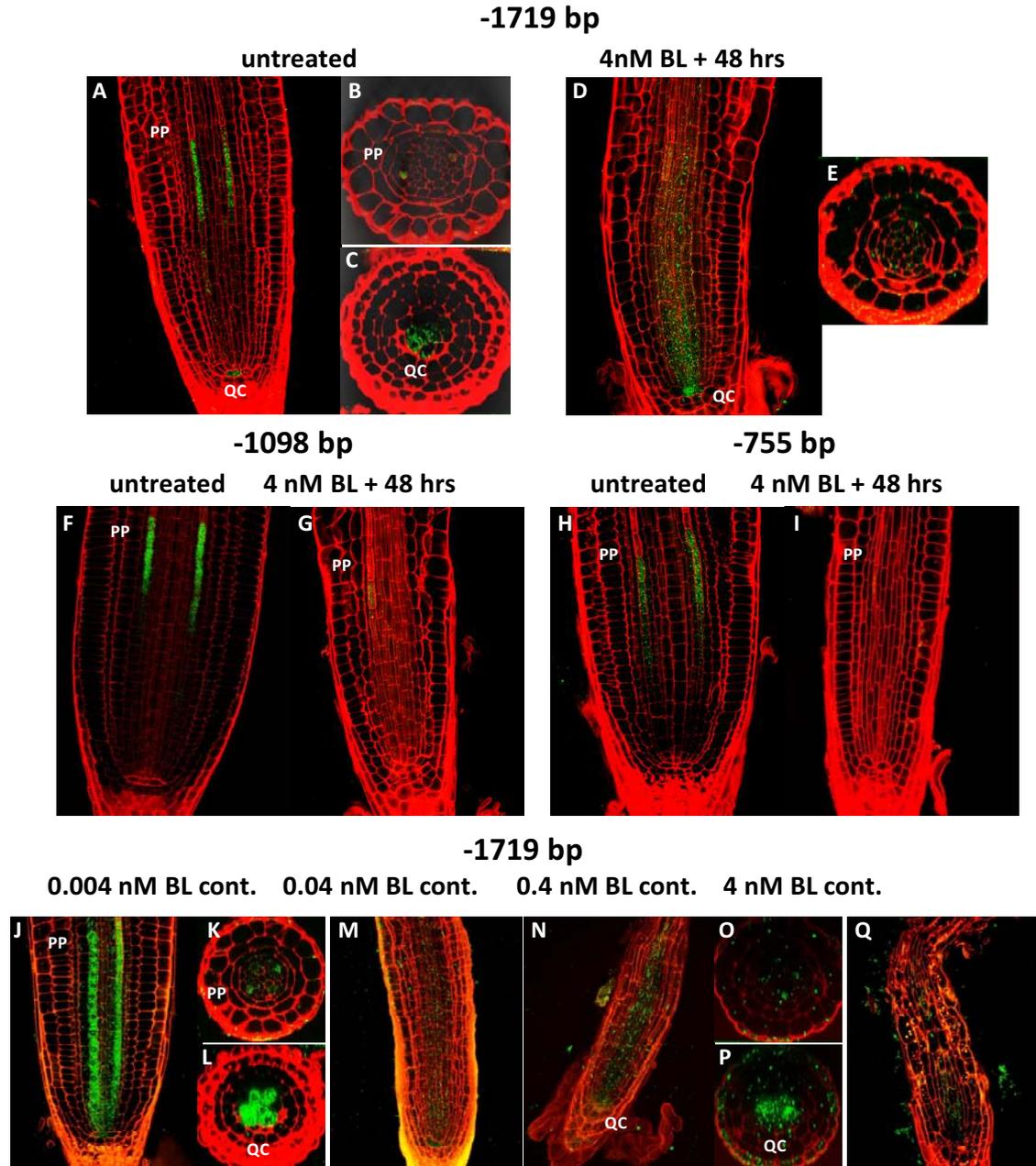


Figura 8. Efecto del BL en el patrón de expresión generado por ProBRL3 en el meristemo de la raíz. (A - I). Raíces de plantas transgénicas de 6 días de las diferentes delecciones de ProBRL3 fusionadas al gen reportero GUS, sin tratar y tratadas (BL 4 nM durante 48 horas). Todas las raíces analizadas fueron incubadas durante 16 horas con solución de tinción; la tinción fue hecha con mPS-PI y las imágenes fueron tomadas usando microscopio confocal. → (A) En la construcción -1719::GUS se observa expresión GUS en dos filas de células del protofloema y en el QC, (B,C) Imagen transversal de -1719::GUS, (F) En la delección -1098::GUS se detecta expresión del gen reportero en dos filas de células del protofloema, (H) La línea -755::GUS se expresa en dos filas de células del protofloema, (D) La construcción -1719::GUS tratada con BL poseen expresión GUS en la estela y el QC, (E) imagen transversal de -1719::GUS, (G) La delección -1098::GUS tratada con BL muestra expresión del gen GUS en dos filas de las células del Protofloema, pero esta es muy reducida en comparación con las plantas no tratadas, (I) En la delección -755::GUS tratada con BL, no se detecta expresión GUS en dos filas de células del protofloema. →→ Después del tratamiento con BL 4 nM por 48 horas, el patrón de expresión GUS de -1719 bp::GUS se desplaza hacia la estela y el QC, lo cual no ocurre en las construcciones con menor longitud. Interesantemente entre las construcciones -1719 bp y -1098 bp se encuentra una caja BREE (-1441 bp). En general las líneas transgénicas que carecen de la caja BRRE no mostraron ningún nuevo

patrón de expresión diferente en la región meristemática de la raíz, pero si una fuerte reducción de la actividad en las dos filas del protofloema. (J-Q). Raíces de plantas transgénicas de 6 días de la delección de ProBRL3 -1719 bp fusionadas al gen reportero GUS, sin tratar y tratadas (Concentraciones crecientes de BL de 0.004 nM a 4 nM, aplicadas de forma continua). Todas las muestras analizadas han sido incubadas durante 16 horas con solución de tinción; la tinción fue hecha con mPS-PI y las imágenes fueron tomadas usando microscopio confocal. → (J) Las plantas tratadas durante 6 días con BL 0.004 nM presentan un aumento en el patrón de expresión GUS en dos filas del protofloema y el QC y un ligero desplazamiento hacia la estela. (K,L) imagen transversal de -1719::GUS después del tratamiento con 0.004 nM BL por 6 días. (M) Líneas de ProBRL3 -1719::GUS tratadas con 0.04 nM BL durante 6 días, muestran una reducción de la expresión del gen reportero en la estela y no presentan expresión GUS en las dos filas de células del protofloema, (N) Las raíces de plantas tratadas con 0.4 nM BL durante 6 días muestran una reducida expresión GUS en la estela y ninguna en las dos filas de las células del protofloema. (O, P) imagen transversal de -1719::GUS después del tratamiento con 0.4 nM BL durante 6 días y (Q) Las raíces de plantas tratadas con 4 nM BL durante 6 días presentan igualmente una baja expresión GUS en la estela y ninguna en las dos filas de células del protofloema. →→ El patrón de expresión del gen reportero GUS en la zona meristemática de la raíz muestra un comportamiento espacial dosis dependiente de BR, Incrementando ligeramente a niveles bajos de BRs y reduciéndose drásticamente a media que incrementa la concentración de BRs. La expresión en el QC parece no ser afectada por BRs.

La actividad del gen *GUS* en el QC así como en la fila de células del protofloema se incremento a niveles bajos de BL (0,004 nM). Además, el gen *GUS* se expreso de forma continua a lo largo de la capa de células del protofloema en el meristemo hacia el QC y se desplazo parcialmente a la estela (Figura 8. J-L). La utilización de concentraciones de BL superiores a 0.004 nM reprimió la expresión GUS en las dos filas del protofloema y en cambio incremento su desplazamiento hacia la estela y el centro quieto (Figura 8. M-Q). Estos resultados indican que la expresión de gen reportero GUS fusionado a la construcción -1719::GUS es promovida a 0,004 nM de BL y reducida a partir de concentraciones 0.04 nM de BL.

2.3.4 Interacciones genéticas y moleculares de BES1 con el promotor de BRL3

La región 5' de BRL3 contiene un elemento BRRE en la posición -1441 pb a través del cual parece estar siendo regulado su patrón de expresión espacial, así como una caja E-box en la posición -892 bp. Por lo tanto, estableció la hipótesis de que los BRs regulan la expresión de BRL3 mediante la acción de BES1. Con el propósito de obtener evidencias genéticas de que BES1 regula la expresión de BRL3, las delecciones ProBRL3 -1719::GUS y -1098::GUS, fueron cruzadas con la línea *bes1-D* (Ibanes et al 2009) que es un mutante con ganancia de función al presentar una elevada acumulación de la proteína BES1 y con la línea inducible BES1 (35S::*bes1-D:GR*) que expresa de forma ubicua e inducible a *bes1-D*.

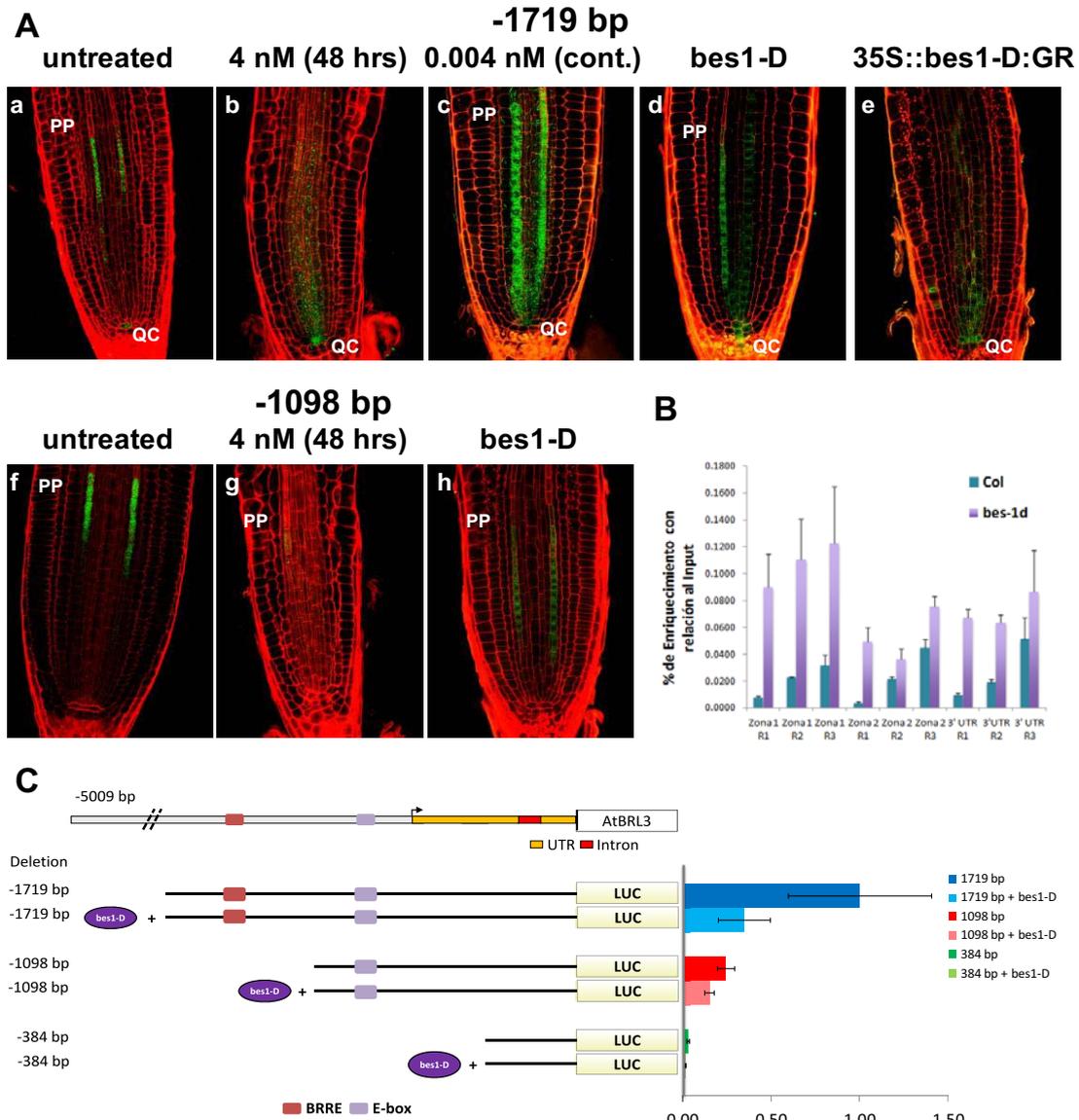


Figura 9. Regulación de *BRL3* por *BES1*.

A. Interacción genética entre *BRL3* y *BES1*. (B y D) Raíces de plantas transgénicas de 6 días de Pro*BRL3* -1719::*GUS* cruzadas con *bes1-D* y 35S:*BES1-D*:GR. (H) Raíz de línea transgénicas de 6 días de Pro*BRL3* -1098::*GUS* cruzadas con *bes1-D*. Las imágenes fueron tomadas usando microscopio confocal. → (A) En la construcción -1719::*GUS* se observa expresión en dos filas de células del protofloema y en el QC, (B) Las líneas F1 Pro*BRL3* -1719::*GUS* x *bes1-D* mostraron un incremento en la expresión *GUS* en las dos filas de células del protofloema, así como un ligero desplazamiento hacia la estela y el QC, (C) El tratamiento de plántulas con BL 0.004 nM durante 6 días generó un incremento en la expresión *GUS* en las dos filas de células del protofloema, así como un ligero desplazamiento de ésta hacia la estela y el QC, (D) Las líneas F1 Pro*BRL3* -1719::*GUS* x 35S:*BES1-D*:GR tratadas durante 6 días con dexametasona, presentaron un desplazamiento de la expresión *GUS* hacia la estela y el QC, (E) En plántulas tratadas con BL 4 nM durante 48 horas, el patrón *GUS* cambia, notándose un desplazamiento del mismo hacia la estela y el QC, (F) La deleción Pro*BRL3* -1098::*GUS* se expresó en dos filas de células del protofloema, (G) Las líneas F1 Pro*BRL3* -1098::*GUS* x *bes1-D* muestran un desplazamiento de la actividad *GUS* en las dos filas celulares del protofloema y (H) El tratamiento de plántulas con 4 nM BL durante 48 horas,

ocasiono una reducción de la expresión *GUS* en las dos filas celulares del protofloema B. Experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Se presentan los resultados de ensayos de ChIP analizados mediante qPCR y efectuados empleando un anticuerpo contra la *YFP*, ya que se utilizó como material de partida plantas transgénicas en la que *bes1-D* está dirigido por un promotor 35S y se encuentra fusionada a la *YFP* y también plantas Col-0 como control negativo. Los datos mostrados corresponden al enriquecimiento con respecto al Input. La región 5' de *BRL3* en la que se encuentra la caja BREE (-1441 bp a -1436 bp), está enriquecida en los experimentos de ChIP efectuados con *bes1-D* (Zona 1, -1456 bp a -1362 bp, con respecto al sitio de inicio de traducción). A diferencia, en la zona donde hay una caja E-box (-892 bp a -887 bp) no se detectó enriquecimiento (Zona 2, -925 bp a -830 bp, con respecto al sitio de inicio de traducción). De igual forma, no se detectó enriquecimiento en la zona evaluada como control negativo (3' UTR *BRL3*), así como en las muestras usadas como control negativo (Col-0). Las réplicas biológicas 1 y 2 y se señalan como R1 y R2, respectivamente. C. Ensayo de expresión transiente usando protoplastos de *Arabidopsis* transformados con -1719::Luc, -1098::Luc y 384::Luc. En cada experimento los protoplastos fueron transformados también con 35S::GFP (Control) o 35S::*bes1-D*:GFP y adicionalmente, con 35S::Renilla. Cada tratamiento fue efectuado por triplicado y los datos fueron normalizados empleando la actividad Renilla (Grotewold et al., 2000). El Ratio de cambio se calculó como la relación entre cada tratamiento en particular y el tratamiento con la construcción de mayor longitud sin el represor. Se muestran los valores promedios y las barras de error indican el error estándar de las muestras.

El cruce entre *bes1-D* y la delección ProBRL3 -1719 bp, generó un aumento en el patrón de expresión del gen reportero *GUS* en las capas de células del protofloema y dicho dominio de expresión continuó a lo largo de esta capa celular hacia el QC, siendo estos resultados similares a los obtenidos al aplicar BL a baja concentración (0.004 nM durante 6 días) (Figura 9. A. B-C). Por otro lado, el cruce de ProBRL3 -1719 bp con la línea inducible *bes1-D* que genera una fuerte sobreexpresión del transgén, muestra un patrón de expresión similar al obtenido al tratar ProBRL3 -1719 bp con altos niveles de BL (4 nM por 48 horas) (Figure 9. A. D-E), ya que ha sido detectado un cambio en el dominio de expresión del gen *GUS* que consiste en su desplazamiento de la capa de células del protofloema hacia la estela.

Interesantemente en el cruce de la construcción ProBRL3 -1098 bp con la línea *bes1-D*, se observa un leve desplazamiento de la actividad del gen reportero *GUS* a diferencia de la inhibición producida por la aplicación de elevados niveles de BL (Figure 9. A. G-H). Estos resultados indican que los BRs regulan la expresión de *BRL3* en el meristemo de la raíz de modo dosis dependiente de la proteína BES1 y que esta regulación se lleva a cabo principalmente por la unión de BES1 a la caja BRRE en la posición -1441 pb.

Basándose en la presencia en ProBRL3 de un caja BRRE en la posición -1441 pb que parece ser importante en su adecuada respuesta a BL así como la existencia de una caja E-box y los resultados de la interacción genética entre la región 5 de *BRL3* y BES1, se considero relevante demostrar el papel directo de BES1 en la regulación de *BRL3*, probablemente mediante su unión a las cajas BRRE y E-box de ProBRL3.

Para probar esta hipótesis, se efectuaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y de expresión transitoria en protoplastos de Arabidopsis. Los experimentos de ChIP mostraron que la región en la que se encuentra la caja BREE (-1441 bp) se encuentra enriquecida en los experimentos de ChIP realizados con el anticuerpo anti BES1 a diferencia de la zona entre -1098 bp y -755 bp en la que no se detecto enriquecimiento.

De otra parte, las versiones truncadas de ProBRL3 -1719 bp, -1098 bp y - 384 bp, fusionadas al gen *Firefly luciferase* se emplearon como reporteros y fueron co-transfectadas con la proteína BES1 expresada constitutivamente 35S::bes1-D:GFP o el vector 35S::GFP (control), cumpliendo el papel de efectores. La construcción ProBRL3 -1719::LUC que contiene la caja BRRE (-1441 bp) co-transfectada con 35S::BES-1D:GFP, presento una fuerte reducción de la actividad Luciferase en comparación con la construcción ProBRL3 -1719::LUC combinada con el control (Figura 9. C). La delección de ProBRL3 -1098::LUC presento un nivel más bajo de actividad Luciferase en relación con ProBRL3 -1719 bp y también sufrió una reducción de la actividad cuando fue co-transfectada con 35S::bes1-D:GFP, probablemente debido a la presencia de una caja E-box. Estos resultados demuestran que BES1 regula la expresión de *BRL3* uniéndose a su región promotora y que la caja BRRE cumple un papel importante en dicha regulación. De otra parte, la delección -384::LUC presento niveles bajos de expresión luciferasa cuando fue co-transfectado con el control y también en presencia de BES1.

2.3.5 Propuesta de modelos de regulación de *BRL3* por BES1

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que BES1 es capaz de interactuar con la región 5' de *BRL3* para regular su expresión. Es de anotar que en la

literatura esta descrito que la señalización por BR inhibe la biosíntesis de BRs, a través de la represión de la expresión de DWF4, CPD y otros genes implicados en la biosíntesis a por parte de BES1 y BZR1 (Clouse 2011, Choe et al 2002, Mathur et al 1998, Mora-Garcia et al 2004, Noguchi et al 1999, Sun et al 2010, Ye et al 2011, Yu et al 2011) y en los análisis globales realizados a *BES1* (Yu et al 2011) y *BZR1* (Sun et al 2010), se ha mostrado que dependiendo el contexto específico ambos pueden actuar como represores o activadores de la transcripción (Clouse 2011).

Basándonos en estos datos, proponemos un modelo de retroalimentación en el cual por medio de BES1 a bajas concentraciones de BRs se promueve la actividad de *BRL3* y a altas concentraciones su patrón de expresión probablemente reprimido en las dos filas de células del protofloema y desplazado a la estela (Figura 10).

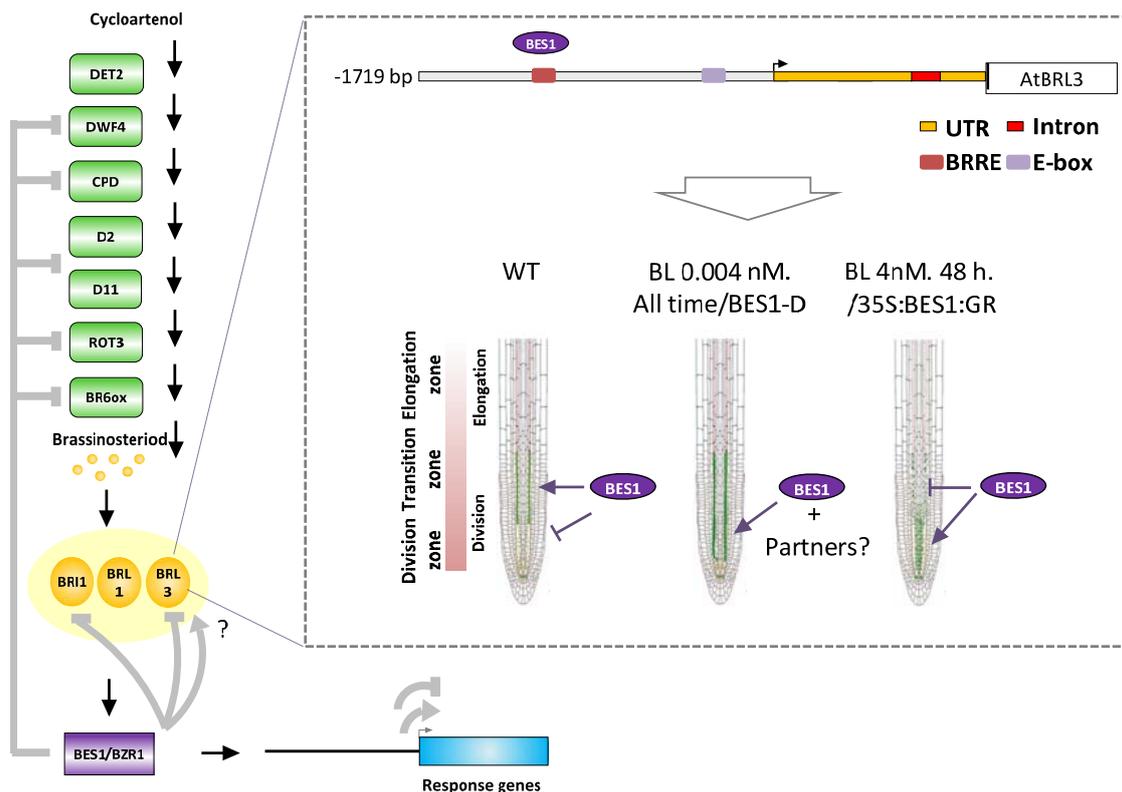


Figura 10. Regulación de la percepción de BRs por parte de *BRL3* a través de *BES1*.

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación se sugiere un modelo de autorregulación en el cual la concentración de BRs modulan la expresión de *BRL3* por medio de *BES1*. A Bajas concentraciones de BL (0.004 nM, en tratamiento continuo), se promueve la expresión de *BRL3*, mientras que a elevadas concentraciones (4 nM por 48 h) hay un desplazamiento del patrón espacial de *BRL3* y una represión del mismo en las dos filas del protofloema.

2.4 Discusión de resultados

2.4.1 Expresión tejido-especifica de *BRL3* y *BRL1*

BRL3 y *BRL1* han sido descritos como dos homólogos de *BRI1* (receptor serine/threonine kinase) que unen BL con alta afinidad y son relevantes en el desarrollo vascular. Además, se conocía que un fragmento de -755 bp (desde el sitio de inicio de traducción) de *BRL3* era capaz de conducir la expresión a las células del protofloema en la raíz y también que la zona de -1720 bp (desde el sitio de inicio de traducción) de *BRL1* podía dirigir la expresión a las células provasculares de la zona de elongación de la raíz (Cano-Delgado et al 2004). Siendo por tanto las líneas transgénicas que expresan éstas regiones genómicas fusionadas al gen reportero GUS, propuestas como marcadores de localización de tipos celulares vasculares (Cano-Delgado et al 2010). Sin embargo, no se había caracterizado detalladamente sus patrones de expresión ni los mecanismos involucrados en su regulación transcripcional, pese a que la identificación de elementos reguladores es un paso fundamental para entender como, cuando y donde, es expresado un gen y facilita la identificación de sus funciones. De otra parte, se debe anotar también que es necesario conocer los factores que pueden alterar un marcador de tipo celular para hacer un adecuado uso del mismo.

En esta investigación hemos determinado que ProBRL3 genera un patrón de expresión que incluye en los cotiledones el tejido vascular y la punta, el SAM, el área alrededor de donde emergen las raíces laterales y en la raíz dos filas de células del protofloema y el QC en el meristemo, así como parte de las zonas de elongación y diferenciación. También, hemos determinado en la región 5' de *BRL3* los fragmentos de ADN necesarios para dirigir la expresión de modo tejido-especifico en el sistema vascular y la región 5' UTR que presenta elementos regulatorios fundamentales para la expresión en los cotiledones en las venas y las puntas. Empleando un procedimiento experimental similar fue analizado el patrón de expresión de *BRL1*, encontrando actividad GUS en los cotiledones en el tejido vascular y la punta, en el SAM y en la raíz en la zona de diferenciación. Del mismo modo las regiones en 5' del sitio de inicio de

traducción, necesarias para que *BRL1* se exprese en diferentes tejidos vasculares se ha determinado entre -1641 y -978 pb y -790 y -479 pb.

2.4.2 Regulación por BL de la expresión vascular de *BRL3*

La caracterización en respuesta a BL de la región 5' de *BRL3* mostro que la expresión de este gen estaba regulada por BRs, ya que en las líneas transgénicas ProBRL3 -1719::GUS tratadas con 4 nM BL durante 48 horas se detecto un cambio en el patrón de expresión en el meristemo de la raíz. En condiciones basales las líneas ProBRL3 -1719::GUS se expresa en la capa de células del protofloema en la zona de transición entre el protofloema indiferenciado y diferenciado y en el QC, mientras que bajo tratamiento con BL la expresión se desplaza de la capa de células protofloema hacia la estela y el QC. Es de anotar que los BRs regulan la diferenciación vascular, en particular se conoce que los BRs biosintetizados endógenamente promueven la formación del xilema y suprimen la formación de floema (Fukuda 2007). El hecho de que los BRs reprimen la diferenciación del floema podría explicar la difícil detección de GUS en la capa de células del protofloema. Un tratamiento de iguales característica con BL en la deleción -1098::GUS y -755::GUS, genero una drástica reducción de la actividad GUS en la fila de células del protofloema. Interesantemente, en la región entre -1719 bp y -1098 bp se encuentra una caja de tipo BRRE y entre -1098 bp y -755 bp una caja E-box.

No sólo los BRs regulan el patrón de expresión de *BRL3*, si no que esta acción es dependiente de la dosis. Del mismo modo que el meristemo de la raíz necesita un equilibrio en la señalización por BR para mantener la longitud (Gonzalez-Garcia et al., 2011), el patrón de expresión de *BRL3* difiere significativamente cuando es sometido a diferentes concentraciones de BL. Por ejemplo, niveles muy bajos de BL (0,004 nM para 6 días) aumentan el dominio de expresión de ProBRL3 en la capa de células protofloema en la zona de transición y generan una expansión hacia el QC. Esta misma concentración de BRs también se demostró recientemente que aumenta el número de células epidérmicas en el meristemo de la raíz y por tanto el tamaño del meristemo (Gonzalez-Garcia et al 2011). Además, se conoce que los BRs pueden promover la diferenciación celular (Fukuda 1997). Por lo tanto, se puede suponer que

concentraciones bajas de BRs no sólo aumentan el número de células epidérmicas y el tamaño del meristemo, sino que también promueven la diferenciación del floema. Esta observación es antagónica a la función reportado para los BRs como represores de la diferenciación del floema (Fukuda et al., 2007). Sin embargo, el uso de niveles elevados de BL ($\geq 0,04$ nM BL) en las líneas ProBRL3 -1719::GUS, -1098::GUS y 755::GUS genero una fuerte reducción de la expresión en la capa de células del protofloema, debido presumiblemente a la disminución del número de células del floema, además de la represión directa por parte de BES1.

El análisis de respuesta a BL efectuado a las líneas transgénicas generadas con fragmentos de la región 5' de *BRL1* fusionadas a *GUS*, mostro que a pesar de la presencia de cajas E-box la aplicación de BL no genero cambios detectables en el patrón de expresión del gen reportero. Lo cual concuerda con un estudio en que se afirma que *BRL1* es una diana candidata de BZR1 no regulada por BRs (Sun et al 2010).

2.4.3 BES1 regula la expresión de *BRL3* a través de su unión a una caja BRRE

Los resultados de los análisis genéticos muestran que la expresión de las líneas transgénicas ProBRL3 -1719::GUS y -1098::GUS es dependiente de la concentración de BES1, ya que el cruce de -1719::GUS con la línea *bes1-D* que presenta ganancia de función ocasiono un aumento en el nivel de expresión GUS similar al ocasionado por el tratamiento continuo con bajas concentraciones de BL (0.004 nM) y su cruce con la línea inducible *bes1-D* en la que se incrementa drásticamente la cantidad de BES1, produjo un desplazamiento del dominio de expresión hacia la estela y su reducción en las dos filas de las células de protofloema de un modo parecido al originado por elevados niveles de BRs. Estos resultados no sólo confirman el hecho de que la expresión de BRL3 es dependiente de la dosis de BR, sino también que BES1 es esencial en su regulación y que la concentración de la proteína BES1 es un parámetro fundamental para modular su patrón de expresión en el meristemo de la raíz.

Este mecanismo de regulación probablemente es opuesto al propuesto para muchos genes inducidos por auxina que son regulados por la interacción de dos clases de

factores de la transcripción, los ARFs (auxin-response factors) y los represores AUX/IAA (Lau et al 2008). Los ARFs se unen a los elementos en cis de respuesta a auxina (G/T)GTC(T/C)(T/C) en los genes de respuesta a auxina (Ulmasov et al 1997). Cuando las concentraciones de auxina están por debajo de un umbral, los represores AUX/IAA se asocian con los activadores ARFs y reprimen la expresión génica. Sin embargo, cuando aumentan los niveles de auxina se eliminan los AUX/IAA y ocurre la activación de los genes (Gutierrez et al 2009, Lau et al 2008). En este caso probablemente a una baja concentración de BES1 este interacciona con otras proteínas cumpliendo un papel como activador y a elevadas concentraciones se reduce el número de interactores disponibles y se une a la caja BREE como un homodímero para reprimir la expresión en las dos filas de células del protofloema.

Es de anotar que BES1 se une más fuertemente a cajas BRRE, ya que no necesita un socio para formar un heterodímero y poder interactuar con el ADN, como ocurre cuando se une a una caja E-box (Yin et al 2005). Además, había sido propuesto que su homólogo BZR1 se une como un homodímero a las cajas BRRE para reprimir la expresión génica y que BZR1 interactúa con otros factores para mediar la activación a través de otros motivos (Sun et al 2010). De igual modo, probablemente una elevada concentración de BR aumentan la concentración de proteína BES1 en la estela, pero hasta un nivel en el que aun actúa como un activador, con lo cual a determinadas concentraciones de BR, el receptor es desplazado a otros tipos celulares cambiando la distribución espacial de la señalización.

Con el fin de comprobar que los resultados de los estudios genéticos se debían a un efecto directo de BES1 al unirse a la caja BREE se efectuaron *in vivo* experimentos de CHIP en los que se demostró que este factor de transcripción se une específicamente a la región donde se encuentra la caja BREE (región 1). De igual modo se evaluó la zona donde se encontraba la cada E-box pero no se encontró un enriquecimiento significativo de esta zona en las inmunoprecipitaciones efectuadas a BES1, generando más evidencias que la acción de BES1 se debe principalmente a su unión con la caja BRRE.

Finalmente, se efectuaron ensayos de expresión transiente en protoplastos de *Arabidopsis* en los que se co-transfectaron fragmentos de la región 5' de *BRL3* fusionados a la *Luciferase* y *BES1*, encontrando que este factor de transcripción puede reprimir fuertemente la expresión del gen reportero de la construcción ProBRL3 - 1719::LUC y que también presenta un efecto negativo en la delección ProBRL3 - 1098::LUC, aunque este fue menor al igual que la expresión de la construcción sola. Indicando también *BES1* regula la expresión de *BRL3* principalmente mediante su unión a la caja BREE.

Capítulo 3. Los R2R3-MYB *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, en la ruta de la síntesis de lignina

La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad.

Julio Verne

3.1 Introducción

3.1.1 Biosíntesis de lignina

La lignina ha sido esencial para la adaptación evolutiva de las plantas vasculares del medio acuático al terrestre y es después de la celulosa el segundo biopolímero terrestre más abundante, siendo el 30% del carbón orgánico en la biosfera (Boerjan et al 2003). Además, la lignina es uno de los mayores componentes de la pared secundaria de las células del xilema y las fibras (Mellerowicz et al 2001). La lignificación confiere fuerza, rigidez e hidrofobicidad a la pared celular secundaria (Boerjan et al 2003, Bonawitz & Chapple 2010, Ralph 2004, Ralph et al 2007, Rogers & Campbell 2004, Whetten & Sederoff 1995). La pared celular a su vez, proporciona a la planta soporte mecánico, impermeabilidad en las células del xilema lo que facilita el transporte de agua y solutos a través del sistema vascular y una barrera contra el ataque de patógenos (Boerjan et al 2003, Carpita & Gibeaut 1993, Jouanin et al 2000, Sarkanen & Ludwig 1971b).

La biosíntesis de lignina ocurre en la ruta de los fenilpropanoides, la cual también es requerida para la generación de otros compuestos como los flavonoides, antocianinas y proantocianinas. La biosíntesis se inicia con la desaminación de la fenilalanina para formar ácido cinámico. Tras la desaminación, una serie de reacciones de hidroxilación seguidas por O-metilación, modifican el anillo aromático del ácido cinámico y su cadena lateral se reduce de un ácido a una fracción de alcohol, lo que resulta en la producción de los tres monómeros de lignina más abundantes o monolignoles: Alcohol p-cumarílico **M1H** (4-hydroxycinnamyl), alcohol coniferílico **M1G** (3-methoxy 4-hydroxycinnamyl), y alcohol sinapílico **M1S** (3,5-dimethoxy 4-hydroxycinnamyl) (Boerjan et al 2003, Whetten & Sederoff 1995). Estos monolignoles difieren en el número de grupos metoxilo en el anillo aromático y dan lugar cuando son incorporados al polímero a las subunidades p hidroxifenil-(**H**), guaiacílico (**G**) y syringyl (**S**), respectivamente (Figura 11) (Boerjan et al 2003, Neutelings 2011).

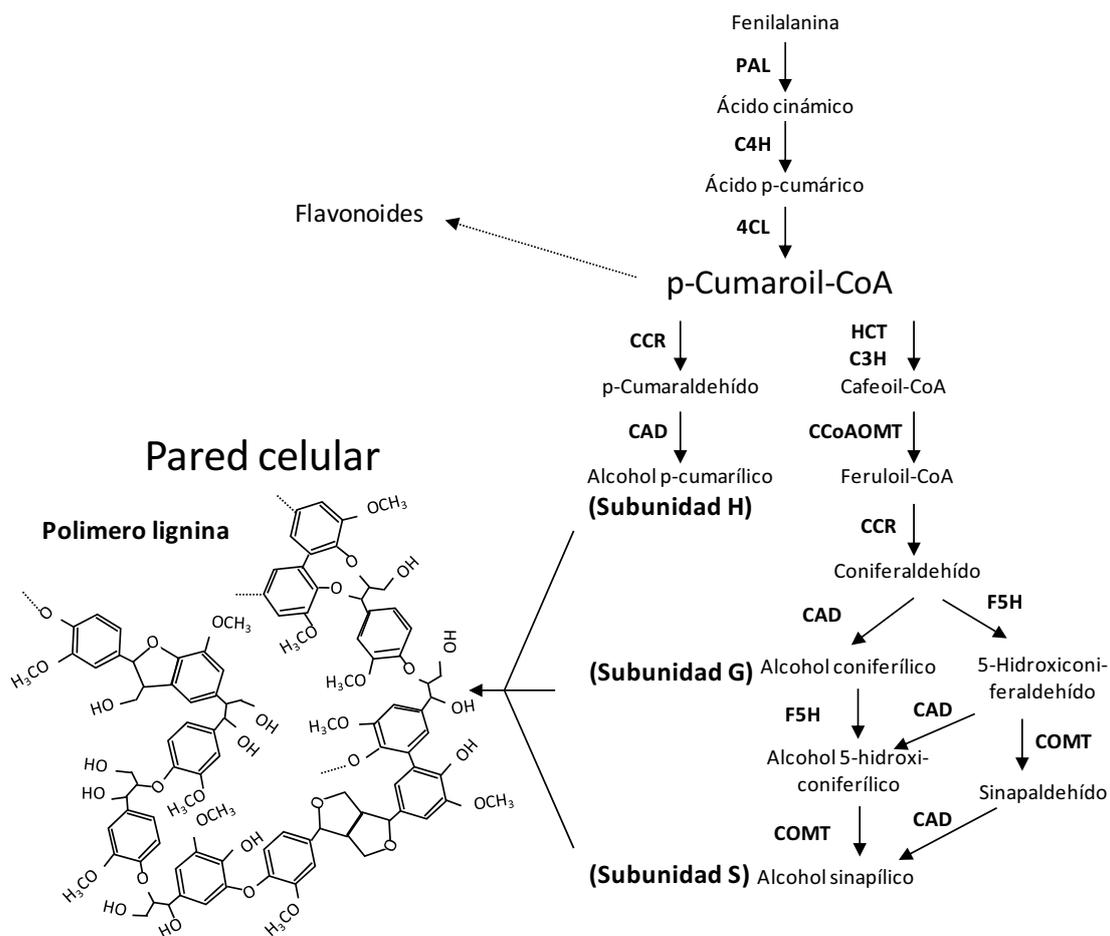


Figura 11. Ruta de biosíntesis de los monolignoles en angiospermas.

(Adaptado. Fornale et al 2010b). Las enzimas que intervienen en esta ruta biosintética son: Fenilalanina amonio liasa (**PAL**), cinamato-4-hidroxilasa (**C4H**), 4-cumarato CoA ligasa (**4CL**), cinamoil CoA-reductasa (**CCR**), cinamil alcohol deshidrogenasa (**CAD**), hidroxicinamoil-CoA sikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa (**HCT**), *p*-cumarato-3-hidroxilasa (**C3H**), cafeico *O*-metiltransferasa (**COMT**), cafeoil CoA-3-*O*-metiltransferasa (**CCoAOMT**) y ferulato-5-hidroxilasa (**F5H**). Las enzimas que median en cada etapa de la vía se indican al lado de las flechas.

La lignina se forma mediante la polimerización oxidativa de los monolignoles. Después de su síntesis, los monómeros de lignina se exportan por un mecanismo poco conocido al espacio extracelular (apoplasto) (Boerjan et al 2003, Kaneda et al 2008, Mellerowicz et al 2001, Samuels et al 2002). Cuando alcanzan el apoplasto los monolignoles son sometidos a una oxidación de un solo electrón mediada por lacasas y/o peroxidasas para formar especies radicales reactivas que pueden ser acoplados combinatoriamente. El acoplamiento de los radicales de los monolignoles produce un heteropolímero compuesto por las unidades H, G y S (Ralph 2004, Whetten & Sederoff 1995).

Los acoplamientos ocurren una vez que cada monolignol entrante es convertido en su correspondiente radical fenoxi, lo cual, es catalizado por enzimas oxidativas, entre las que se incluyen las lacasas y peroxidasas de clase III (Espiñeira et al. 2010). Las unidades estructurales mayoritarias en el polímero de lignina se representan en la Figura 11. El acoplamiento de un monolignol con otro para iniciar la polimerización, puede ocurrir vía formación de enlaces β -O-4 eter o un enlace β -5 fenilcoumarano, siendo uno de ellos un alcohol coniferílico.

La cantidad y composición de la lignina varía entre los distintos taxones, tipos celulares y capa de la pared celular y son influenciadas por las señales de desarrollo y ambientales (Boerjan et al 2003, Campbell & Sederoff 1996). Aunque existen excepciones, la lignina de las angiospermas se compone esencialmente de subunidades G y S y trazas de subunidades H y solamente algunas monocotiledóneas (principalmente las gramíneas) contienen una relativa mayor cantidad de subunidades H. En cambio, las gimnospermas se compone principalmente de subunidades G, carecen de subunidades S (de nuevo con algunas excepciones) y son intermedias entre dicotiledóneas y monocotiledóneas en la abundancia de subunidades H (Baucher et al 1998, Boerjan et al 2003, Whetten & Sederoff 1995).

En cuanto a las variaciones en la lignina entre tipos celulares está descrito que la pared celular secundaria se enriquece en las subunidades S cuando se generan fibras, dando lugar a la llamada no condensada lignina, y se enriquece en las subunidades G cuando se genera xilema, produciendo la llamada lignina condensada (Gray et al 2012). Asimismo, en la pared celular secundaria la deposición espacial del polímero lignina en sus tres diferentes capas es también finamente controlada, así como el porcentaje de las subunidades H, G y S en cada una de ellas (Gray et al 2012, Joseleau & Ruel 1997). Finalmente, adicional a la lignificación que ocurre durante el curso normal del desarrollo de tejidos, varios tipos de estrés de origen abiótico o biótico, como una infección o una herida por patógenos pueden desencadenar la producción de lignina en determinados sitios (Boerjan et al 2003, Lange et al 1995, Sarkanen & Ludwig 1971a, Vance et al 1980, Whetten & Sederoff 1995).

El mecanismo molecular implicado la regulación del flujo hacia una particular vía de la biosíntesis de monolignoles (para producir lignina enriquecida en subunidades S o G en las fibras o el xilema) o para modificar progresivamente el flujo durante la formación de la pared celular secundaria sigue siendo desconocida no sólo en las gramíneas, sino en todas las plantas vasculares (Gray et al 2012).

La síntesis de monolignoles a partir de la fenilalanina requiere desaminación, hidroxilación en las posiciones cuatro, tres o cinco del anillo aromático, metilación de los meta hidroxilos y dos reducciones sucesivas en la cadena lateral del monolignol, partiendo de un ácido carboxílico primero a un aldehído y luego a un alcohol (Whetten & Sederoff 1995). Estas reacciones son mediadas por un Fenilalanina amonio liasa (PAL), tres diferentes *Monooxigenasas dependientes del citocromo P450* (cinamato-4-hidroxilasa (C4H), p-cumarato-3-hidroxilasa (C3H), y ferulato-5-hidroxilasa (F5H)), *dos metiltransferasas* (cafeoil CoA-3-O-metiltransferasa (CCoAOMT) y cafeico O-metiltransferasa (COMT), y *dos oxidoreductasas* (CoA-reductasa (CCR) y cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD)). Además de estas ocho enzimas cuyas acciones son evidentes en los productos finales de la vía, actúan dos enzimas más, 4-cumarato CoA ligasa (4CL) y hidroxicinamoil-CoA sikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa (HCT), que sintetizan compuestos intermedios de la ruta que sirven como sustratos para reacciones posteriores. 4CL es una ligasa-CoA. ATP-dependiente que cataliza la síntesis de p-cumaroil CoA. El p-cumaroil CoA se utiliza como un donador de acilo para la HCT aciltransferasa para sintetizar éster p-coumarílico de ácido shikímico, el sustrato para la 3-hidroxilación que realiza la enzima C3'H. Alternativamente, el p-coumaroil CoA puede servir como sustrato para la chalcona sintasa, que desvía la vía hacia la síntesis de flavonoides o para CCR, que conduce a la biosíntesis de lignina H (Whetten & Sederoff 1995).

La síntesis de alcohol p-coumarílico (subunidad H) requiere 5 enzimas: PAL, C4H, 4CL, CCR y CAD. La síntesis de alcohol coniferílico (subunidad G) requiere de 3 enzimas más: HCT, C3'H y CCoAOMT. Por último, la síntesis de alcohol sinapílico (subunidad S) requiere el total de las diez enzimas, incluyendo por tanto a F5H y COMT (Figura 11).

Para cada una de las enzimas de la ruta de los fenilpropanoides pueden existir múltiples isoformas, así como características cinéticas distintas o incluso variar en cuanto a su distribución en la planta (Bonawitz y Chapple 2010). Otro factor que añade complejidad al estudio de la vía de los fenilpropanoides en gramíneas es la duplicación génica. Esta característica es de particular importancia en especies que pueden ser empleadas para cultivos energéticos, como es el caso de switchgrass (*Panicum virgatum*) que puede ser tetraploide ($4n = 36$) o octaploide ($8n = 72$), la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) que tiene niveles variables de ploidía (5-14) o maíz, que es un antiguo alotetraploide en el que aproximadamente 25% de los genes están duplicados (Gray et al 2012, Schnable et al 2009).

La biosíntesis de lignina ha sido estudiada extensamente en plantas angiospermas monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como en gimnospermas (Boerjan et al 2003, Gray et al 2012, Vanholme et al 2010). La perturbación de la expresión de algunos genes implicados en la biosíntesis de la lignina ha sido analizada en gramíneas mediante la caracterización de los mutantes disponibles o por la producción de plantas transgénicas. En general, estos estudios muestran que alteración de un gen implicado en la biosíntesis de lignina puede aumentar la disponibilidad de los polisacáridos de la pared celular sin afectar el estado de la planta o la cantidad de biomasa, aumentando el valor nutricional y energético de la biomasa lignocelulósica (Gray et al 2012).

3.1.2 Regulación transcripcional de la biosíntesis de pared celular secundaria y la lignificación

3.1.2.1 Factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de la biosíntesis de pared celular secundaria

Los estudios realizados han demostrado que la regulación transcripcional de la biosíntesis de lignina es común con la GRNs que controla toda la biosíntesis de la pared celular secundaria en *Arabidopsis* (Figura 12). En esta red, los factores de transcripción con dominio NAC, *NAC SECONDARY WALL THICKENING FACTOR1 (NST1)* y sus homólogos cercanos *NST2* y *SND1* (también, llamado *NST3*), así como *VASCULAR-*

RELATED NACDOMAIN 6 (VND6) y *VND7*, actúan como interruptores maestros que controlan la activación de los genes de biosíntesis de la celulosa, el xilano y la lignina. (Hartmann et al 2005, Ko et al 2007, Kubo et al 2005, Mitsuda et al 2005, Zhong et al 2006, Zhong et al 2008, Zhong et al 2007, Zhong & Ye 2007, Zhong & Ye 2009). Estos genes actúan como reguladores de la diferenciación de fibras (*SND1*, *NST1*, *NST2*), protoxilema (*VND7*) y metaxilema (*VND6*), inician la red transcripcional y activan directamente varios factores de transcripción, entre los cuales están los factores de transcripción *MYB46* y *MYB83* (Schuetz et al 2013).

El nodo *MYB46/83* activa la expresión de un gran número de factores de transcripción, que promueven la biosíntesis de lignina, celulosa y hemicelulosa, así como también de reguladores negativos de la formación de la pared celular secundaria como los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro (Schuetz et al 2013). Los reguladores aguas abajo *SND2*, *SND3* y *MYB103*, activan exclusivamente la biosíntesis de celulosa y *MYB63*, y *MYB58* regulan la biosíntesis de lignina (Zhong et al 2008). Aunque existen muchos estudios de interacción proteína-DNA, en los que se han identificado reguladores directos para algunos genes implicados en la síntesis de celulosa y lignina, es necesaria la caracterización adicional de muchos reguladores de aguas abajo para contar con un panorama general de la red regulatoria que facilite el uso de la ingeniería genética con el fin de obtener mejoras biotecnológica.

Los genes de la ruta de la lignina tienen que ser regulados coordinadamente para poder sintetizarla. Se ha descrito que los CREs denominados como elementos AC (*AC-I*, *ACCTACC*; *AC-II*, *ACCAACC*; y *AC-III*, *ACCTAAC*), están asociados con la expresión en el xilema, se encuentran presentes en un amplio número de promotores de genes de la biosíntesis de lignina y son dianas para los TF(s) de la familia *MYB* (Hatton et al 1995, Zhong et al 2010), que los regulan tanto activando como reprimiendo su expresión.

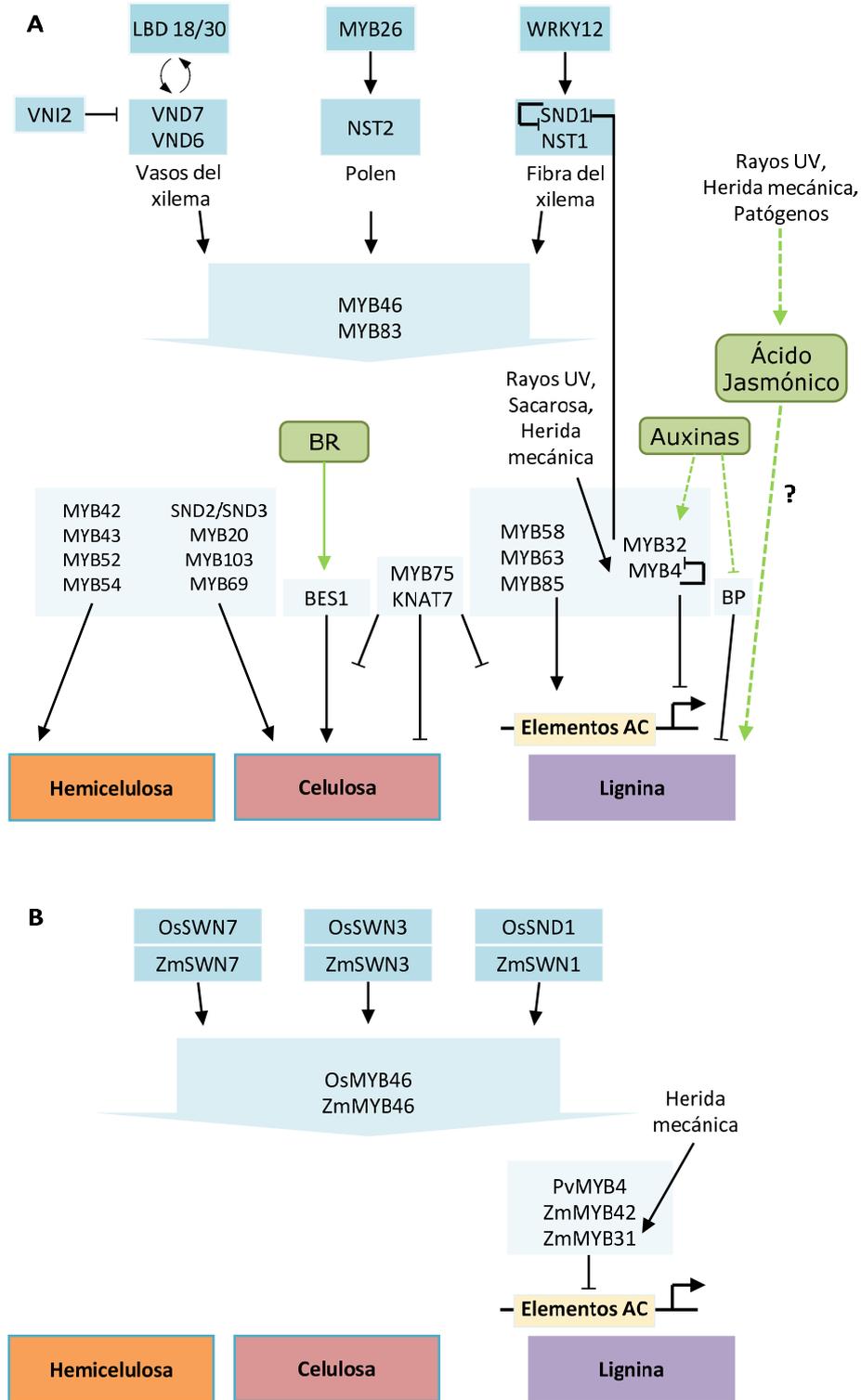


Figura 12. Diagrama de la red transcripcional que regula la biosíntesis de pared celular secundaria en *Arabidopsis* (A) y monocotiledóneas (B).

(Adaptado. Gray et al 2012, Handakumbura & Hazen 2012, Ohashi-Ito & Fukuda 2010, Schuetz et al 2013, Zhao & Dixon 2011). Las formas de color azul representan los factores de transcripción, las color verde corresponden a las hormonas que intervienen en la regulación y las naranjas simbolizan las cajas AC. Las líneas que finalizan con una punta de flecha corresponden interacciones de activación y las líneas que finalizan con una barra transversal indican represión. Las líneas punteadas indican la existencia de evidencia de interacción directa.

3.1.2.2 Represores transcripcionales de la biosíntesis de la pared celular secundaria

Los represores transcripcionales han surgido en los últimos años como elementos esenciales en el establecimiento de patrones espacio-temporales de expresión génica durante el desarrollo vegetal y la respuestas de la planta al estrés y a las señales hormonales (Kagale & Rozwadowski 2011). Los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro han sido descritos como represores transcripcionales que intervienen en la regulación de la biosíntesis de monolignoles (Fornale et al 2010a, Hemm et al 2001, Jin et al 2000, Sonbol et al 2009).

En *Arabidopsis*, se han estudiado algunos de los miembros de los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro. En la biosíntesis de fenilpropanoides *AtMYB4* reduce la expresión del gen *AtC4H* que codifica una enzima envuelta en uno de los primeros pasos de la ruta (Jin et al 2000) y *AtMYB32* regula enzimas generales de la vía (Preston et al 2004). El mutante de pérdida de función *atmyb4* presenta niveles elevados de ésteres de sinapato y un aumento en la expresión de *AtC4H* (Jin et al 2000) y el mutante de pérdida de función *atmyb32* muestra ligeramente mayor expresión de *AtCOMT* (Preston et al 2004). En cuanto a su regulación es necesario señalar que la expresión de *AtMYB4* y *AtMYB7* es incrementada por *AtMYB46* (Ko et al 2009). La expresión de *AtMYB32* es desreprimida en el doble mutante *nst1nst3* (Mitsuda et al 2007) y se describió que *AtSND1* (*nst3*), se une al promotor de *AtMYB7* y viceversa en un sistema de regulación tanto positiva como negativa (Wang et al 2011).

En cuanto a los *R2R3-MYB* del subgrupo 4 de maíz se puede anotar, que la expresión heteróloga de *ZmMYB42* y *ZmMYB31* en *Arabidopsis*, ocasiona la reducción de los niveles de expresión de algunos de los genes de la biosíntesis de lignina. Mediante experimentos *in vitro* de enriquecimiento exponencial en presencia del ligando (método SELEX), se determinó que la secuencia consenso de unión a ADN de *ZmMYB31* es ACC(T/A)ACC, la cual es similar a las típicas cajas AC descritas como relevantes en la regulación de la ruta de los fenilpropanoides y que se encuentran presentes en el promotor de *ZmCOMT*. Posteriormente, se demostró *in vivo* en maíz que *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, directamente se unen al promotor de los genes *ZmCOMT*

asociado a la lignina y A1 relacionado con los flavonoides (Fornale et al 2010b, Gray et al 2012).

En switchgrass (*Panicum virgatum* L.) la proteína PvMYB4, un ortólogo de AtMYB4, ha sido caracterizado como represor de la lignina, ya que su sobre-expresión reduce la expresión de muchos (si no todos) de los genes implicados en la biosíntesis de monolignoles, reduce la cantidad total de lignina y altera la composición de la misma (Shen et al 2012).

Finalmente, se debe anotar que la aparente similitud en la función en los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro y la elevada conservación en su secuencia de aminoácidos, ha originado la pregunta de si son funcionalmente redundantes (Jin et al., 2000).

Los factores de transcripción *MYB75* y *KNAT7*, interactúan físicamente y reprimen la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular (Bhargava et al., 2010). La pérdida de función tanto de *MYB75* (*myb75-1*) como de *KNAT7* (*knat7*), da lugar a la promoción de la expresión de genes involucrados en la síntesis de celulosa, xilano y lignina (Bhargava et al 2010, Li et al 2011). El mutante *myb75-1* presenta un aumento en el espesor de la pared celular en las fibras interfasciculares y el xilema (Bhargava et al 2010) y el mutante *knat7* tiene un engrosamiento de la pared celular de las fibras interfasciculares y un aumento en el contenido de lignina (Li et al., 2011).

BREVIPEDICELLUS (*BP*), uno de los siete knotted1-like homeobox (*KNOX*) en Arabidopsis, tiene un papel importante en el meristemo de la planta debido a que regula la división y diferenciación celular, también está implicado en la regulación de la vía de la lignina (Zhao & Dixon 2011). *BP* previene la deposición de la lignina, lo cual es considerado como un signo irreversible de diferenciación celular (Groover & Jones 1999). La deposición de lignina se incrementa en mutantes *pb* y disminuye en las líneas que sobre-expresan *BP*. Asimismo, los niveles de expresión de genes involucrados con la lignina aumentan ligera, pero significativamente, en el mutante *bp* y *BP* se une a los promotores *AtCOMT* y *AtCCoAOMT* (Mele et al 2003).

3.1.2.3 El desarrollo y el medio ambiente regulan la biosíntesis de lignina

La cantidad y composición del polímero lignina varía espacial y temporalmente mediante la acción antagonista de represores y activadores, con el fin de generar el nivel exacto de acumulación de lignina en determinadas células, tejidos u órganos en el momento adecuado (Zhao & Dixon 2011). A diferencia de los activadores de la biosíntesis de lignina que son expresados ampliamente en los tejidos en lignificación durante el desarrollo los represores de esta ruta se expresan en tejidos en los que la lignificación es escasa o inexistente (Zhao & Dixon 2011). La expresión de *KNAP2*, que es un homólogo de *BP* en poplar, se redujo en la región del tallo donde las paredes celulares secundarias son sintetizadas, lo que sugiere que su presencia pueda inhibir la inducción de la síntesis de la pared celular secundaria (Mele et al 2003). Del mismo modo, *AtMYB32* tiene mayores niveles de expresión en flores que es un tejido con bajos niveles de lignina que en tejidos como el tallo en donde estos son mayores (Preston et al 2004).

En cuanto a estímulos ambientales está descrito que algunos genes que participan en la ruta de los fenilpropanoides son inducidos por lesiones mecánicas y ataque de patógenos (Bhuiyan et al 2009a, Bhuiyan et al 2009b, Zhao & Dixon 2011), así como por la exposición a rayos UV. Por ejemplo, la expresión de *AtMYB32* es inducida en hojas y tallo en respuesta a herida. En las hojas *AtMYB4* modula negativamente la producción de ésteres de sinapato, los cuales están implicados en el incremento de la protección a los rallo UV. El mutante de pérdida de función *atmyb4*, muestra un aumento en nivel de ésteres de sinapato en las hojas y es más resistente a los rayos UV-B que las plantas WT. El incremento en la acumulación de ésteres de sinapato en *atmyb4* está asociado con un aumento en la expresión del gen *AtC4H*, que es una diana de *AtMYB4* y un paso limitante en su síntesis. *AtMYB4* presenta un mecanismo de autorregulación negativa, ya que se une a su propio promotor para modular su expresión. Cuando la planta es expuesta a UV-B entre 1 a 6 horas, aumenta la expresión de *AtMYB4*, que a su vez se autoregula negativamente (Zhao et al 2007), reduciendo fuertemente su expresión (Jin et al 2000), probablemente para mantener un fino mecanismo de aclimatación a UV-B.

Además, resultados sin publicar del laboratorio del Dr. David Caparrós Ruiz indican que *AtMYB7* que es un miembro del subgrupo cuatro cercano filogénicamente a *AtMYB4* y *AtMYB32*, tiene un papel importante en la regulación de la biosíntesis de flavonoides. El mutante de pérdida de función *atmyb7* presenta inducción de varios genes implicados en la producción de flavonoides y un aumento de cantidad de estos compuestos. También se encontró que la expresión de *AtMYB7* es reprimida por *AtMYB4* y como consecuencia de ello, el mutante de pérdida de función *atmyb4* presenta una reducción del contenido de flavonoles. Estos resultados llevan a proponer que *AtMYB4* y *AtMYB7* hacen parte de un mecanismo de regulación que controla el equilibrio de los principales protectores contra los rayos UV (Anexo 2).

3.1.2.4 Fitohormonas que regulan la biosíntesis y remodelado de la pared celular

La planta para crecer, desarrollarse y hacer frente a las condiciones de estrés ambiental, tienen que actuar de acuerdo a diferentes señales internas y externas, empleando su red de regulación transcripcional. Muchas de estas señales son transmitidas a través de las hormonas vegetales o fitohormonas. Se conoce que las fitohormonas, auxinas, BRs, citoquininas, jasmonato (JA), giberelinas (GA) y etileno (ET), están involucradas en la inducción y mantenimiento del cámbium y en la formación de tejidos vasculares secundarias (Ursache et al 2013). Asimismo, se ha establecido que las hormonas desempeñan funciones relevantes en la biosíntesis y remodelado de la pared celular.

Investigaciones fisiológicas y moleculares han involucrado a las auxinas y los BRs con la promoción de la división y elongación celular y con la remodelación de la pared celular (Dello Ioio et al 2008, Hobbie & Estelle 1994, Mussig 2005, Sanchez-Rodriguez et al 2010). La expresión de *AtMYB32* es incrementada por ácido indol-3-acético (IAA) (Preston et al 2004) y la de *BP* es reducida por la presencia de auxinas (Mele et al 2003). Está descrito que los BRs pueden inducir la expresión de los genes *CesA* (Salas Fernandez et al 2009, Xie et al 2011) y se demostró *in vivo* que BES1 que es un elemento clave en la ruta de señalización por BRs, se une al promotor de miembros de la familia *CesA* para activar su expresión (Xie et al 2011). Asimismo, se encontró que la

pérdida de función de *DIMINUTO 1 (DIM1)*, que codifica para una proteína envuelta en la biosíntesis de BR, reduce la cantidad de celulosa y lignina y modifica la composición de esta última (Hossain et al 2012).

La herida mecánica en *Arabidopsis* induce la expresión de genes de la ruta de la síntesis de lignina como *AtCOMT*, *AtCCR*, *At4CL*, y *AtPAL2*. Esta respuesta es dependiente de un gen involucrado en la señalización por JA llamado *COI1* (CORONATINE INSENSITIVE1), lo cual se evidencia en la no ocurrencia de dicho incremento, en el mutante insensible a JA *coi1-1* (Reymond et al 2000). También, fue descrito que la ruta de los monolignoles es activada a nivel transcripcional no sólo en respuesta a herir sino a JA en un mecanismo dependiente de *COI1* (Devoto et al 2005) y que el incremento de dichos genes por la aplicación de MeJA, da lugar a un aumento en la producción de monolignoles y oligolignoles, los bloques de construcción de la lignina (Pauwels et al 2008).

Mutantes deficientes de expansión celular de *Arabidopsis* como *cev1* (perdida de función del gen celulosa sintetasa, *CesA3*), *rsw1* (perdida de función del gen celulosa sintetasa, *CesA1*), *det3* (*de-etiolated 3*), *cob* (*cobra*) y el doble mutante *shv3sv1* (*shaven3 shv3-like1*), presentan incremento en los niveles de JA (Brux et al 2008, Cano-Delgado et al 2003, Ellis et al 2002, Hayashi et al 2008, Roudier et al 2005). Adicionalmente, varios de estos mutantes tienen un patrón ectópico de lignificación. Un ejemplo de ello es el mutante *cev1* que presenta una respuesta constitutiva a JA junto con un aumento de la producción de etileno (Ellis et al 2002), una reducción en el contenido de celulosa y una lignificación ectópica.

Mediante el uso de isoxaben que es un inhibidor de la biosíntesis de celulosa, se fenocopia el patrón de lignificación del mutante *eli1* (mutante alélico a *cev1*) en plántulas WT. Por su parte, en el mutante *coi1* se reduce la lignificación ectópica generada por el tratamiento con isoxaben, lo que indica un requerimiento parcial de JA para la señalización (Cano-Delgado et al 2003). Finalmente, sobre el Ácido Jasmónico se puede anotar que estimula la actividad cambial interfascicular en el tallo de

Arabidopsis, tanto por la aplicación de JA como por un elevado nivel de señalización por jasmonato (Sehr et al 2010).

Las GA por su parte, afectan a muchos aspectos del desarrollo de la planta (Salas Fernandez et al 2009) y modificación de la pared celular (Genovesi et al 2008). El mutante *Katanin-like microtubule-severing protein (ktn1)* que puede ser restaurado mediante el tratamiento con el precursor de GA denominado GA₃ (Bouquin et al 2003), muestra una reducción de celulosa acompañada por un aumento en la cantidad de lignina y la sobreexpresión de los genes de la biosíntesis de GA (Meier et al 2001).

En cuanto al ET, se conoce que el doble mutante *fei1 y fei2 (Leucine-rich-repeat receptor-like kinase)*, presenta malformaciones en la raíz que pueden ser rescatados por la aplicación de inhibidores de ET, incremento en la sensibilidad a isoxabe y lignificación ectópica (Xu et al 2008). El mutante *ctl1 (chitinase-like1)*, tiene reducción en celulosa, ectópica deposición de lignina, sobreexpresión de etileno y su fenotipo puede ser contrarrestado por aplicación de inhibidores de etileno (van Hengel et al 2001, Zhong et al 2002).

El papel de las hormonas vegetales en el crecimiento y desarrollo así como en la organización de la pared celular, sugiere que la producción y la percepción de las hormonas y la síntesis y modificación de los componentes de la pared celular pueden estar conectados directa o indirectamente (Sanchez-Rodriguez et al 2010). Sin embargo, a pesar de la evidencia existente que une a las hormonas y la lignificación, los nodos reguladores claves en la vía de la lignina que detectan cambios en los flujos de hormonas deben todavía ser identificados (Zhao & Dixon 2011).

3.1.3 Los factores de transcripción de plantas *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro y su papel en la regulación de la biosíntesis de la pared celular secundaria

Los MYB están involucrados en múltiples procesos biológicos de la planta, como el crecimiento y la diferenciación celular (Lee & Schiefelbein 1999), la morfogénesis celular (Romero et al 1998), el metabolismo de los fenilpropanoides (Deluc et al 2006,

Sablowski et al 1994), y la respuesta a hormona y a diversas condiciones de estrés (Xie et al 2010), entre muchos otros.

Los MYB contienen un dominio conservado de unión a ADN (DBD), que es homólogo al DBD animal c-Myb (Aasland et al 1996). Este dominio está conformado típicamente por entre 1 a 4 repeticiones imperfectas (R) (Dubos et al 2010, Lipsick 1996). Cada repetición es de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud y codificada para un 3 a-hélice. Cuando se unen a una secuencia específica en un promotor, las hélices segunda y tercera forman una estructura hélice-giro-hélice (HTH) (Lipsick 1996, Stracke et al 2001) y la tercer a-hélice se cree que desempeñan un papel en el reconocimiento del sitio de unión a ADN (Rabinowicz et al 1999).

En plantas el gen C1 de maíz implicado en la biosíntesis de antocianinas, fue el primer TF identificado así como el primer miembro de la familia MYB aislado (Paz-Ares et al 1987). El tipo más común de genes MYB existentes en plantas son los *R2R3-MYB* (con 2 repeticiones), los cuales son a su vez, una de las familias de tf mejor caracterizadas en cuanto a la regulación de la ruta de los fenilpropanoides.

Los *R2R3-MYB* forman una familia multigénica amplia, de la que hasta el momento se han encontrado en maíz 88 genes y en G137 genes (Feller et al 2011). El dominio MYB tiene una elevada conservación dentro de los *R2R3-MYB*, pero la región C-terminal es variable y contiene generalmente dominios implicados en la regulación transcripcional (activación o represión) y residuos conservados de serina y treonina, que pueden corresponder a sitios de modificación post-traduccionales (Martin & Paz-Ares 1997).

Considerando la elevada conservación del DBD, se han empleado principalmente los motivos aminoácidos presentes en la región C-terminal para dividir la familia *R2R3-MYB* en 22 sub-grupos en Arabidopsis (Dubos et al 2010, Kranz et al 1998, Xie et al 2010). El subgrupo más relevante descrito hasta la fecha en cuanto a la regulación negativa de la biosíntesis de fenilpropanoides es el cuatro (Figura 13).



Figura 13. Estructura general de las proteínas MYB-R2R3 del subgrupo cuatro

Una de las características del subgrupo cuatro es presentar en la zona C-terminal un motivo EAR (Factor de unión a un elemento de respuesta a etileno (ERF) - represión ampifilica asociada), que es un elemento que media la represión transcripcional y que se ha encontrado que es uno de los principales mecanismos de regulación vegetal (Kagale & Rozwadowski 2011). El motivo EAR tiene como principal patrón de secuencia consenso LxLxL o DLNxxP y es el principal motivo de represión identificado en plantas (Kagale & Rozwadowski 2011). En la región C-terminal existe además del dominio EAR un putativo dominio zinc-finger, siendo estos dos motivos los más característicos del subgrupo cuatro (Kranz et al 1998).

El subgrupo cuatro está compuesto por cuatro miembros en *Arabidopsis* *AtMYB3*, *AtMYB4*, *AtMYB7* y *AtMYB32*. *AtMYB4* actúa como un regulador negativo de la biosíntesis de ésteres de sinapato en un mecanismo dependiente de la presencia de UV (Hemm et al 2001, Jin et al 2000) y *AtMYB32* regula la composición de la pared del polen (Preston et al 2004).

Mediante análisis de homología de secuencia empleando los miembros del subgrupo cuatro de *Arabidopsis*, se identificaron hasta la fecha diez genes de este subgrupo en maíz, los cuales han sido implicados en el control negativo del metabolismo de la lignina por estudios de expresión heteróloga en *Arabidopsis* y análisis *in vivo* de interacción proteína-DNA en plantas de maíz empleando ChIP.

En el grupo del Dr. David Caparrós se han caracterizado tres de ellos *ZmMYB42*, *ZmMYB31* y *ZmMYB8* (Fornale et al 2010a, Fornale et al 2006, Sonbol et al 2009). La expresión heteróloga de *ZmMYB42* en *Arabidopsis* disminuye la cantidad de lignina, generando un polímero con un decrecimiento en el ratio S:G, a través del enriquecimiento en subunidades H y G y el descenso de las subunidades S y

provocando una modificación en el metabolismo de carbohidratos, como es evidenciado por la disminución de xilosa y el aumento de arabinosa en las paredes celulares finales. Adicionalmente, las paredes celulares de las fibras transgénicas tenían una alteración en la estructura caracterizada por un mayor número de membranas y una disminución del espesor de las paredes celulares secundarias (Sonbol et al 2009).

Por su parte, las plantas de *Arabidopsis* que expresan *ZmMYB31* tienen menor contenido de lignina que las transformadas por *ZmMYB42*, sin embargo no presentan una modificación en el ratio S:G y los carbohidratos no se ven afectados (Fornale et al 2010a, Sonbol et al 2009). Experimentos *in vitro* mostraron que las líneas transgénicas de *ZmMYB31* tenían incrementada la degradabilidad de la pared celular. Los datos obtenidos de *ZmMYB8* mostraron que este factor de transcripción no está implicado en el proceso de represión de la síntesis de lignina (Fornale et al 2006). Por su parte, los resultados obtenidos con *ZmMYB8* (Fornale et al 2006), mostraron que este factor de transcripción no está implicado en el proceso de represión de la síntesis de lignina.

Posteriormente, en el grupo del Dr. Caparrós han iniciado el estudio de otros genes de este grupo hallando que *ZmMYB9* y *ZmMYB10*, tienen una expresión muy baja, lo que sugiere que su papel en la regulación de la síntesis de lignina sea reducido.

Seguidamente, con el fin de obtener información acerca del papel que cumple *ZmMYB11* en la regulación de la síntesis de lignina fueron generadas en el laboratorio del Dr. David Caparrós plantas transgénicas de *Arabidopsis* expresando constitutivamente *ZmMYB11* (p35S::*ZmMYB11*). Dichas líneas transgénicas no presentaron alteraciones fenotípicas a nivel macroscópicos al ser comparadas con las plantas de tipo silvestre. Sin embargo, la sobre-expresión *ZmMYB11* reduce los niveles de expresión de los genes *AtC4H* y *AtHCT*, mostrando que dicho gen está implicado en la regulación de la síntesis de monolignoles. Además, estas plantas se caracterizaron en relación al contenido de lignina encontrando que la sobre-expresión de *ZmMYB11* genera una reducción en el contenido de lignina, pero no una modificación en el ratio S/G (Datos sin publicar, Silvia Fornale).

Este proyecto se enfoca en el estudio de los genes *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, que ya se han descrito como relevantes en la regulación de la biosíntesis de lignina y del nuevo miembro del subgrupo cuatro *ZmMYB11*.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Amplificación de ADN

Para la clonación de secuencias de ADN o la verificación de la presencia de un inserto dentro de un vector, se amplificaron fragmentos de ADN plasmídico empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La enzima de ADN polimerasa utilizada para la clonación de segmentos de ADN fue *Platinum Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen) y la empleada en la comprobación de la presencia de insertos fue *Ex TaqTM Polymerase* (Takara). En ambos casos se usaron los reactivos y condiciones de amplificación proporcionados por la casa comercial correspondiente.

3.2.2 Clonaje de la proteína ZmMYB11

La tecnología Gateway de Invitrogen se empleó para efectuar la clonación de *ZmMYB11*. La región codificante se amplificó empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los oligos B1UTR *ZmMYB11* 5' y B2*ZmMYB11* 3' (tabla 6), los cuales tienen fusionado el sitio de recombinación gateway attB. El producto de PCR obtenido se recombinó empleando la reacción BP en el pDONR 221, generando el *Entry Clon ZmMYB11*. Con esta reacción de recombinación se transformaron células competentes *E. Coli* de la cepa DH5 α (*Invitrogen*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Seguidamente, las células transformadas fueron sembradas en medio LB con el antibiótico correspondiente, se incubaron por entre 16 a 18 horas a 37 °C y se amplificó 1 colonia en 4 ml de cultivo líquido suplementado con antibiótico. A continuación se aisló el ADN plasmídico empleando el kit Spin *Miniprep* (*Qiagen*) y se verificó la presencia del inserto mediante PCR y secuenciación.

El *Entry clon* resultante se recombinó mediante la reacción LR en el vector gateway de destino 16LF-51 en el que el gen es controlado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y fusionado a la secuencia que codifica para la Proteína Verde Fluorescente (GFP) (tabla 7). Este vector tiene comparativamente un tamaño reducido con el fin de facilitar la transformación transiente de protoplastos de maíz.

3.2.3 Clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína ZmMYB11 fusionada a etiquetas N-terminal 6-histidina (6xHIS) y Glutathione-S-transferase (GST)

3.2.3.1 Clonaje de una región única de ZmMYB11 y de ZmMYB11, fusionados a 6xHIS

Dada la similitud en la secuencia de los *MYB-R2R3* del subgrupo cuatro se procedió a clonar la región con menor conservación existente en la secuencia aminoacídica de ZmMYB11 para la generación de anticuerpos policlonales. Esta zona fue la comprendida entre los aminoácidos 128 a 201 y para su amplificación se emplearon los oligos B1UniqueRegion ZmMYB11 5' y B2UniqueRegion ZmMYB11 3' (tabla 6). El producto de PCR se recombinó con el pDONR 221. El *Entry Clon* resultante fue denominado Región Única ZmMYB11 y fue recombinado con el vector de destino pDEST17 (INVITROGEN). Asimismo, el entry clon ZmMYB11 se recombinó con el vector pDEST17. En este vector la proteína es fusionada a una etiqueta N-terminal 6-histidina (6xHis) y la expresión es controlada por el promotor T7 inducible por Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

3.2.3.2 Sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

Los plásmidos fueron transformados en células *E. coli* BL21-AI (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial y los transformantes incubados durante toda la noche a 37 °C, en placas con medio LB y la resistencia antibiótica correspondiente. Una colonia fue usada para generar dos cultivos líquidos de 4 ml en medio LB con el antibiótico indicado y uno de ellos fue suplementado con 2% (peso/volumen) de glucosa (el control negativo). Estos cultivos fueron incubados por 16 horas a 37 °C con una agitación de 250 rpm. A continuación, se empleó 1 ml de cultivo para inocular un recipiente con 500 ml de medio LB con la resistencia

antibiótica adecuada. El procedimiento se empleó para el cultivo no suplementado con glucosa y el suplementado con la misma. Los nuevos cultivos se mantuvieron a 37 °C y 250 rpm hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de 0,7-0,8. En este paso se almacenó una alícuota de 1 ml de ambos cultivos y se procedió a inducir el cultivo que nunca fue suplementado con glucosa con IPTG 1 mM seguidamente, los cultivos fueron puestos durante 3 h a 37 °C y 250 rpm. Se extrajeron alícuotas cada hora de ambos cultivos para disponer un control de la inducción y finalmente, el cultivo inducido se centrifugó a 6500 rpm 30 min a 4 °C, se recogió el pellet bacteriano y se guardó a -80 °C para posteriormente purificarlo.

3.2.3.3 Purificación de proteínas usando una resina de níquel (Ni-NTA)

El pellet bacteriano procedente de 500 ml de cultivo inducido con IPTG fue resuspendido en 10 ml de buffer de unión 1X (1 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9). Seguidamente, fue añadida lisozima (1 mg/ml) e inhibidores de proteasas A, P, L, PMSF y E-64, se efectuó una incubación de 1 hora sobre hielo y se adicionó triton X-100 (concentración final 0.1%). La muestra fue colocada sobre hielo durante 5 minutos y sonicada tres veces por 45 segundos con una potencia 4-5 al 50-60%. A continuación, se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C, fue filtrada empleando Miracloth y se le adicionó RNasa y DNasa hasta una concentración final de 1 µM (1 µl de 1mg/ml por ml de células resuspendidas). La resina comercial *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare), cargada con iones Ni²⁺ fue resuspendida y se depositó 1 ml en una columna *Poly-Prep Chromatography* (BioRad) de 10 ml de capacidad. Posteriormente, se lavó la columna con 20 ml de agua destilada, luego se pasaron 10 ml de buffer de unión 1X y finalmente, se depositó la muestra en la columna, se incubó por 3 horas y se dejó pasar la muestra por la resina. Se efectuaron 4 lavados de 5 ml cada uno con buffer de lavado (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9) a 10 mM de imidazol. Para la elución de la muestra se efectuaron 5 lavados de 1 ml con buffer de lavado a las siguientes concentraciones de imidazol 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM y 1 M, se recogieron las fracciones y posteriormente, se realizó una electroforesis en gel desnaturizante SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE). El protocolo se efectuó a 4 °C. Este procedimiento se

empleo para purificar las proteínas Región Única ZmMYB11 y ZmMYB11 fusionadas a 6xHis (vector pDES17), las cuales efluyeron principalmente en las fracciones con una concentración de imidazol de 200 mM y 300 mM.

3.2.3.4 Clonaje y sobreexpresión de la Proteína ZmMYB11 fusionada a Glutathione-S-transferase (GST)

Se efectuó la recombinación de la construcción *Entry Clon ZmMYB11* en el plásmido pDEST15 (GST) en el que el gen es controlada por el promotor T7 y es fusionado a una etiqueta N-terminal Glutathione-S-transferase (GST) (tabla 7). La sobreexpresión de la proteína se efectuó como se describe en el apartado (2.2.3.2).

3.2.3.5 Purificación de proteína usando una resina GSH-SEFAROSA.

El pellet bacteriano fue resuspendido en 20 ml de tampón NETN, pH 8.0 (0.5% NP40, 20mM Tris, 1 mM EDTA y 100 mM NaCl), suplementado con los inhibidores de proteasas 1 mM PMSF, 1 μ M pepstatina, 2 μ g/ml aprotinina y 2 μ g/ml leupeptina. Seguidamente, la muestra se colocó sobre hielo y se efectuó la sonicación tres veces por 45 segundos con una potencia 4-5 al 50-60%. Se procedió a centrifugar la muestra a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C y recuperar el sobrenadante. Se continuo, con la preparación de la resina GST-sefarosa para lo cual, se lavó 1 ml de 'slurry' al 50% de resina GSH-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech) tres veces con 5 ml de NENT, permitiendo precipitar por gravedad las bolas entre lavado y lavado. Los 20 ml de pellet bacteriano resuspendido fueron añadidos y la mezcla se mantuvo en rotación a 4 °C, durante 14 horas. Al día siguiente la resina fue lavada en tres ocasiones con 2 ml de NENT-0,7 M NaCl, tres veces con 4 ml de NENT y 2 veces por 4 ml volúmenes de tampón TST (50 mM Tris-HCl pH 8, 0,15 M NaCl, 0,1% Triton X-1000). Por último, se efectuó la elusión empleando los 0,5 ml de resina empaquetada y 2 ml de *Glutathione Elute Buffer* frío (50 mM Tris-HCl, 30 mM Reduced Glutathione, pH 8.0). Se removieron 5 μ l de muestra obtenida de la resina y fueron colocadas con buffer de carga (10 μ l), sometidas a 95 °C por 10 minutos y corridas en un gel SDS-PAGE.

3.2.4 Visualización de las proteínas por tinción de *Coomassie blue*

La Visualización de las proteínas se realizó una vez terminada la electroforesis mediante tinción con *Coomassie blue* (50% (p/v) ácido tricloroacético; 0,45% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma)), durante 20 min a temperatura y el posterior, desteñido del gel con metanol/acético/agua (30:10:60).

3.2.5 Producción y purificación del anticuerpo α MYB11

3.2.5.1 Generación del anticuerpo policlonal α MYB11

La producción del anticuerpo contra la proteína ZmMYB11 fue realizada por la empresa Cocalico Biologicals, Inc., Reamstown, PA (USA). A esta empresa se enviaron 500 ug de la proteína purificada Región Única MYB11 (6xHis, pDEST17), cortada de un gel SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. Esta empresa inmunizó un conejo (Rabbit, OSU 257), por inyección subcutánea siguiendo el siguiente protocolo: Día 0 almacenamiento de una muestra control (Prebleed) e inoculación inicial, inyección día 14, inyección día 21, prueba de sangrado día 35 y prueba de sangrado día. Por último, el animal fue sacrificado y se efectuó una extracción final recolectada por desangrado.

3.2.5.2 Purificación por afinidad del antisuero α MYB11

Se corrió un gel SDS-PAGE con la proteína purificada ZmMYB11 fusionada a la etiqueta N-terminal 6xHis (45 ug, aproximadamente), cuya concentración había sido determinada empleando el método estándar descrito por Bradford (1976). Se llevo a cabo un *Western Blot*, transfiriendo del gel a una membrana PVDF la proteína empleada como antígeno, se realizó una tinción con *Ponceau* de la membrana para verificar la presencia de la proteína, se localizó el área que contenía la proteína de interés y se recortó. Se destiñó la membrana y se procedió a bloquearla empleando 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄ y pH 7.4) suplementado con 5 % de BSA 1x y una incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó la membrana en 5 ocasiones durante 5 minutos en agitación con PBS y se incubaron 2.5 ml (aproximadamente, 2 mg de anticuerpos) de antisuero durante 14

horas a 4 °C. Se retiró el antisuero y se lavo la membrana con 1x PBS-T (0,1% Tween 20 disuelto en PBS) y PBS (3x).

Se empleó el siguiente cálculo teórico para definir la cantidad de proteína a utilizar: 1 mg del antígeno (proteína) teóricamente pueden unirse alrededor entre 0.5 y 2 mg de anticuerpos específicos. Los anticuerpos específicos son de 1-10% del conjunto total de anticuerpos en el suero pre-inmune. Si se considera la concentración más baja 1% de los anticuerpos específicos en la muestra, 1 ml contendrá alrededor de 0,01 mg de anticuerpos específicos. En este caso se empleó 2.5 ml antisuero, aproximadamente 25 ug de anticuerpos específicos y por tanto, 45 ug de proteína.

La elusión de los anticuerpos unidos se realizó con 2 ml de glicina 0,2 M, pH 2,6, que se aplicó sucesivamente 200 ul, 800 ul y 5 veces 200 ul. Entre cada elución se efectuó una incubación por 5 minutos en agitación y se recuperó el eluido como diferentes fracciones que se almacenaron en tubos de 1.5 ml que contenían 60 ul de Tris 1 M pH 8.0 por cada 200 ul de anticuerpo con el fin de neutralizar la glicina. Se lavo la membrana con PBS y se almacenó a -20 °C. Este protocolo se repitió empleando como antígeno la proteína purificada de *ZmMYB11* (aproximadamente, 25 mg) con la etiqueta N-terminal GST (pDEST15) y la suma de eluciones del anticuerpo purificado empleando como antígeno la proteína purificada *ZmMYB11* fusionada a la etiqueta N-terminal 6xHis. Finalmente, se efectuaron las eluciones progresivas con el fin de obtener el anticuerpo purificado y la nueva membrana fue lavada con PBS y se almacenó a -20 °C.

3.2.6 Análisis de proteínas mediante *Western Blot*

La especificidad de α *ZmMYB11* se comprobó *in vitro* empleando proteína purificada y extractos de *E. Coli* e *in vivo* empleando extractos de proteínas totales de plantas de maíz B73.

3.2.6.1 Obtención de extractos proteicos vegetales

Para la extracción de proteínas se emplearon los primeros 4 cm de la base de la segunda hoja de plantas de maíz B73 de 9 días (*Pool* 4 individuos, aproximadamente 300 mg). Las muestras fueron trituradas en un mortero que contenía nitrógeno líquido. El material pulverizado se almacenó en un *ependorf* de 1.5 ml y se le adicionó tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM de NaCl, 5X de inhibidores de proteasas), en una proporción equivalente a un tercio de su volumen. La muestra se colocó dentro de hielo y se le efectuó vórtex cada 3 minutos durante 20 minutos. Por último, se centrifugó la muestra a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos *ependorf*. Los extractos de proteína se almacenaron a -20 °C.

3.2.6.2 Electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE

En la realización de SDS-PAGE se emplearon geles del 12 % y 15 % de poliacrilamida. Para la preparación de Lower buffer se empleó 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 0,4% SDS y para el Upper Buffer 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,4% SDS. Se empleo el tampón de muestra 2X con 125 mM Tris HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 0,04% azul de bromofenol y el tampón de electroforesis 10X: 1,92 M glicina; 0,25 M Tris HCl, pH 8,3; 1% SDS. Se corrieron las muestras a 100V durante 10 minutos y después a 160 V 1 hora 20 minutos. Se llevaron a cabo de modo convencional. Se emplearon los sistemas *Miniprotean Gel 2 y 3* (Biorad), con espaciadores de 1,5 mm

3.2.6.3 Transferencia de proteínas y tinción de Ponceau

La transferencia de las proteínas separadas en gel SDS-PAGE a la membrana PVDF se realizó con utilizando el Transfer Blot Semidry (Bio-Rad), durante 45 min y a amperaje constante de 20V/gel. La transferencia se realizó con ubicando los elementos en el siguiente orden: papel Whatman 3MM, membrana PVDF (activada con metanol al 100% durante 30 segundos y lavado con buffer de transferencia), gel de poliacrilamida y papel Whatman 3MM, todos ellos embebidos en tampón de transferencia. Transcurrido el tiempo de transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau

para comprobar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello las membranas se sumergieron en solución de Ponceau (0,1% Ponceau disuelto en 1% (v/v) ácido acético), durante 1 min en agitación suave. Luego se lavó membrana con TBS 1X para elimina el exceso del Ponceau tres veces y se bloqueó con TBS 1x (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y pH 7.5, con 0.05% Tween20 in TBS) suplementado con 5 % de BSA 1x, durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación.

3.2.6.4 Hibridación e inmunodetección mediante ECL

Para el análisis de proteínas purificadas o extractos totales de *E. coli*, se aplico suero pre-inmune o α MYB11 purificado a una dilución 1:2000 en TBS-T con BSA 0.25%, para realizar la hibridación de las membranas previamente bloqueadas. Para la detección de ZmMYB11 en extractos hojas de maíz B73 se utilizo α MYB11 purificado, diluido 1:100 en TBS-T con BSA 0.25% y como control de carga se utilizo posteriormente anti β -Actin (1 mg/ml) diluido 1:5000 en TBS-T con BSA 0.25%. Seguidamente, las membranas previamente bloqueadas fueron sumergidas en los anticuerpos o el suero pre-inmune durante 14 horas en agitación a 4 °C. A continuación se procedió a lavar la membrana tres veces con TBS-T durante 10 minutos cada vez, se añadió el anticuerpo secundario y se incubo durante 1 hora a temperatura ambiente.

La detección del complejo antígeno-anticuerpo se realizó empleando anticuerpos policlonales anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Horseradish Peroxidase Conjugate, Invitrogen). Se emplearon las siguientes diluciones del anticuerpo policlonal anti IgG de conejo (1 mg/ml): Con las muestras procedentes de extracto total de bacterias y proteínas purificadas, se usó una dilución 1:5000 en TBS-T con BSA 0.25% y con los extractos de planta se utilizo una dilución 1:10000 en TBS-T con BSA 0.25%. Finalmente, Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T.

Para la visualización se usaron los kit de detección ECL (Amersham) y ECL Plus (Amersham). En el caso de las muestras procedentes de extracto total de bacterias y proteínas purificadas, se emplearon los dos reactivos de ECL Plus diluidos al 70 % en

los reactivos de ECL y se procedió a efectuar la detección empleando un casete de revelado en el que después de la aplicación de ECL a la membrana se inserto un film que seguidamente fue revelado. Para la detección en muestras de extracto de plantas se empleo el kit ECL Plus al 100 % y se captaron digitalmente las imágenes. La membrana fue recubierta sobre un plástico transparente se introdujo dentro del equipo LAS 4000, donde se seleccionó el programa *Chemiluminescent* e incremento y se capturan las imágenes cada 10 segundos, durante 1 hora. Para obtener la imagen del marcador de color se eligo White, precisión, 60 segundos.

3.2.7 Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para la realización de ChIP se tomó y modificó el protocolo descrito para Arabidopsis por el Dr. kengo Morohashi (Morohashi et al 2007). Para las inmunoprecipitaciones se empleó el anticuerpo purificado α MYB11 generado en este proyecto y los anticuerpos purificados α MYB31 y α MYB42, ya existentes (Fornale et al 2010b, Xinhui 2011). El procedimiento se inició con la preparación de las Dynabeads/Protein A (Invitrogen), para lo cual estas fueron resuspendidas y se transfirieron 30 ul a un eppendorf de 1.5 ml y 120 ul a un eppendorf de 1.5 ml independiente (30 ul por muestras; teniendo muestras: Input, α MYB11, α MYB31 y α MYB42).

Se efectuó el lavado de las beads dos veces con 500 ul de lisis *buffer* (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Na butyrate, 1 mM PMSF, 1X plant proteinase inhibidor cocktail (SIGMA)), poniendo cada vez los tubos en un soporte magnético durante 30 segundos y descartando el sobrenadante. Después del último lavado se añadió buffer de bloqueo (BSA (10 mg/ml), 10 μ l *Yeast transfer RNA* (10 μ g/ μ l) 20 μ l of t-RNA, y lisis *buffer* hasta 1 ml) a una proporción de 100 ul por cada 30 ul de beads, al que en el caso de los eppendorf en los que se efectuaría la inmunoprecipitación se adicono 10 ul del respectivo anticuerpo contra los ZmMYBs estudiados o suero pre-inmune. A continuación se efectuó una incubación de 14 horas en rotación a 4 °C.

El material empleado para la realización de los ChIPs fue la base de la segunda hoja de maíz B73 de 9 días (4 cm aproximadamente desde la base de *legule 2*). Se generaron pool de hojas proveniente de cuatro plantas (300 mg) y se procedió a realizar el *Crosslinking* del material sumergiéndolo en 10 ml buffer A (0.4 M sucrose, 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Formaldehyde), aplicándole vacío por 20 minutos más, añadiéndole 2 M de glicina y continuando la incubación en vacío por 10 minutos. Luego se realizó un lavado de la muestra con abundante agua destilada, se pulverizó el material en un matraz con nitrógeno líquido y se resuspendió dentro de un eppendorf con 500 ul de buffer de lisis. Posteriormente, se realizó la fragmentación de la cromatina a un rango de 100–1,000 bp (~500 bp en promedio) mediante sonicación empleando un Biorupter (UCD-200TM, Diagenode Inc.) con las siguientes condiciones: 30 sec ON y 30 sec OFF al nivel de poder H por 30 minutos y se centrifugó el material a 10,000 ×g por 10 minutos a 4°C.

A continuación, se descartó el buffer de bloqueo contenido en el eppendorf con 120 ul de beads, se le adicionaron los 500 ul de extracto de cromatina generados anteriormente y se mantuvo la incubación a 4 °C por 4 horas más. Terminado el tiempo de incubación fue descartado el contenido de los eppendorf que tenían buffer de bloqueo con anticuerpos o suero pre-inmune y se agregó a cada uno 100 ul de la cromatina incubada con las beads. El material restante se almacenó a 4 °C para generar el Input. Las *Dynabeads* fueron puestas en agitación durante 14 horas a 4 °C y se procedió a descartar el sobrenadante. En seguida, se efectuaron 2 lavados con 0.5 ml lisis buffer, 2 lavados con 0.5 ml buffer LNDET (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA) y 2 lavados con 0.5 ml de TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA). Las *Dynabeads* fueron resuspendidas en 50 ul de buffer de elución (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, 1 mg/ml proteinase K) e incubadas durante 10 minutos a 65°C y puestas en rotación por 2 minutos, seguidamente se recuperó el sobrenadante, se almacenó en un tubo *eppendorf* nuevo y se repitió el procedimiento para obtener 100 ul de material. Además, se adicionaron 70 ul de buffer de elución a 30 ul de extracto de cromatina inicial para producir el input (30% de la cromatina inicial) y se efectuó simultáneamente la elución.

A todas las muestras incluyendo el Input se les llevó a cabo el *Reverse-crosslinking* aplicando 65 °C por 14 horas. Finalmente, se añadió 1 ul de RNaseA a cada muestra, se mezcló mediante inversión del *ependorf* varias veces y se incubó a temperatura ambiente 30 minutos. Por último, el DNA fue purificado usando el kit de purificación de PCR comercial (Qiagen, Valencia, CA). La elución de las muestras se realizó con un volumen final de 30 ul.

3.2.8 Análisis de material proveniente de ChIP

3.2.8.1 Análisis de material precipitado por semi qPCR

Se efectuaron diluciones seriadas de las muestras de ChIP y de Input (1, 1/10 y 1/100), para efectuar las semi qPCR. Para realizar las reacciones se empleo la enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). La master mix empleada se muestra en la tabla 4. Las condiciones de PCR empleadas fueron las siguientes:

Paso 1:95 °C por 3 minutos

Paso 2:95° C por 30 segundos

Paso 3:55° C por 30 segundos

Paso 4:72° C por 30 segundos

40 ciclos del paso 2 al paso 4

Componente	Por Reacción	7 Reacciones
10X PCR Buffer. Sin Mg	2.0 µl	14 µl
50 nM MgCl ₂	0.6 µl	4.2 µl
dNTPs 10 mM	0.4 µl	2.8 µl
Cebador A (50 µM)	0.1 µl	0.7 µl
Cebador B (50 µM)	0.1 µl	0.7 µl
Template DNA	1 µl	-
Platinum Taq	0.08 µl	0.56 µl
dH ₂ O	15.72µl	110.04 µl
Total Vol	20.0 µl	140 µl

Tabla 4. Reacción de semi qPCR para amplificación con muestras de ChIP

Los resultados de los productos de semi qPCR fueron analizados por electroforesis en gel empleando geles al 2% de agarosa y tinción con EtBr.

3.2.8.2 Análisis de material precipitado mediante CHIP qPCR y CHIP Nano-qPCR

Las PCR cuantitativas fueron realizadas empleando LightCycler[®] 480 DNASYBR Green I Master (Roche Diagnostics, BS, SE) en 10 ul de reacción. Para elaborar la reacción se emplearon 2.5 ul de CHIP o Input provenientes de una dilución 1:3, los cuales se adicionaron a 5 ul de iQTM SYBR Green supermix y 0.5 μ M de cada oligo. La amplificación se llevo a cabo utilizando el equipo BioRad CFX96 real-time PCR Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) y un programa de amplificación en el que primero se desnaturalizo el ADN empleando 95 °C durante 10 minutos y seguidamente, se efectuaron 40 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y extensión a 60 °C por 1 minuto.

Los experimentos de Nano-qPCR se realizaron empleando el sistema de micro fluidos BioMark HD System (Fluidigm) y siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante con algunas modificaciones. Después de efectuar experimentos de puesta a punto se determino que las condiciones optimas para CHIP Nano-qPCR eran las siguientes: 18 ciclos de amplificación específica de diana (STA) y posterior dilución de la amplificación 1:4, para llevar a cabo la reacción final. La STA se llevo a cabo utilizando 4 ul de CHIP en 10 ul totales de reacción. Los cebadores empleados se muestran en la tabla 5.

Nombre cebador	Maize genome version 5b.60	Secuencia cebador
PAL1AF'	GRMZM2G074604	AAATCATTTTTAGAAAGGCAATTGAT
PAL1AR'	GRMZM2G074604	CTCTGGAGTGGGGTGGTT
PAL1BF'	GRMZM2G074604	CCGCTACCTCCTCTCTCAAG
PAL1BR'	GRMZM2G074604	TTTGTTTCGATATCAATTGCCT
PAL1CF'	GRMZM2G074604	ATGGCACACGCAATAATTTG
PAL1CR'	GRMZM2G074604	GACTACCAGTGCCAGAGGGT
PAL1DF'	GRMZM2G074604	CACAGTTTGCATCCCAGGTA
PAL1DR'	GRMZM2G074604	ACGATCACCGTCAGAAACCT
PAL1EF'	GRMZM2G074604	GACCAGGGCCCTCTTACAG
PAL1ER'	GRMZM2G074604	CTTGCACTAGGGGGTTACAAG
PAL2AF'	GRMZM2G441347	TCTGGGATGAGAATGAGATCC
PAL2AR'	GRMZM2G441347	GGCTTAGGTGAGGCACTGA
PAL2BF'	GRMZM2G441347	GTTGGACTGCCTCCATCC
PAL2BR'	GRMZM2G441347	CTGTACATTGACATTGTTGAGCTG
PAL2CF'	GRMZM2G441347	GGCCCTGTACTCGTAGGTTG
PAL2CR'	GRMZM2G441347	GCAAGTGGAAAGAGGACCAC
PAL2DF'	GRMZM2G441347	CCCGTTGTTTCTCCTACCC
PAL2DR'	GRMZM2G441347	CGGACGACGTTTGCTATCT
PAL3AF'	GRMZM2G160541	GAATTCCAGGAGGATGGAGA
PAL3AR'	GRMZM2G160541	GCTCTGTAGTAGTGGGAGGGA
PAL3BF'	GRMZM2G160541	TCACTAGTTGGGGAGTAGTAGTG
PAL3BR'	GRMZM2G160541	GTGGACGATAGGGTTCTGGT
PAL3CF'	GRMZM2G160541	AGTGCCACACGCAATAATTT
PAL3CR'	GRMZM2G160541	GTGGAGGCTGGAGAAACAA
PAL3DF'	GRMZM2G160541	CAGCTACAGCCTGCCTACAA
PAL3DR'	GRMZM2G160541	GTTCCGTCTCTGTGTGCTGT
C4H1AF'	GRMZM2G139874	ACTCAAATTGGACCCGTCTC
C4H1AR'	GRMZM2G139874	GTAGGTGGGGTGTGTGTTTT
C4H1BF'	GRMZM2G139874	TAGTGTTTGATCCCGTTCCA
C4H1BR'	GRMZM2G139874	CACGAATTTGTTTGGTTTGC
C4H1CF'	GRMZM2G139874	TCTGCAGAGTGTTATGAAACTGAT
C4H1CR'	GRMZM2G139874	ACCAACCATCTCTGATCGAA
C4H2AF'	GRMZM2G028677	ATTTCCGTCACAAACCAAGG
C4H2AR'	GRMZM2G028677	GTTGCTGTGCTGTTGTTGG
C4H2BF'	GRMZM2G028677	TCCACCAAACACGAGCAC
C4H2BR'	GRMZM2G028677	GTGACGGAAATCCGTGTG
C4H2CF'	GRMZM2G028677	TTCATAGTGACCGAGAGAGAA
C4H2CR'	GRMZM2G028677	GGTCAGAGCGGACTAGCTG
C4H3AF'	GRMZM2G147245	TAGTGTTTGTCCCGTTCCA
C4H3AR'	GRMZM2G147245	TTTGTTTGGTTTGCGAATTG
C4H3BF'	GRMZM2G147245	TCAGTCCCTCTTGGATGAAA
C4H3BR'	GRMZM2G147245	AGACACGTACGGAGGTTTGA

Nombre cebador	Maize genome version 5b.60	Secuencia cebador
C4H3CF'	GRMZM2G147245	ACTCCTTCTCAAGGAAGCCA
C4H3CR'	GRMZM2G147245	CTCCTTTCGTTGGTTTGTCC
4CL1AF'	GRMZM2G048522	tatggaccttccaccactcc
4CL1AR'	GRMZM2G048522	gagacaagaggcttgctgct
4CL1BF'	GRMZM2G048522	TCTCCCATCCTAGGTTACCG
4CL1BR'	GRMZM2G048522	CATGCCAGGATTTAGTGCAT
4CL1CF'	GRMZM2G048522	AACCTAGGTGTGAGTCGTTGC
4CL1CR'	GRMZM2G048522	TTCATTGACGCAAATTCACA
4CL1DF'	GRMZM2G048522	ATATTGACAATGCACTCATCAAAG
4CL1DR'	GRMZM2G048522	ACATGTTGCAACGACTCACA
4CL2AF'	GRMZM2G075333	catcgtctccttcttcttctct
4CL2AR'	GRMZM2G075333	ctacggaaccttctcagacctt
4CL2BF'	GRMZM2G075333	GTCCCAGTCAACGAACAACA
4CL2BR'	GRMZM2G075333	CTGGAAGTGGCCAAGAGG
4CL2CF'	GRMZM2G075333	GAGGAGGAATGGAAGACGTG
4CL2CR'	GRMZM2G075333	CTGGGGCTGTTGTTTCGTT
4CL2DF'	GRMZM2G075333	GTCTCCAGTTCACAACCG
4CL2DR'	GRMZM2G075333	GAGCTGAGCTGAGCACTGA
4CL2EF'	GRMZM2G075333	GGCCCTGGAATCTGTGATAA
4CL2ER'	GRMZM2G075333	GTGTACCTCCACCCAATTCC
4CL2FF'	GRMZM2G075333	AGGAAGCCAATTGACCGTAG
4CL2FR'	GRMZM2G075333	TTTTAAACTAAGCAACGCCAAA
4CL3AF'	GRMZM2G055320	GAATTGAATAGGCAATGCTTGA
4CL3AR'	GRMZM2G055320	CCCTCTGATATATCGCCCAA
4CL4AF'	GRMZM2G096020	GCTCGTCACAGTTACAGAACG
4CL4AR'	GRMZM2G096020	AGGTGCGCAGTAGCCTTCCT
4CL5AF'	GRMZM2G122787	TACGGCTGCAGCATGTAGA
4CL5AR'	GRMZM2G122787	CTTGTCCGCCAAGACTGTAG
4CL6AF'	GRMZM2G433624	CACGCCTGTACAGAGAGCAC
4CL6AR'	GRMZM2G433624	TGGCTCGGGATACAAGTAGA
4CL7AF'	GRMZM2G054013	CACCTCTCGCCATACCTACC
4CL7AR'	GRMZM2G054013	AGAGACGAGGCGGAAATAAA
4CL7BF'	GRMZM2G054013	GCTGGACGATAGACGATGG
4CL7BR'	GRMZM2G054013	AGAATTTGTGCAATGGTTGG
4CL7CF'	GRMZM2G054013	AAGGGTTAGGTACGAGCGAA
4CL7CR'	GRMZM2G054013	GTGTCCACGTATGACTTGCC
4CL7DF'	GRMZM2G054013	AAACTGATATGATCCGTATGTCG
4CL7DR'	GRMZM2G054013	GTGAAGTAGTTGCGTGCGA
4CL7EF'	GRMZM2G054013	GATGTTAAGCGGGATCGAAT
4CL7ER'	GRMZM2G054013	CTCAGGTTTGTGCGGTTGT
4CL8AF'	GRMZM2G174574	TCCCGTAAGCTGAACAACCT
4CL8AR'	GRMZM2G174574	AAGGGGTTCTTATTTTCCGAAG

Nombre cebador	Maize genome version 5b.60	Secuencia cebador
4CL8BF'	GRMZM2G174574	ACTGAAACCTGCGGGATAAT
4CL8BR'	GRMZM2G174574	GCATTAACGATCTTTGCTTCA
CCR1AF'	GRMZM2G107076	CTCACTGATGGCTATCTTTGCT
CCR1AR'	GRMZM2G107076	GTACTAGGGATGCGGTTGGT
CCR1BF'	GRMZM2G107076	GACGTGCTCGTCTTCAACTC
CCR1BR'	GRMZM2G107076	GTTAGCCAGCCAGACAGACA
CCR2AF'	GRMZM2G057328	GCAAAGGGTCCAAAAATGAC
CCR2AR'	GRMZM2G057328	GCGTACCCACCCAAAAATAC
CCR2BF'	GRMZM2G057328	ACGGACAAATCAGCGACATA
CCR2BR'	GRMZM2G057328	GCTCAGTCGGTAAAGCACAA
CCR3AF'	GRMZM2G131205	GGGGGAGGAGACCTAAAAAC
CCR3AR'	GRMZM2G131205	TGCAGCTGCTCTTCTAGCTC
CCR3BF'	GRMZM2G131205	CTATAAATTCCGCGCCACTC
CCR3BR'	GRMZM2G131205	GTGATGACGACGATCGAGTT
CCR3CF'	GRMZM2G131205	GCCCTCGCGTACATACAGT
CCR3CR'	GRMZM2G131205	CGGGTTAGGTGAGGCAAC
CCR4AF'	GRMZM2G110881	CACAGATATCAGATAAGTTGTGGCT
CCR4AR'	GRMZM2G110881	AACTATATGTGACGGTGGCAA
CCR4BF'	GRMZM2G110881	AATCCTCAAATGGTCCGAAT
CCR4BR'	GRMZM2G110881	GTCCCCGAATCAATCACAG
CCR4CF'	GRMZM2G110881	GGCTGCACAGAGGAGTACAA
CCR4CR'	GRMZM2G110881	TCAGGTGACTGATGGACTCG
CCR5AF'	GRMZM2G099420	TGCTGGTTGGCCTCTACTC
CCR5AR'	GRMZM2G099420	GAGCCAGAGAGAGGTCGTG
CCR5BF'	GRMZM2G099420	CAGTGTGGAGGGTACCAATG
CCR5BR'	GRMZM2G099420	AGAACGAGGGGTAGGGAATC
CCR5CF'	GRMZM2G099420	TCACGTTCTGTGACCATATCA
CCR5CR'	GRMZM2G099420	GGATACGCCAGGAAAGACAT
CCR6AF'	GRMZM2G050076	CTGGGTAGGAAATGGACTTCA
CCR6AR'	GRMZM2G050076	GTGTGAGGTGTGCCTGTGA
CAD1AF'	GRMZM5G844562	GCACAGAAGATCATGCTGGA
CAD1AR'	GRMZM5G844562	GGGTAGTGCATCTTTCTGG
CAD1BF'	GRMZM5G844562	TGCCGCTTACGTGAATAGTT
CAD1BR'	GRMZM5G844562	CGCTGATGTTTCAATCCAAC
CAD2AF'	GRMZM2G118610	AGGCTCTTACAGGCTCTTC
CAD2AR'	GRMZM2G118610	TGAATGTTGTTCCAATGTTGC
CAD2BF'	GRMZM2G118610	CTGGCAGCAGCATTTGTATT
CAD2BR'	GRMZM2G118610	CTAGGCACCACGCAAGGTA
CAD3AF'	GRMZM2G046070	GGATGGAGCAGCTCTGATTT
CAD3AR'	GRMZM2G046070	TCTCTTGCTGCTCAAATTCTC
CAD4AF'	GRMZM2G700188	GGTTTAGTTCACCTTCATTCCA
CAD4AR'	GRMZM2G700188	CAGACTTCCTACAACTTCTCCAA

Nombre cebador	Maize genome version 5b.60	Secuencia cebador
CAD5AF'	GRMZM2G443445	TAAGGTTTGGTCGTTTCGTGA
CAD5AR'	GRMZM2G443445	CTTTACGCCACGTGGTACTC
CAD6AF'	GRMZM2G090980	TTCAACGACGCTTCTGTAATG
CAD6AR'	GRMZM2G090980	TTCACCAGCGAAGTATGTACG
CAD7AF'	GRMZM2G167613	CTGCCATATCGTTTCATGCT
CAD7AR'	GRMZM2G167613	GGGTAGGTCGACCATCATCT
CAD7BF'	GRMZM2G167613	GTTTGGTCCCACGTGATTT
CAD7BR'	GRMZM2G167613	TTCTTCTCCAGCATGAAACG
CAD7CF'	GRMZM2G167613	CCTTTCTTTACACACCAACCC
CAD7CR'	GRMZM2G167613	TAACCCACGCCCTAGAATC
HCT1AF'	GRMZM2G035584	ACGGCAGCCTGGCTATAAA
HCT1AR'	GRMZM2G035584	GAAAAGGCAGGTAGCGTTAGG
HCT1BF'	GRMZM2G035584	GCCCAGCATTTTTCTTTTCT
HCT1BR'	GRMZM2G035584	CGGAGCGCCTTTTATAGC
HCT1CF'	GRMZM2G035584	GCCTCCTAGCTTGCCTTG
HCT1CR'	GRMZM2G035584	GTTTGGTGGGATGGATGAC
HCT1DF'	GRMZM2G035584	GCGCTGACTTGGATTGATT
HCT1DR'	GRMZM2G035584	CTTGTCAGGCCTCTCAGGTC
HCT2AF'	GRMZM2G158083	GGTGGAGTGTGGACCATGT
HCT2AR'	GRMZM2G158083	AGTGGCGATGAGTGGAGTT
HCT2BF'	GRMZM2G158083	TAAACCGATGGGTCCAATTT
HCT2BR'	GRMZM2G158083	TCTAGGCAGGAATGGCAGAT
HCT2CF'	GRMZM2G158083	TTGGCAATCATTTAACAACCTCC
HCT2CR'	GRMZM2G158083	AAATGTGAGTTCTCCAATAGTTCTCT
HCT2DF'	GRMZM2G158083	GCGGTAACAAGTTTGAATAGGA
HCT2DR'	GRMZM2G158083	GATGTTGTTTGGTTTTTGTAAACATT
CCoAOMT1AF'	GRMZM2G127948	CACGGATCAGGTCATCAGAC
CCoAOMT1AR'	GRMZM2G127948	TGTGGGTTGGTTGGTGTG
CCoAOMT1BF'	GRMZM2G127948	ACAATCCACACCCACCAAC
CCoAOMT1BR'	GRMZM2G127948	CGTGCGTTTGGTGAAGAG
CCoAOMT1CF'	GRMZM2G127948	TTATAGGAGAGATTTCCACGAC
CCoAOMT1CR'	GRMZM2G127948	ACCAACCCACTCTTGCTTTC
CCoAOMT1DF'	GRMZM2G127948	TGATGAGCTTCTCCGTGGTA
CCoAOMT1DR'	GRMZM2G127948	TGGTAGACCGATGTTCTTGC
CCoAOMT2AF'	GRMZM2G099363	AGGTCCGACAGTCAGAGTCA
CCoAOMT2AR'	GRMZM2G099363	TTTGGTCAGAGGGCTGTGT
CCoAOMT2BF'	GRMZM2G099363	ATGGACGATGATTGATGCAC
CCoAOMT2BR'	GRMZM2G099363	TGACTCTGACTGCCGACCT
CCoAOMT2CF'	GRMZM2G099363	CGTACCAGGTGTCGCTCTT
CCoAOMT2CR'	GRMZM2G099363	GATGTCTGGATGCCACTCAC
CCoAOMT2DF'	GRMZM2G099363	CCGATCGAGTGGTATGTTGT
CCoAOMT2DR'	GRMZM2G099363	GGAAGGAGTGGCTAATGAGG

Nombre cebador	Maize genome version 5b.60	Secuencia cebador
CCoAOMT3AF'	GRMZM2G077486	CCATGATTGTATATGTGGTTGGA
CCoAOMT3AR'	GRMZM2G077486	ACTTAAGGCAACGAATGCTATG
CCoAOMT3BF'	GRMZM2G077486	GCAACGACTGCTATGCAAAC
CCoAOMT3BR'	GRMZM2G077486	TTATTGAGCTGGTGGTGGAA
CCoAOMT3CF'	GRMZM2G077486	TTCAGTATGCACAACCCATT
CCoAOMT3CR'	GRMZM2G077486	CACGCTTGACAGAAGGA
CCoAOMT4AF'	GRMZM2G332522	GTCTACGGCAGTTTGCTTTG
CCoAOMT4AR'	GRMZM2G332522	CCATCTGCTGCTGCTGTATT
CCoAOMT4BF'	GRMZM2G332522	AACTAACGCGAGCTCCAGAC
CCoAOMT4BR'	GRMZM2G332522	CTGGTTTGGTTGGGTTGG
CCoAOMT4CF'	GRMZM2G332522	CTGGGCAACCTGGACGAG
CCoAOMT4CR'	GRMZM2G332522	CAGCTGCTCGTGGTAATTGA
F5H1AF'	AC210173.4_FGT005	CCTATCCAGTGCATGCAACATTAGC
F5H1AR'	AC210173.4_FGT005	TTCCCAGCTATTTATTCCAACCAGCT
F5H2AF'	GRMZM2G100158	CCCATTGCCATCTCTATCCT
F5H2AR'	GRMZM2G100158	CAGCACCTGCTTCCTTTTT
F5H2BF'	GRMZM2G100158	CGCCAGTGTATATGGGTGAC
F5H2BR'	GRMZM2G100158	ATAGCCGGAGGAGTAGGTGA
F5H2CF'	GRMZM2G100158	AGCAATTTACTCAAAATGGTTG
F5H2CR'	GRMZM2G100158	AGTAATTGACCCGTCGACCT
C3H1AF'	GRMZM2G138074	ACTGTCCAGTCGTGTCGATG
C3H1AR'	GRMZM2G138074	TTATGGAGCTAGCCGGACTG
COMT1AF'	AC196475.3_FGT0045	CACCACCTCGTCCCTCTT
COMT1AR'	AC196475.3_FGT0045	CGGTGGAGACTGGAGAGAG
COMT1BF'	AC196475.3_FGT0045	CAACTATCGGCGACAGAAAC
COMT1BR'	AC196475.3_FGT0045	GCTCACCACCACCACAC
COMT1CF'	AC196475.3_FGT0045	GGGGGTTTTCTTAAGTTAGGC
COMT1CR'	AC196475.3_FGT0045	CTGCATAGTGGTAACGTGCAT
COMT2AF'	GRMZM2G082007	ATGGTCTGCAAGATGACGTG
COMT2AR'	GRMZM2G082007	CCTGTTTATGGGGTTGTCGT
COMT2BF'	GRMZM2G082007	TGCGTTACATCTGCGTATCA
COMT2BR'	GRMZM2G082007	GACCGTGCATTTGAAAGAGA
COMT3AF'	GRMZM2G423331	AAACATGGACTCGGTTGTCC
COMT3AR'	GRMZM2G423331	CTTGCATGCTCTCTTTGCTC
COMT3BF'	GRMZM2G423331	CATAAACATGCCCCACAATC
COMT3BR'	GRMZM2G423331	TTGGTAATGGAAGGCTAGGG
CesA6AF'	GRMZM2G113137	GTGGGAGGGCAAGCAGTA
CesA6AR'	GRMZM2G113137	GAGCGACTGGGATGGTGTAT
CesA6BF'	GRMZM2G113137	GGCCAAGGAACAATCAGTG
CesA6BR'	GRMZM2G113137	AAAGGAAATAAAGGCGGTAGG
CesA6CF'	GRMZM2G113137	ACGATAATTCATCACTGCCA
CesA6CR'	GRMZM2G113137	TTTATTATTGCGCGACGAC

Nombre cebador	Maize genome version 5b.60	Secuencia cebador
CesA7AF'	GRMZM2G025231	ATTCTTGCATCGCCGTTAT
CesA7AR'	GRMZM2G025231	ATTATTCAGCTGCTGCGATG
CesA8AF'	GRMZM2G177631	TATACCAGAGCCGGAGCAG
CesA8AR'	GRMZM2G177631	GCGAAATGCACGTAGTCCT
CesA8BF'	GRMZM2G177631	GGTGTGCTGTTAACCTTCC
CesA8BR'	GRMZM2G177631	ATTGGACTGACAGTGGGTGA
CesA8CF'	GRMZM2G177631	AAGGGCTAATTTGGAAACCA
CesA8CR'	GRMZM2G177631	GCGACACCTGATGTGAACTT
CesA8DF'	GRMZM2G177631	ACGCAACACTACTCATAGCCA
CesA8DR'	GRMZM2G177631	TGGCTTTACAACCATTAACACA
CesA8EF'	GRMZM2G177631	CCTTCCTTGAGTTCATCACG
CesA8ER'	GRMZM2G177631	GCCGAGTGGTCAAAGTTTTT
CesA11AF'	GRMZM2G037413	CATGGGCTACCGCTATATCA
CesA11AR'	GRMZM2G037413	GTGTGATAGCTGGGTGTTGG
CesA11BF'	GRMZM2G037413	ATATCTGGGCTAAGACATCAGGT
CesA11BR'	GRMZM2G037413	GGTTGGTAGGTTCCGTTGAT
CesA11CF'	GRMZM2G037413	ATGCACTGCAGCAAGACG
CesA11CR'	GRMZM2G037413	GAAGCTCATGTCTTCGGAAA
CesA11DF'	GRMZM2G037413	TCGAGCACATGCTTGGTAAT
CesA11DR'	GRMZM2G037413	GCTTGGCTTCTGTTCTTCT
CesA11EF'	GRMZM2G037413	CGAGGGTTGTGTCGTATGTT
CesA11ER'	GRMZM2G037413	GCACTACCACTCCTCCACCT
CesA12AF'	GRMZM2G142898	GATAGTAGCATCAGGCGCAA
CesA12AR'	GRMZM2G142898	AGCTCGTGTGGTTGGGT
CesA12BF'	GRMZM2G142898	CAAGTCTCGGTTGGTCGAG
CesA12BR'	GRMZM2G142898	CGCTAAGTGAAGCGAAATCC
CesA12CF'	GRMZM2G142898	CATAGACATTAACAAGTCCACACG
CesA12CR'	GRMZM2G142898	ACTGCGGATAGCCTTAGTGAC
COMT3'F'	AC196475.3_FGT0045	TCTGCGTCGAATTGTCTCTGC
COMT3'R'	AC196475.3_FGT0045	GAGAGCAATTAACCCGCATGT
actin1F'	GRMZM2G126010	TTTAAGGCTGCTGTACTGCTGTAGA
actin1R'	GRMZM2G126011	CACTTTCTGCTCATGGTTTAAGG
copiaF'	Genbank #AF398212	CGATGTGAAGACAGCATTCT
copiaR'	Genbank #AF398212	CTCAAGTGACATCCCATGTGT
Alpha-3-tubulinF'	AC195340.3_FG001	AGGAGCCTCACGCAGATAAA
Alpha-3-tubulinR'	AC195340.3_FG001	CCTGCGGTAGAGGATGTTGT

Tabla 5. Secuencia de los cebadores usados para realizar ChIP qPCR empleando inmunoprecipitaciones de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.

F' y R': Significa que el cebador está ubicado en la cadena directa o reversa, respectivamente.

3.2.9 Preparación de librerías para CHIP-Seq empleando la plataforma Solexa-Illumina

Para la generación de librerías se modifico el protocolo elaborado por el Dr. Kengo Morohashi (2011), el cual es investigador del grupo del Dr. Erich Grotewold, con el fin de emplearlo con material proveniente de maíz. Esta labor se efectuó en colaboración con Isabel Cristina Velez del laboratorio de la Dra. Montserrat Pages del Departamento de Genética Molecular del CRAG, Barcelona. El diseño experimental de las librerías se muestra en la figura 14. Para la elaboración de cada CHIP se empleo material proveniente de cuatro plantas de maíz de 9 días de edad, con el cual se generaron pools que se cross-linking y sonicaron conjuntamente (n:4). De cada *pool* se extrajo material para generar un input y tres inmunoprecipitaciones (α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42). Posteriormente, se procedió a verificar que los CHIP estaban enriquecidos analizando los niveles de *ZmCOMT* empleando qPCR. Finalmente, se unió material proveniente de tres *Input* o tres CHIP para generar cada librería (n:16).

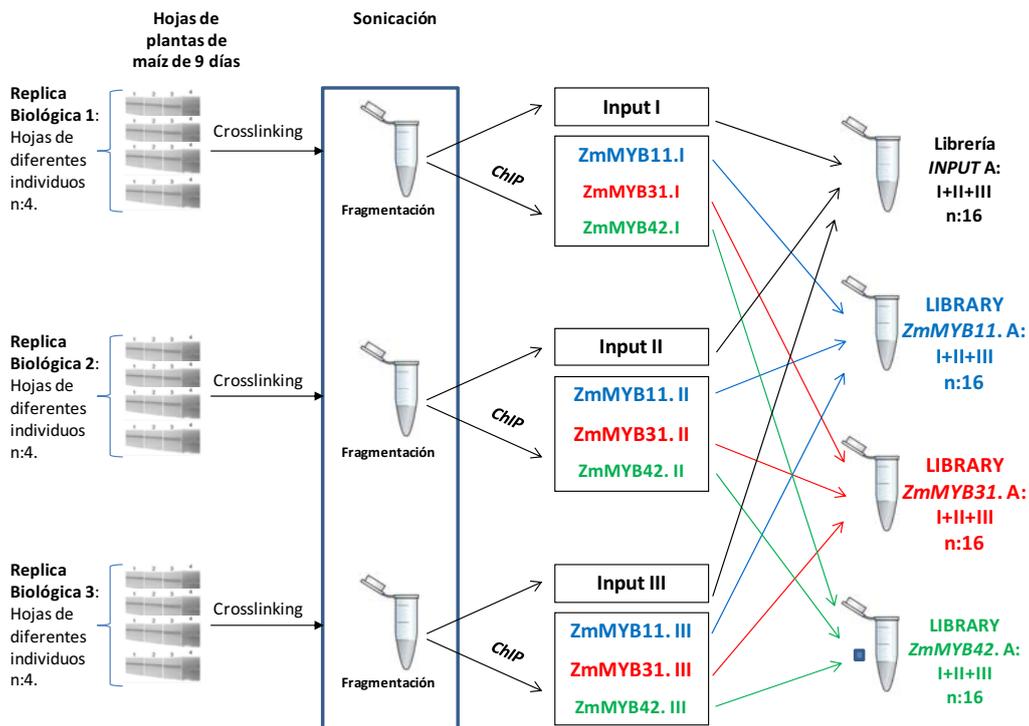


Figura 14. Diseño experimental de la generación de librerías de CHIP de maíz.

En la figura se observa el procedimiento general llevado a cabo para la generación de una réplica biológica de librería. Para la elaboración de cada réplica biológica se utilizó la base de la hoja (4 cm) de cuatro plantas de maíz de 9 días de edad (300 mg). Todas las librerías se produjeron siguiendo este esquema.

El protocolo de generación de librería consta de los siguientes pasos básicos:

1. Reparación del final de los fragmentos de ADN
2. Adición de colas "A"
3. Ligación de adaptadores
4. Fraccionamiento de tamaño por gel de agarosa o empleando *AMPure beads*
5. Amplificación por PCR (~ 15 a 18 ciclos)
6. Purificación
7. Cuantificación y control de calidad de las librerías

Para la reparación de los fragmentos de ADN se emplea la siguiente reacción:

~30 µl de ChIP, 5 µl de 10x T4 DNA ligase *buffer* con 10mM ATP, 2 µl 10mM dNTP mix, 0.5 µl T4 DNA polimerasa (3U/ µl) (NEB), 0.5 µl Polimerasa ADN Klenow (NEB) diluida 1:5 en agua libre de DNasas (1U/ µl), 0.5 µl T4 PNK (10U/ µl) (NEB) y agua libre de DNasas hasta 50 µl.

Seguidamente esta reacción se incuba a 20 °C durante 45 minutos en un termociclador y luego se purifica el ADN utilizando *PCR purification kit (QIAGEN)* siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se hace con 35 µl de *elution buffer (EB)*.

La adición de las bases "A" a los extremos 3' de los fragmentos de ADN se llevó a cabo usando la siguiente reacción:

34.5 µl de muestra de ADN, 5 µl de NEB *buffer 2*, 10 µl de 1mM dATP, 0.5 µl de Klenow exo (3' to 5' exo minus) (5U/ µl) (NEB) y agua libre de DNasas hasta completar 50 µl de reacción.

Esta reacción es incubada a 37 °C por 30 minutos en un termociclador y posteriormente, se efectúa la purificación del ADN empleando el *mini Elute purification Kit (QIAGEN)*. Las muestras finalmente son eluidas en 13 µl de agua libre de DNasas.

Para la ligación de los adaptadores a los fragmentos de ADN, se diluye el *adapter oligo mix* (15 μ M) a 1:10 (para una concentración final de 1.5 μ M) en agua libre de DNAsas y la T4 DNA ligasa Ultrapura (Enzymatics, 600U/ μ l) a 1:10 en 1x T4 *ligase buffer* de T4 DNA ligasa Ultrapura.

A continuación se prepara la siguiente reacción:

13 μ l de muestra de ADN, 15 μ l de 2x Rapid DNA *ligase buffer* de T4 DNA ligasa Ultrapura, 1 μ l de *adapter oligo mix* diluido, 1 μ l de T4 DNA ligasa Ultrapura (Enzymatics) diluída (1/10) y se ajusta la reacción hasta 30 μ l con agua libre de DNAsas. Esta reacción es incubada a temperatura ambiente por 15 minutos y purificada usando *miniElute QIAGEN purification kit*. La muestra se eluyó en 30 μ l de EB.

En este paso se realiza el fraccionamiento de las muestras con el fin de que los fragmentos de ADN presenten un tamaño de entre 200-400 bp y de eliminar la contaminación por residuos de adaptadores y adaptadores autoligados. Para tal fin, se procedió a tratar las muestras utilizando la tecnología *AMPure beads* (AGENCOURT) y a realizar una elución final en 50 μ l de EB. Es necesario anotar que hay que llevar a cabo una calibración del ratio *AMPure beads*:muestra de cada lote de *AMPure beads*, ya que modificando dicho ratio se modifica el tamaño de los fragmentos de ADN eliminados.

Posteriormente se lleva a cabo el enriquecimiento de fragmentos de ADN modificados con adaptadores, para lo que se prepara la siguiente reacción de mix de PCR:

25 μ l de ADN (guardar 25 μ l), 10 μ l de 5x HF Phusion buffer, 1.5 μ l de 10mM dNTP, 1 μ l de PCR 1.0 primer (25 μ M), 1 μ l de PCR 2.0-Index primer (25 μ M), 0.5 μ l de Phusion Hot polymerase (source, units) y 11 μ l de agua libre de DNAsas hasta 50 μ l.

La amplificación se realiza empleando el siguiente programa de PCR:

- a. 30 segundos a 98 °C
- b. 18 ciclos
40 segundos a 98 °C
30 segundos a 65 °C
30 segundos a 72 °C
- c. 5 minutos a 72 °C
- d. 10 °C α

EL producto de PCR es purificado empleando *mini Elute purification Kit (QIAGEN)*. La elución final se realiza en 12 ul de EB. Finalmente, las muestras son analizadas empleando *Bioanalyzer* para verificar la concentración y la calidad. Si se observan residuos de adaptadores o adaptadores autoligados (123 bp), se repite el proceso de descontaminación utilizando la tecnología *AMPure beads (AGENCOURT)* y se examinan nuevamente las muestras usando el *Bioanalyzer*. Finalmente, antes de la secuenciación se cuantifica la concentración de las librerías usando *Qubit (Invitrogen)*.

3.2.10 Experimentos de expresión transiente en protoplastos de Zea mays

3.2.10.1 Transformación transiente de protoplastos Zea mays

El material empleado para la obtención de protoplastos fue la segunda hoja de plantas de *Zea mays* (maíz) de la línea híbrida B73 x MO17, crecidas durante 13 días en condiciones de oscuridad a una temperatura de 28 °C y una humedad del 70%.

Se conformaron pools de 12 hojas y se cortaron transversalmente empleando cuchillas quirúrgicas. Las tiras de material generado se almacenaron en un erlenmeyer con una solución de lisis y fueron sometidas a vacío durante 15 minutos. A continuación, el erlenmeyer con el material vegetal fue puesto en agitación a 50 rpm durante 2.5 horas en oscuridad y seguidamente a 90 rpm por 30 minutos más. El aislamiento de protoplastos se efectuó mediante el uso de un filtro de 35 um de poro en que se retienen los fragmentos residuales. En el filtro se llevó a cabo un lavado con 10 ml de buffer A. Se prosiguió realizando una centrifugación a 1000 rpm por 2 minutos y la

eliminación del sobrenadante conservando solo 1 ml de volumen. Los protoplastos fueron resuspendidos en 10 ml de buffer A y se repitieron los pasos de filtración, lavado y centrifugación. Por último, los protoplastos fueron resuspendidos en el volumen requerido para tener una densidad de 1×10^5 .

Los protoplastos fueron transformados mediante electroporación. Para la realización de experimentos de localización subcelular se emplearon 20 μg de ADN plasmídico y para ensayos de Luciferasa se utilizaron 15 μg de ADN para construcciones efectoras y reporteras y 10 μg de ADN para el vector con *Renilla*.

El ADN fue llevado a un volumen de 150 μl por adición de buffer A y combinado con 150 μl de protoplastos (1×10^5), seguidamente la mezcla fue puesta en cubetas de electroporación de 2 mm y posteriormente se electroporan a 0.15V, con dos pulsos a 200 μs . Los protoplastos electroporados fueron recuperados de la cubeta con 700 μl de buffer A y se transfirieron a un nuevo *ependorf*. Para finalizar, las muestras fueron almacenadas entre 14 y 22 horas a temperatura ambiente, en oscuridad y posición horizontal.

Buffer A: 0.6M Manitol, 10mM KCL, 10mM MES.

Solución enzimática: Se prepara inicialmente una solución con 10 ml de *buffer A*, 0.3 g de Celulasa y 0.06 g de macerozima, se realiza una incubación por 10 minutos a 55 °C y se lleva a temperatura ambiente insertando la solución sobre hielo. Por último, se adicionan 50 μl 1M CaCl₂ y 100 μl 10% BSA.

3.2.10.2 Ensayos reporteros de luciferasa

Se efectuaron ensayos de Luciferasa en protoplastos de maíz transfectedados, por una parte con una construcción reportera en la que el promotor de *ZmCOMT* esta fusionado al gen *Firefly Luciferase* (*ZmCOMT::LUC*, obtenido de una investigación previa, Xinhui 2011) y por otra, con las construcciones efectoras *35S::MYB11::GFP* y *35S::GFP* (Control). Adicionalmente, en todas las transfecciones se incluyó el vector

35S::Renilla (PHTT672, basado en el vector pRL-null de Promega) con el fin de usar la actividad *Renilla Luciferase* para normalizar los datos. En la tabla 6, se describen las construcciones utilizadas. Los ensayos se realizaron empleando el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison, WI). Después de transformar los protoplastos estos fueron almacenados entre 18-22 horas. Terminado el tiempo de incubación se analizó la eficiencia de transformación identificando el número de protoplastos transformados y no transformados, empleando microscopía confocal y la detección de la fluorescencia de la GFP. Se prosiguió con una centrifugación a 2200 rpm por 2 minutos, la remoción del sobrenadante y la adición de 80 ul de *passive lysis buffer*. Posteriormente, se realizó un vórtex fuerte durante 10 minutos a temperatura ambiente y una centrifugación a 10000 rpm por 2 minutos a 4 °C. El ensayo se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial y para la medición de la bioluminiscencia se uso el luminómetro Centro LB 960 (Berthold).

3.2.10.3 Adquisición de imágenes de fluorescencia mediante Microscopia Confocal

La localización subcelular de ZmMYB11, ZmMYB31 Y ZmMYB42 en protoplastos de maíz se efectuó utilizando un microscopio Confocal FV 1000 Olympus del Servicio de Imágenes del CRAG. Se emplearon las construcciones 355::ZmMYB11:GFP, 355::ZmMYB31:GFP (Xinhui 2011) y 355::ZmMYB42:GFP (Xinhui 2011).

3.2.11 Clonación de fragmentos de ADN provenientes de *Zea mays* mediante recombinación

En la tabla 6 se muestran los diferentes cebadores empleados para amplificar fragmentos de ADN a partir de maíz y en la tabla 7 las construcción empleadas.

Cebador	Secuencia
Unique Region MYB11 5´	<u>ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctcgcccatcaacgagcacacgtcc</u>
Unique Region MYB11 3´	<u>ggggaccactttgtacaagaaagctgggtggttgctgcactgcagtcgcgc</u>
ZmMYB11 5´	<u>ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctcgcgatccagtcgaagtcctca</u>
ZmMYB11 3´	<u>ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgtttcatctcgagtccttctgaagtc</u>

Tabla 6. Secuencia de los cebadores usados para el estudio de los *R2R3-MYB* ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42

Las bases subrayadas corresponden a los sitios de recombinación attB.

Nombre del plásmido	Vector	Resistencia	Información adicional
ZmMYB11-Entryclone	pDONR 221	Kanamicina	Clon de entrada Gateway
ZmMYB11-6xHis	pDEST17	Carbenicilina	Sobreexpresión de proteína
ZmMYB11-GST	pDEST15	Carbenicilina	Sobreexpresión de proteína
35S::MYB11:GFP	16LF-51(C-GFP) Procedente: Lab. JC Jang	Carbenicilina	<i>ZmMYB11</i> controlado por un promotor 35S y fusionado a GFP
35S::MYB31:GFP	16LF-51(C-GFP) Procedente: Lab. JC Jang	Carbenicilina	<i>ZmMYB31</i> controlado por un promotor 35S y fusionado a GFP. Procedente: (Xinhui 2011)
35S::MYB42:GFP	16LF-51(C-GFP) Procedente: Lab. JC Jang	Carbenicilina	<i>ZmMYB42</i> controlado por un promotor 35S y fusionado a GFP. Procedente: (Xinhui 2011)
Región Única ZmMYB11-Entryclone	pDONR 221	Kanamicina	Clon de entrada Gateway
Región Única ZmMYB11-6xHis	pDEST17	Carbenicilina	Sobreexpresión de proteína
Región Única ZmMYB31-6xHis	pDEST17	Carbenicilina	Sobreexpresión de proteína Procedente: (Xinhui 2011)
Región Única ZmMYB42-6xHis	pDEST17	Carbenicilina	Sobreexpresión de proteína Procedente: (Xinhui 2011)
<i>pZmCOMT::luc</i>	pMSZO11	Carbenicilina	Promotor conduciendo el gen reportero <i>Luciferase</i> en experimentos de transformación transitoria. Procedente: (Xinhui 2011)

Tabla 7. Construcciones empleadas para el estudio de los *R2R3-MYB ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42*.

3.2.12 Análisis de datos

3.2.12.1 Análisis filogénicos

Los alineamientos de secuencias se realizaron con el programa CLUSTAL W, versión 1.83, disponible en la *online* en <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>. Los parámetros empleados fueron los utilizados por Penning, B. W. (Penning et al 2009), en una investigación sobre las familias de genes involucradas con la síntesis de pared celular en maíz. Se efectuó un alineamiento por pares SLOW/ACCURAT. Los parámetros de múltiple alineamiento fueron *Gap Open Penalty* 10, *Gap Extensión Penalty* 0.05 y matriz de peso para proteínas GONNET. Los parámetros de alineamiento por pares fueron *Gap Open Penalty* 10, *Gap Extensión Penalty* 0.1 y matriz de peso para proteínas GONNET. Los análisis de fiabilidad de las relaciones establecidas se calcularon para mil replicas (bootstrapped 1,000 times) y fue

seleccionada la opción OUTPUT TREE=nj. Para la representación de los árboles filogénicos se empleó el programa online <http://www.trex.uqam.ca/>.

2.2.12.2 Análisis de datos de ChIP qPCR obtenidos por ChIP Nano qPCR y ChIP qPCR

Para la determinación de la ocupación de un sitio en el genoma por un TF(s), se empleó un método basado en el % de Input (Nagaki et al 2003), que es un parámetro ampliamente recomendado (Aparicio et al 2004, Haring et al 2007, Lin et al 2012, SABiosciences. & QUIAGEN. 2011, SIGMA-ALDRICH Online). En particular es sugerido para el tratamiento de datos de ChIP qPCR procedentes de plataformas de trabajo a gran escala como la empleada en esta investigación (nano qPCR), ya que la evaluación no depende directamente del uso de un control negativo que pueda introducir inestabilidad al análisis.

% de enriquecimiento con respecto al Input. La eficiencia de la inmunoprecipitación se calcula como la cantidad de producto de PCR en la inmunoprecipitación con respecto a la cantidad de producto de PCR en el Input, empleando el ciclo umbral (Ct) de las muestras.

1. Para cada pareja de cebadores se sustraen los CT (Input) de los CT (ChIP), para obtener un **$\Delta\text{Ct}[\text{ChIP Normalizado con relación al input}]$** . Este valor representa la diferencia en ciclos entre el ChIP y el Input. **$\Delta\text{Ct}[\text{ChIP Normalizado}]$** : $(\text{Ct} [\text{ChIP}] - (\text{Ct} [\text{Input}] - \log_2 (\text{Factor de dilución del Input})))$. Se almacenó una fracción de cromatina de 30 μl para generar el Input y se empleó una fracción de cromatina para realizar el ChIP de 100 μl . Por tanto, es necesario calcular un factor de dilución que haga equivalentes los CT del Input y del ChIP. La fracción de ChIP es 3.33 veces la fracción de Input. Siendo el *factor de dilución* de 3.33 y el valor en Ct a corregir en el Input: $\log_2 (3.33)$: 1.73 ciclos. Entonces, la ecuación anterior es la siguiente: **$\Delta\text{Ct}[\text{ChIP Normalizado}]$** = $(\text{Ct} [\text{ChIP}] - (\text{Ct} [\text{Input}] - 1.73))$.

2. Cálculo del % Input obtenido para una región en el genoma en un determinado ChIP (Conversión lineal del ChIP normalizado (**ΔCt**)). Al dividir la cantidad de DNA molde de

la fracción de cromatina del ChIP por la de la fracción de cromatina en el Input se determina la fracción del sitio en el genoma recobrada en el ChIP. **% Input** = $(2^{-\Delta Ct [CHIP \text{ Normalizado}]}) \times 100\%$. En este proyecto se emplearon 4 zonas como control negativo *copia*, *actin1*, *α -3-tubulin* y *COMT-3'*. Los dos primeros controles fueron validados en una revisión sobre la técnica en maíz (Haring et al 2007), *α -3-tubulin* fue diseñado por la Dra. Nathalie Bolduc del laboratorio de la Dra. Sarah Hake (Plant Gene Expression Center, University of California at Berkeley) y *COMT-3'* fue publicado por Fornale et al 2010b

Tratamiento de datos:

A. Se seleccionaron manualmente cada grupo de triplicados y se inspeccionaron las amplificaciones. Si las curvas se superponían y esencialmente, si el ciclo umbral (CT) de los triplicados técnicos eran cercanos entre si (El valor en Ct máximo y mínimo de se replica dentro de 0.5 ciclo, preferentemente dentro de 0,3 ciclos), se procedió a aceptar el ensayo. En caso contrario, se retiro el valor atípico o se descarto el ensayo cuando esto no fue posible (Aparicio et al 2004).

B. Todos los valores de Ct superiores a 35 o no detectables, fueron considerados como 35, ya que en este punto cualquier valor de Ct es considerado negativo.

Interpretación de datos: Se emplearon los criterio de evaluación sugeridos en el manual EpiTect ChIP qPCR Array Handbook para el análisis de datos de ChIP qPCR de plataformas a gran escala (SABiosciences. & QUIAGEN. 2011):

a. Cuanto más cerca este el Ct de la diana Ct [Diana] del Ct de los controles Ct[Con], el enriquecimiento se considera menor.

b. Los Ct promedios pueden ser usado para evaluar el enriquecimiento sobre el grupo de sitios genómicos en el arreglo (Array).

c. Si el **% Input [Diana] > 0,1%** y/o si el **% Input [Diana] - % Input [Control] > 0,01%**, se considera que probablemente el sitio esta enriquecido en el ChIP. Como mínimo se acepto un **% Input [Diana] > 0,05%**

d. Si el **% Input [Diana] < 0,1%** y él **% Input [Diana] - % Input [Control] < 0,01%**, se considera que no hay enriquecimiento con el anticuerpo empleado.

3.2.12.3 Identificación de la secuencia consenso *in vivo* de sitios de unión de factores de transcripción

Las regiones que fueron identificadas como enriquecidas en el CHIP de los *MYB-R2R3* estudiados fueron empleadas para identificar *in vivo* la secuencia con la que tienen mayor afinidad. Se empleo el programa MEME (versión 4.8.1) que analiza las secuencias por similitud entre ellas y produce una descripción (motivo) por cada patrón que descubre (Bailey & Elkan 1994) (<http://meme.nbcrl.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>). Los parámetros empleados fueron cualquier número de repeticiones, tamaño mínimo del motivo mayor o igual que 6 y tamaño máximo del motivo menor o igual que 9. Este programa fue empleado además para detectar en las regiones enriquecidas en los experimentos de CHIP, sitios de unión próximos a las cajas AC. Empleando las secuencias consenso *in vivo* identificadas, las cajas canónicas AC descritas en la bibliografía y la información de experimento de SELEX disponible, se genero un árbol para agrupar estos motivos empleando el software STAMP (<http://www.benoslab.pitt.edu/stamp/>). Las secuencias consenso *in vivo* generadas con meme fueron convertidas al formato TRANSFAC antes de ser empleadas para la generación del árbol. Los parámetros empleados en el programa fueron los sugeridos por sus desarrolladores que son: *Column comparison metric: Pearson Correlation Coefficient*, *Alignment method: Ungapped Smith-Waterman (Gap-open=1000, Gap-extend=1000, -nooverlapalign)*, *Multiple alignment strategy: Iterative Refinement* y *Tree-building algorithm: UPGMA*.

3.2.12.4 Procesamiento y análisis de datos de CHIP-Seq

El procesamiento inicial de los datos generados por la plataforma de secuenciación masiva fue utilizado el programa BOWTIE, que es un alineador de lecturas cortas (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). Para el llamado de picos de los datos obtenidos de la secuenciación de las librerías de CHIP-Seq fue usado el software MACS (Model-based Analysis for CHIP-), el cual, empíricamente modela la longitud de los fragmentos secuenciados de CHIP, que tienden a ser más cortos que las estimaciones de la sonificación o el tamaño de la construcción de las librerías, y lo utiliza para mejorar

la resolución espacial de sitios de unión previsto. (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>). Para realizar la localización de los picos de ChIP-Seq obtenidos con MACS, se usó el programa IGV 2.1 (Integrative Genomics Viewer: <http://www.broadinstitute.org/igv/node/236>). Hasta la fecha se ha procesado 1 replica biológica de ZmMYB31, ZmMYB42 y ZmINPUT y 2 replicas de ZmMYB11. El procesamiento de los datos de ChIP-Seq fue realizado en colaboración con María Katherine Mejía Guerra del laboratorio del Dr. Erich Grotewold.

3.2.12.5 Procesamiento de datos de Luciferasa

Cada muestra fue normalizada mediante la división de la actividad del gen reportero *Firefly* (F) por la actividad del gen control *Renilla* (R), generando el ratio F/R. Se efectuaron tres replicas técnicas y tres replicas biológicas. Para calcular un valor normalizado de *fold change* entre grupos, en este caso entre muestras control y muestras tratadas se empleo la siguiente ecuación (Schagat et al 2007): Δ Fold Activity = Promedio (F/R) muestra tratada/Promedio (F/R) muestra control.

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterización general de *ZmMYB11*

3.3.1.1 Identificación de nuevos miembros del subgrupo cuatro de los *MYB-R2R3* en maíz y estudio filogénico

Con el propósito de identificar nuevos genes de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro que podrían ser relevantes en cuanto a la regulación de la síntesis de lignina en maíz, se efectuó una búsqueda mediante análisis de homología de secuencia empleando los miembros del subgrupo cuatro de *Arabidopsis* y los ya identificados en maíz *ZmMYB8* (GRMZM2G041415), *ZmMYB31* (GRMZM2G050305), *ZmMYB42* (GRMZM2G419239) (Fornale et al 2006) y *ZmMYB38* (GRMZM2G084583) (Franken et al 1994), en la base de datos "*maizesequence*" que almacena el genoma de maíz de la variedad B73 (Versión 5b.60). Esta búsqueda dio como resultado la identificación de 6 nuevos genes *ZmMYB11* (GRMZM2G000818), *ZmMYB10* (GRMZM2G395672), *ZmMYB163* (GRMZM2G405094), *ZmMYB25* (GRMZM2G431156), *ZmMYB32* (GRMZM2G160838) y *ZmMYB85* (GRMZM2G077789). Esta labor se efectuó con Khaterine Mejia-Guerra en el marco de una colaboración con el laboratorio del Dr. Erich Grotewold y los resultados fueron depositados en la base de datos Grassius.

Posteriormente, con el fin de asociar la relación evolutiva entre los genes *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro con su función biológica, se realizó un análisis filogénico incluyendo los miembros en *Arabidopsis* y otras monocotiledóneas gramíneas como *Oryza sativa ssp. japonica*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor* y *Panicum virgatum* y se recopiló la información disponible en la literatura.

Los resultados indicaron que *ZmMYB11* (GRMZM2G000818, en la base de datos *maizesequence*) es el gen no estudiado hasta la fecha más cercano a los genes que ya se les ha asignado un papel en la regulación de la síntesis de los monolignoles (Figura 15).

Seguidamente, se efectuó un análisis *in silico* del patrón de expresión de los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro empleando los datos almacenados en las bases de datos de RNA-Seq de maíz (Secuenciación masiva del transcriptoma) y de análisis de expresión empleando micro-arreglos de ADN (Figura 16. A y B).

Los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro en general se expresan en la hojas y *ZmMYB38*, *ZmMYB11*, *ZmMYB31*, *ZmMYB163*, *ZmMYB8* y *ZmMYB32*, tienen una amplia distribución en la planta. Dado que *ZmMYB11* presenta un amplio patrón de expresión y como ya se mencionó, es filogenéticamente cercano a genes ya descritos como relevantes en la regulación de la síntesis de lignina, se consideró como un candidato a ser estudiado en la presente investigación, por lo cual se verificaron los resultados obtenidos *in silico* mediante semi qPCR. La acumulación de transcritos de *ZmMYB11* se presento en diferentes órganos de la planta, coincidiendo con los resultados *in silico* (Figura 17. A).

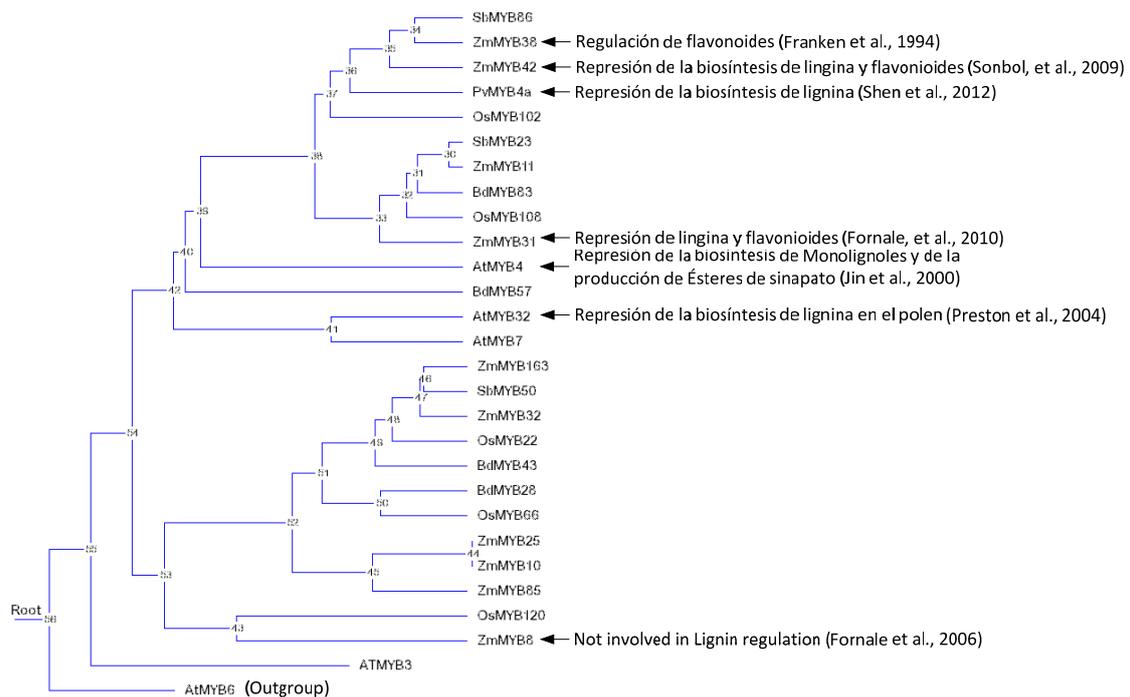


Figura 15. Árbol filogenético de los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro en *Arabidopsis* y las gramíneas monocotiledóneas maíz, *Oryza sativa ssp. japonica*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor* y *Panicum virgatum*.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las base de datos *PLAZA 2.5* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>) y *MaizeSequence* (<http://www.maizesequence.org>). Las secuencias fueron alineadas empleando *CLUSTAL W* y se efectuaron 1000 réplicas (*bootstrap*). *AtMYB6* se empleo como *Outgroup*.

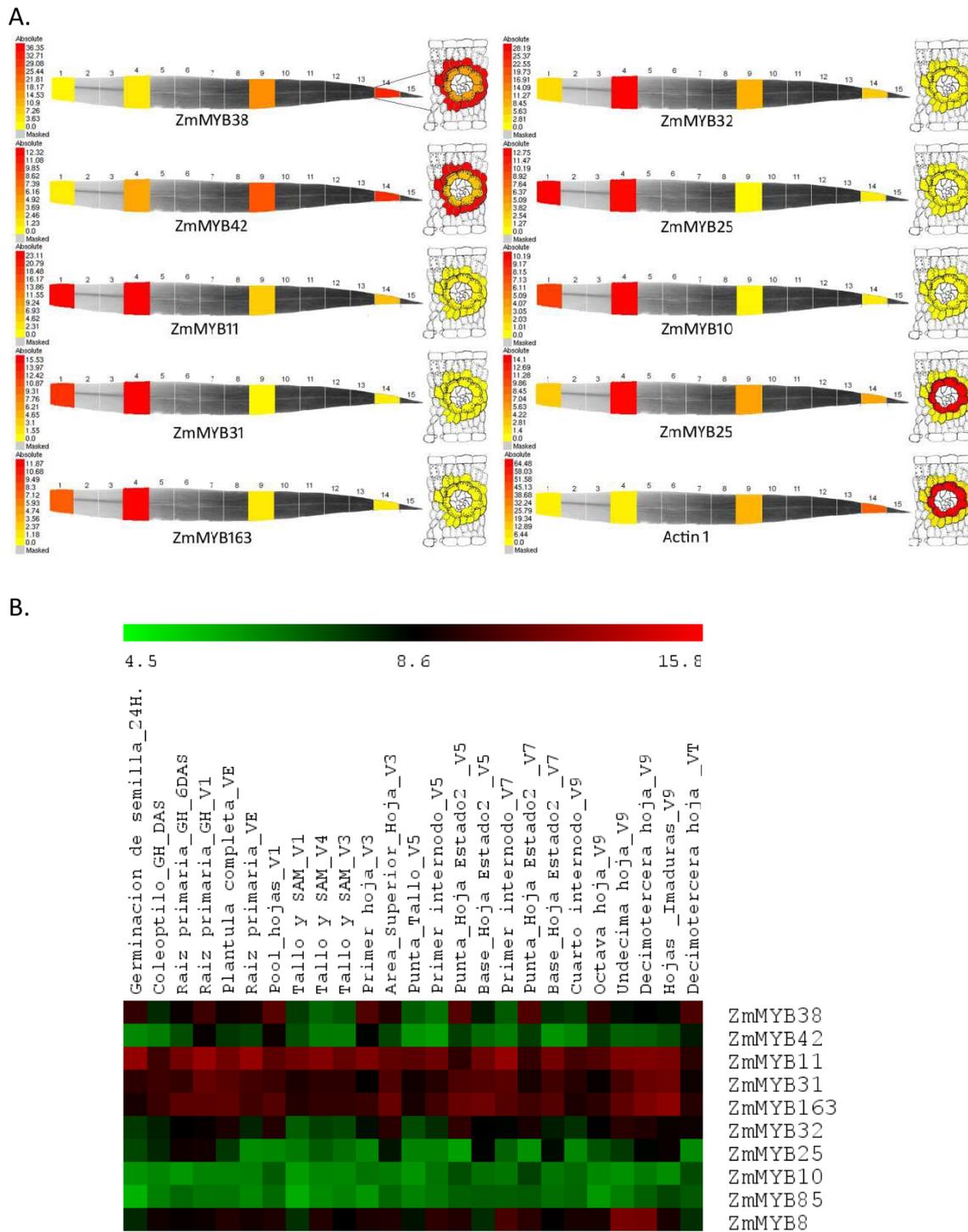


Figura 16. Patrón de expresión de los R2R3-MYB del subgrupo cuatro en tejidos de maíz.

A. Representación eFPs (Pictograma electrónico fluorescente) del perfil de expresión de los R2R3-MYB del subgrupo cuatro en lígulas de las hojas 2 y 3 de plántulas de 9 días de maíz (variedad B73). Cuantificación absoluta, RPKM (Lecturas por kilobase del modelo de exón por millón de lecturas ubicadas). No hay datos disponibles para *ZmMYB10*. El gen *actin1* se muestra como referencia (www.bar.utoronto.ca). Los cortes transversales de hoja presentados corresponden a la zona marcada como 14 (Li et al 2010). B. *Heat map* del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los R2R3-MYB del subgrupo cuatro. El *Heat map* fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión génica, respectivamente. Los datos fueron extraídos de Genome-wide atlas de transcripción (Sekhon et al 2011).

Seguidamente, se analizó si la acumulación del transcrito de *ZmMYB11* es inducida por herida (característica típica de los genes que hacen parte de la ruta de los fenilpropanoides) para lo que se efectuó una cinética utilizando PCR semi-cuantitativa. Los resultados indicaron que *ZmMYB11* se induce por herida después de una hora de infringir daño mecánico a la hoja (Figura 17. B). De acuerdo a los resultados obtenidos tanto filogénicos como de expresión se concluyó que *ZmMYB11* podría ser relevante en la regulación de la síntesis de lignina y fue seleccionado para ser caracterizado en la presente investigación. Este proyecto se enfoca por tanto, en el estudio de *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, que ya se han descrito como relevantes en el control de la biosíntesis de lignina y de *ZmMYB11*, un nuevo miembro del subgrupo cuatro identificado.

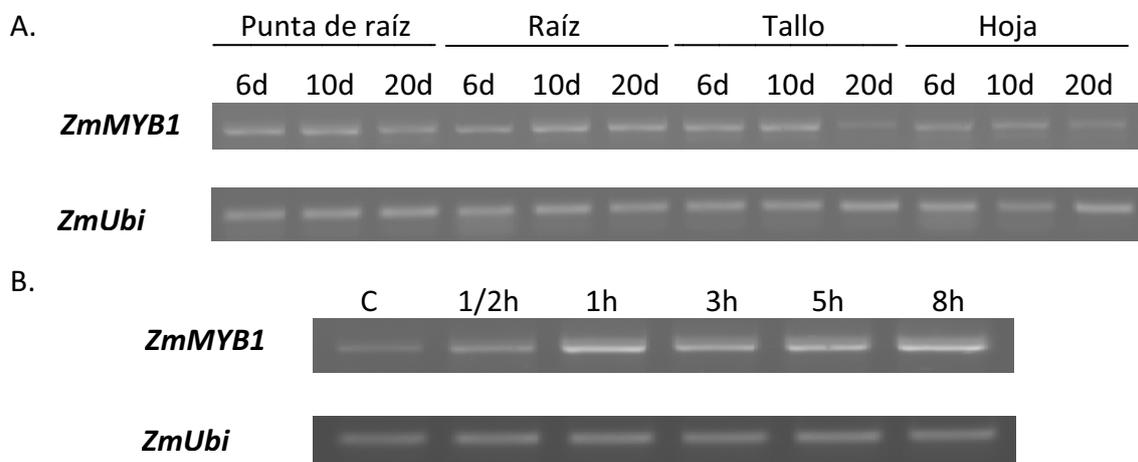


Figura 17. *ZmMYB11* tiene un patrón de expresión ubicuo y se induce por herida.

A. Expresión de *ZmMYB11* en diferentes tejidos de maíz mediante RT-PCR semicuantitativa (Datos sin publicar, Silvia Fornale). B. Cinética de acumulación del transcrito de *ZmMYB11* en la hoja en respuesta a herida (Datos sin publicar, Silvia Fornale). Como control de la concentración del cDNA se amplificó un fragmento del gen *actin1*.

2.3.1.2 Localización subcelular de *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42*

Para establecer la localización subcelular de *ZmMYB11*, se realizó un ensayo transiente en el que se transformaron protoplastos de maíz con la construcción 35S::*ZmMYB11*:GFP y seguidamente, se efectuó un procedimiento similar con 35S::*ZmMYB31*:GFP y 35S::*ZmMYB42*:GFP. La proteína *ZmMYB11* se ubica en el núcleo y el citoplasma al igual que *ZmMYB31*, mientras que *ZmMYB42* se localizó principalmente en el núcleo (Figura 18).

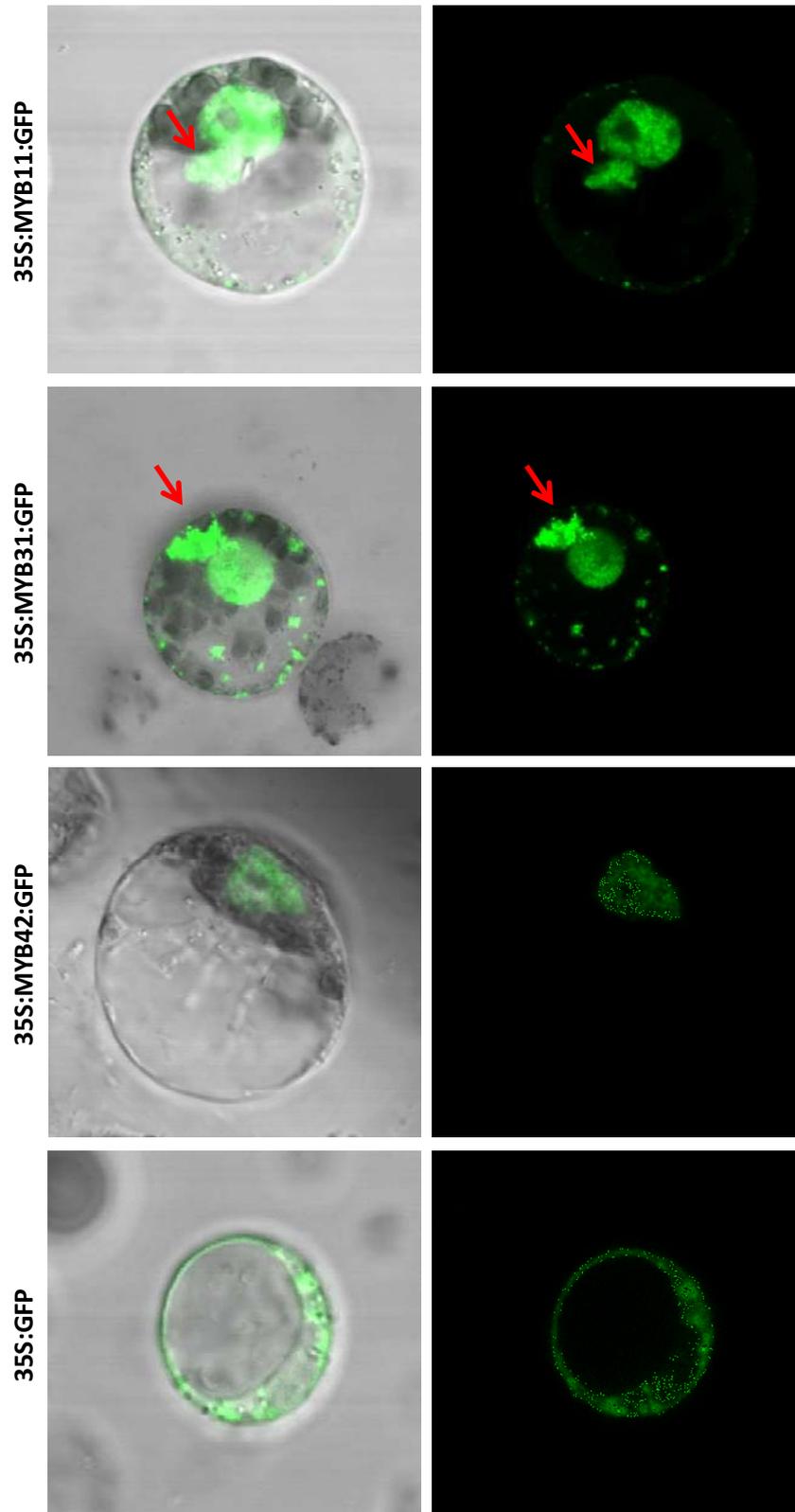


Figura 18. Localización subcelular de *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42* en protoplastos de maíz. 35S::ZmMYB11:GFP, 35S::ZmMYB31:GFP y 35S::ZmMYB42:GFP, fueron expresados en protoplastos de maíz mediante transformación transiente. En el panel superior se puede observar tanto el campo de la GFP como en el *merge* que los tres MYBs presentan localización en el núcleo y el citoplasma (60X). En la parte inferior, se encuentra como control el vector vacío 35S::GFP, que presenta una localización tanto en el núcleo como en citoplasma.

3.3.1.3 ZmMYB11 interactúa *in vivo* con el promotor de *ZmCOMT* y *ZmA1*.

Considerando que estudios previos habían demostrado que ZmMYB31 y ZmMYB42 se unen *in vivo* al promotor del gen de lignina *ZmCOMT* (Fornale et al 2010b, Gray et al 2012) y al gen de flavonoides *ZmA1* (Fornale et al 2010b, Xinhui 2011), se quiso establecer si estos genes también eran dianas de ZmMYB11. Por tanto, se generó un anticuerpo que reconoce la proteína endógena ZmMYB11 y se llevaron a cabo experimentos de CHIP. El anticuerpo generado fue purificado por afinidad (ver materiales y métodos) y evaluado en cuanto a su sensibilidad, especificidad y capacidad de reconocer la proteína *in vivo*.

El anticuerpo purificado anti ZmMYB11 (α MYB11) al ser utilizado para efectuar *western blot* fue capaz de detectar a partir de 50 ng el fragmento de la proteína ZmMYB11 purificado que menos conservación presenta con relación a los demás miembros de la familia (Región Única) y también la proteína completa ZmMYB11 fusionada a la GST, contenida en un extracto total de *E. coli* (Figura 19). Seguidamente, se analizaron muestras de extracto total de *E. Coli* en los que se encontraba sobre-expresada la Región Única de ZmMYB11 y fragmentos similares de ZmMYB31 y ZmMYB42 y los resultados indicaron que α MYB11 reconoce específicamente ZmMYB11 y no otros miembros del subgrupo cuatro de la familia *R2R3-MYB*, si se tiene en cuenta que *ZmMYB31* y *ZmMYB42* son los miembros que presentan una mayor homología de secuencia con *ZmMYB11* (Figura 20).

Finalmente, se probó la capacidad del anticuerpo α ZmMYB11 de reconocer la proteína ZmMYB11 *in vivo* empleando extracto de hoja ligule 2 de plantas de maíz de nueve días de edad y como resultado se identificó una única banda que corresponde con el peso molecular teórico de ZmMYB11, a diferencia de lo ocurrido al usar suero pre-inmune, con lo cual se concluyó que puede reconocer la proteína *in vivo* (Figura 21). Estos análisis permitieron establecer que el anticuerpo α MYB11 era apropiado para realizar experimentos de CHIP.

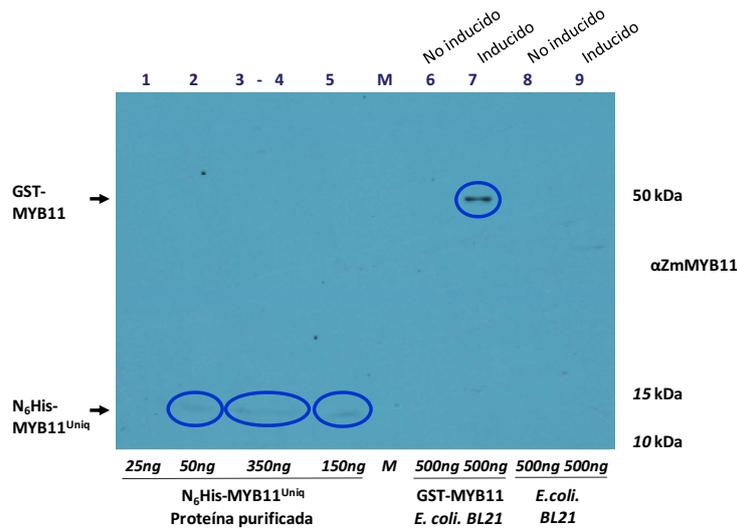


Figura 19. Sensibilidad del anticuerpo purificado α MYB11.

Western blot de la proteína recombinante ZmMYB11 identificada con α MYB11. En las líneas 1, 2, 3-4 y 5 se encuentran las concentraciones 25 ng, 50 ng, 350 ng y 150 ng, respectivamente, del fragmento purificado Región Única de la proteína ZmMYB11 fusionado a una cola de histidina (6x his) (11.79 kDa). las líneas 6 y 7 contienen extracto total de cultivos celulares de *E. Coli* de la cepa BL21 con inducción y sin inducción, respectivamente, de la producción de la proteína ZmMYB11 fusionada a la GST (56.22 kDa). Las líneas 8 y 9 son extractos totales de cultivos celulares de *E. Coli* de la cepa BL21 inducidos y sin inducir, empleados como control negativo. La concentración de los extractos de *E. Coli* es de 500 ng. Los pesos moleculares indicados son teóricos. Para la localización de las proteína se empleó α MYB11 a una dilución 1:2000. La detección del complejo antígeno-anticuerpo se realizó empleando anticuerpos policlonales anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano, a una dilución 1:5000 y ECL para la visualización.

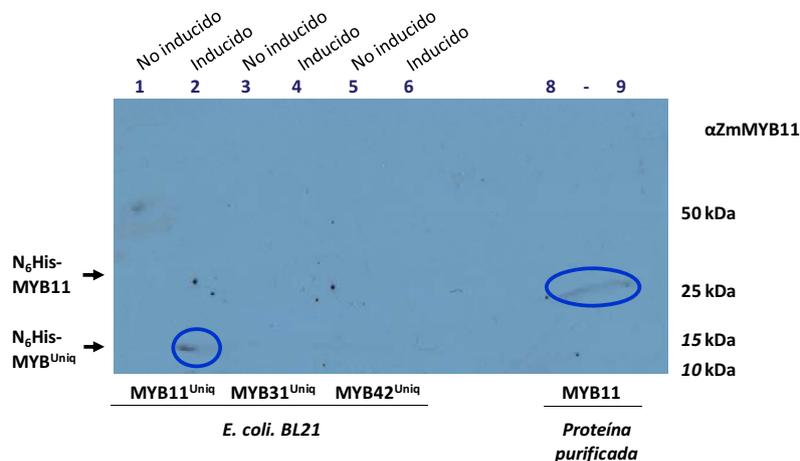


Figura 20. Especificidad del anticuerpo purificado α MYB11.

Western blot de las proteínas recombinantes fusionadas a una cola de histidina Región Única ZmMYB11 (11.79 kDa), Región Única ZmMYB31 (11.95 kDa) y Región Única ZmMYB42 (11.6 kDa) y ZmMYB11 (31.16 kDa) analizadas con α MYB11. En las líneas 1 y 2, 3 y 4 y 5 y 6, se encuentran la Región Única ZmMYB11, la región única ZmMYB31 y la región única ZmMYB42, respectivamente. Estas proteínas están contenidas en extracto total de cultivos celulares de *E. Coli* de la cepa BL21 sin inducción y con inducción de la producción las mismas. La concentración de los extractos de *E. Coli* es de 500 ng. En la línea 8-9 esta fusionada a una cola de histidina la proteína ZmMYB11 a una concentración de 100 ng. Los pesos moleculares indicados son teóricos. Para la localización de las proteína se empleo α MYB11 a una dilución 1:2000. La detección del complejo antígeno-anticuerpo se realizó empleando anticuerpos policlonales anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano, a una dilución 1:5000 y ECL para la visualización.

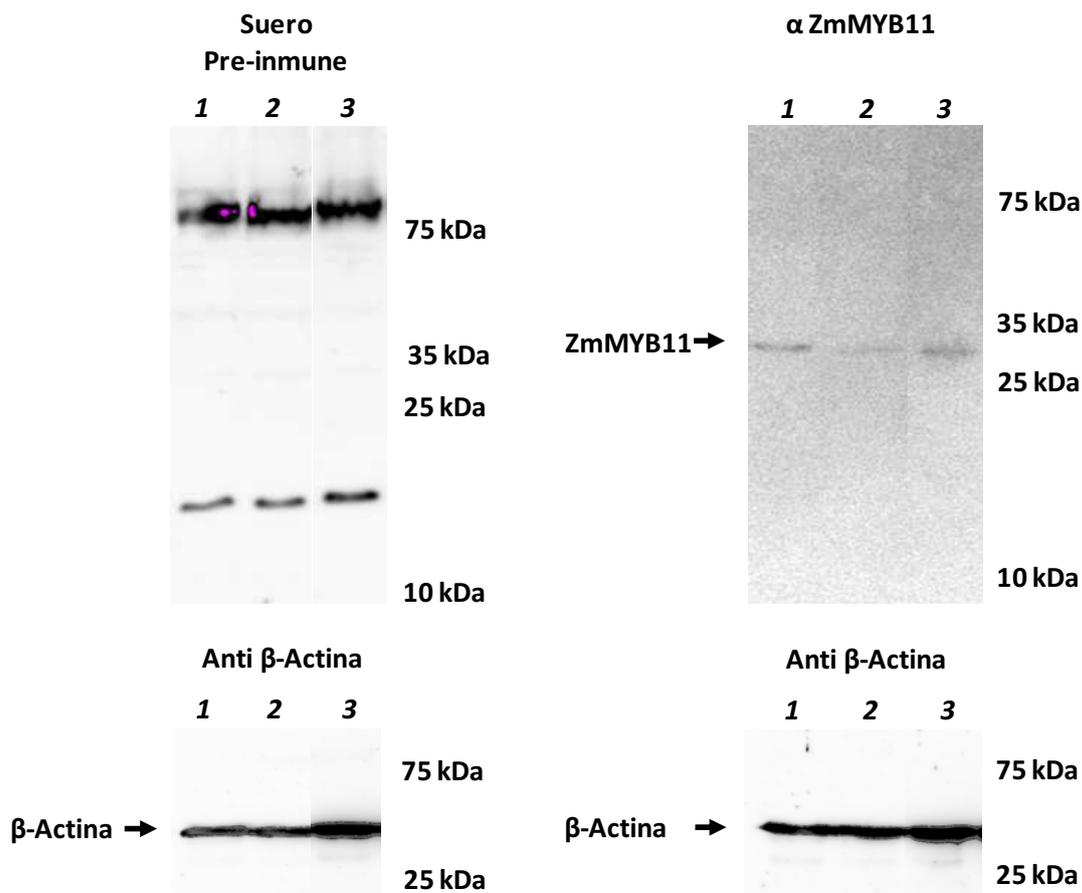


Figura 21. Capacidad del anticuerpo purificado α ZmMYB11 de reconocer la proteína ZmMYB11 *in vivo*. Western blots de extracto de hoja ligule 2 de plantas de maíz analizados con suero pre-inmune (superior izquierdo) y α MYB11 (superior derecho). En las líneas 1, 2 y 3, se encuentran tres replicas biológicas independientes de extracto de la base de ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73 de nueve días. El peso molecular teórico de la proteína endógena ZmMYB11 es de 24.88 kDa. Para el análisis se empleó suero pre-inmune y α MYB11, a una dilución 1:2000. La detección del complejo antígeno-anticuerpo se realizó empleando anticuerpos policlonales anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano, a una dilución 1:5000 y ECL para la visualización. Como control de carga se emplearon anticuerpos anti β -Actina a una dilución 1:5000 y los mismos anticuerpos policlonales anti IgG de conejo, a una dilución 1:10000 (inferior izquierdo y derecho). El peso molecular teórico de la proteína de la β -Actina es de entre 42 a 43 kDa.

El análisis efectuado mediante semi qPCR amplificando en el input y en muestras de CHIP de una zona del promotor de *ZmCOMT* y 6 regiones elegidas aleatoriamente en el genoma, detecta un enriquecimiento del promotor de *ZmCOMT* y un no enriquecimiento de las zonas seleccionadas al azar (figura 22. A Y B). Posteriormente, los resultados fueron verificados empleando ChIP qPCR e igualmente se identificó que ocurría un enriquecimiento del promotor de *ZmCOMT* (relativo a *copia*) (Figura 22. C). Estos resultados demuestran que ZmMYB11 se une al promotor de *ZmCOMT* *in vivo* durante el desarrollo temprano de la planta.

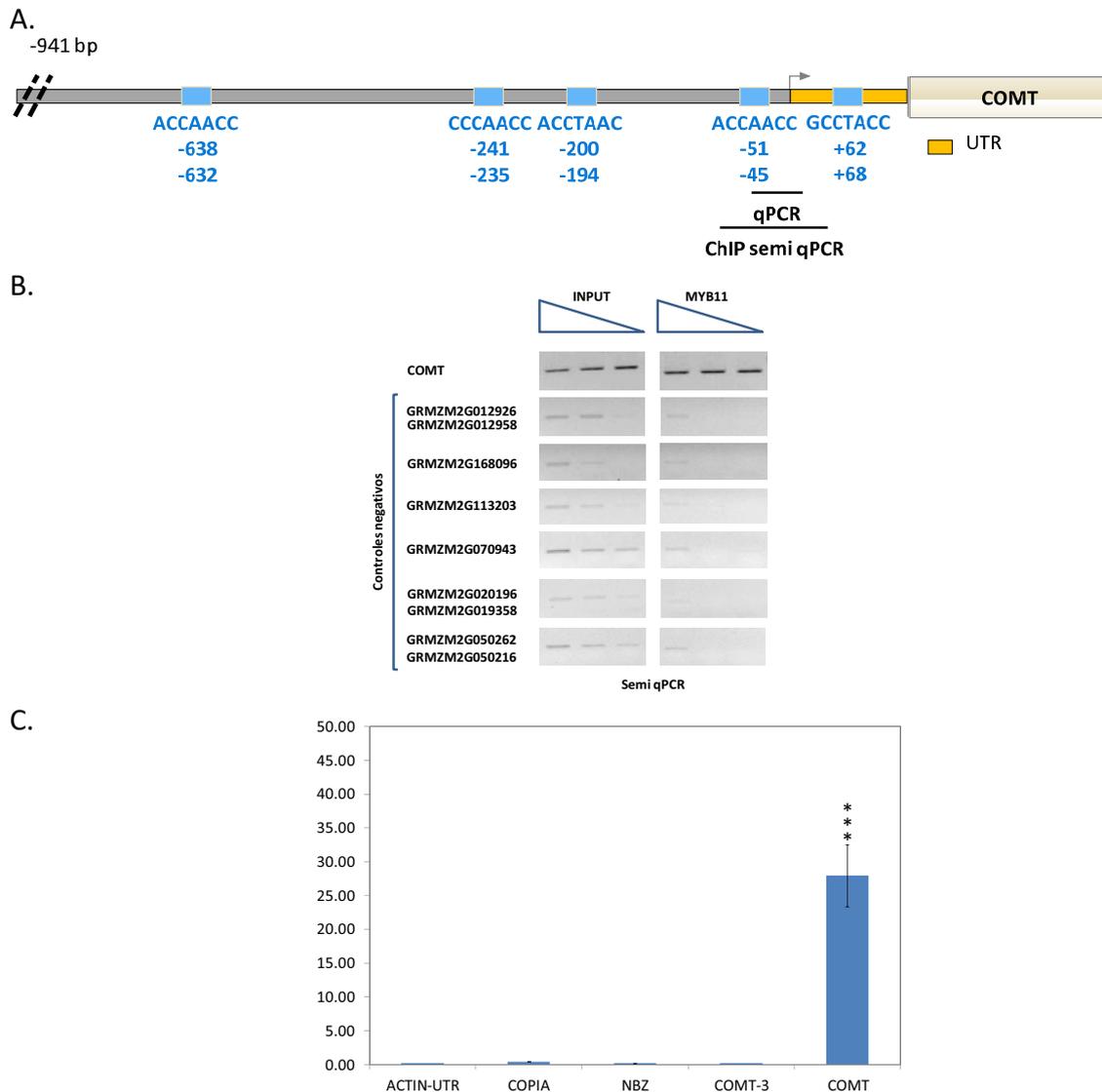


Figura 22. ZmMYB11 une *in vivo* al promotor de *ZmCOMT*.

A. Representación de la estructura del promotor de *ZmCOMT*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción del gen y con una línea los sitios amplificados en los experimentos de ChIP semi qPCR y ChIP qPCR. B. ChIP semi qPCR de ZmMYB11 en el promotor de *ZmCOMT*. El ChIP se analizó empleando semi qPCR para amplificar en el Input y en el ChIP de ZmMYB11, un fragmento del promotor de *ZmCOMT* y como control negativo 6 regiones elegidas aleatoriamente en el genoma, cuyos genes más próximos son GRMZM2G012926/GRMZM2G012958, GRMZM2G168096, GRMZM2G113203, GRMZM2G070943, GRMZM2G020196/GRMZM2G019358 y GRMZM2G050262/ GRMZM2G050216. Se realizaron tres diluciones seriadas del ChIP para efectuar el experimento (1/10). C. ChIP qPCR de ZmMYB11 en el promotor de *ZmCOMT*. El análisis de enriquecimiento se calculó empleando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T-Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan el error estándar de cuatro réplicas biológicas. Las inmunoprecipitaciones se efectuaron empleando el anticuerpo purificado α ZmMYB11 y la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73.

El promotor del gen *ZmA1* es una diana del factor de transcripción MYB C1/PL1 (Sainz et al 1997), el cual activa su expresión a través de la interacción con la proteína bHLH R/B (Grotewold et al 1994, Sainz et al 1997). En los experimentos de expresión transitoria realizados en células BMS de maíz se determinó que *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, actúan como represores de la transcripción de *ZmA1* y en experimentos *in vivo* también efectuados en estos trabajos se mostró que estos TF(s) se unen al promotor de *ZmA1* (Fornale et al 2010b, Xinhui 2011). Los experimentos de CHIP elaborados con *ZmMYB11* indican que se une también al promotor de *ZmA1*. Adicionalmente, se analizó vía CHIP qPCR si otros genes de ruta de la síntesis de lignina eran dianas de los *R2R3-MYB* analizados, pero no se identificaron nuevas dianas (Figura 23).

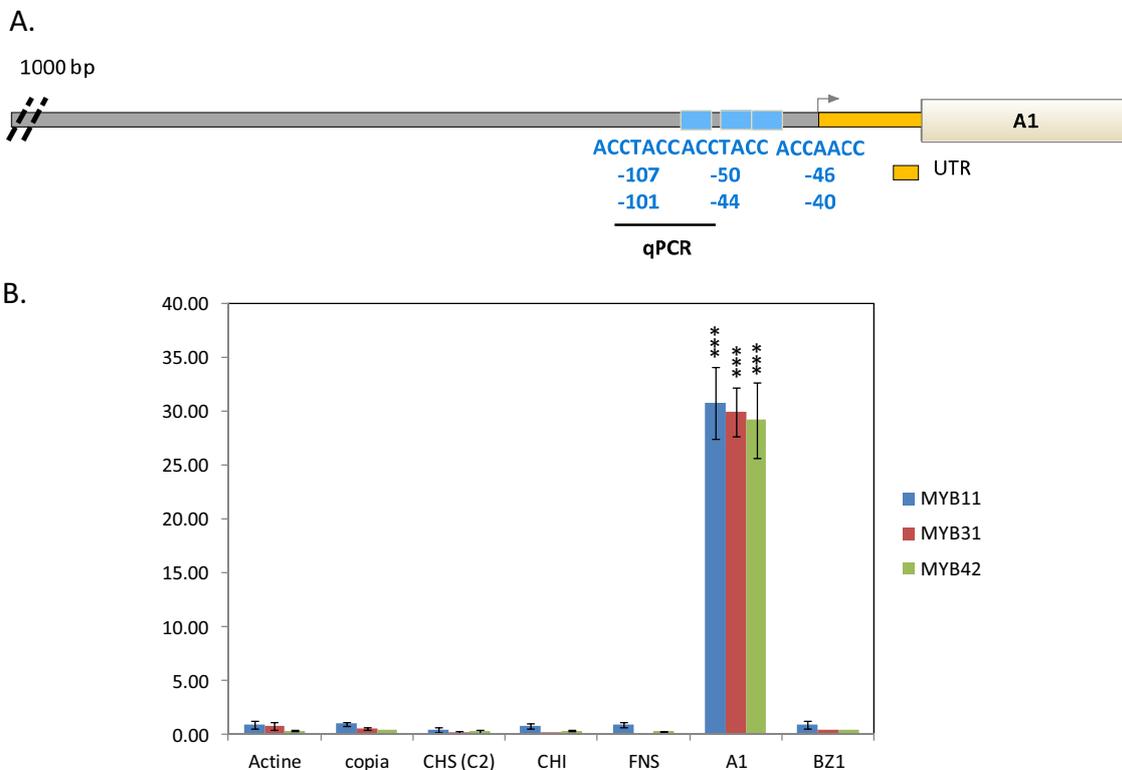


Figura 23. ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42 se unen *in vivo* al promotor de ZmA1.

A. Representación de la estructura del promotor de *ZmA1*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción del gen y con una línea el sitio amplificado en los experimentos de CHIP qPCR. B. CHIP qPCR de *ZmMYB11*, en una zona del promotor de *ZmA1* que presenta una caja AC. El análisis de enriquecimiento se calculó empleando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba t de Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan el error estándar de dos replicas biológicas. Las inmunoprecipitaciones se efectuaron empleando anticuerpos purificados α *ZmMYB11*, α *ZmMYB31* y α *ZmMYB42* y la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73.

3.3.1.4 ZmMYB11 reprime la expresión de ZmCOMT

Con el fin de establecer el papel que cumple ZmMYB11 en la regulación de *ZmCOMT*, se realizaron experimentos de expresión transiente en protoplastos. Se transfectaron protoplastos con el promotor de *ZmCOMT* fusionado al gen reportero de la luciferasa (pCOMT::Luc) y la proteína ZmMYB11 expresada constitutivamente (35S::MYB11:GFP). Los resultado indican que ZmMYB11 reprime fuertemente la expresión de *ZmCOMT* (Figura 24).

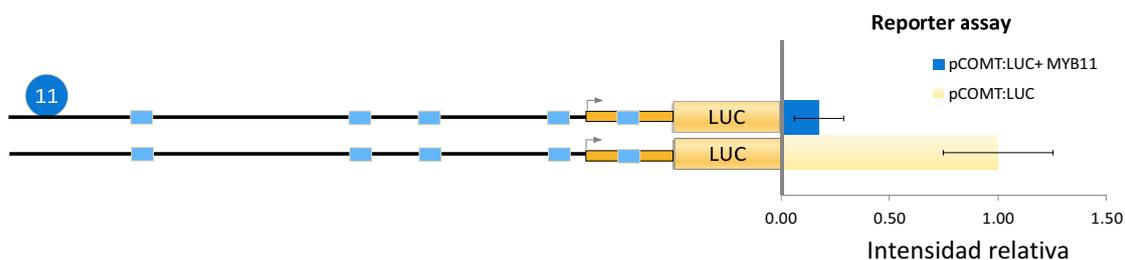


Figura 24. ZmMYB11 reprime la expresión de ZmCOMT en experimentos de expresión transiente en protoplastos de maíz.

Se realizaron ensayos de expresión transiente usando protoplastos de maíz transfectados por una parte con una construcción reportera en la que el promotor de *ZmCOMT* está fusionado al gen Firefly luciferase (*ZmCOMT*::Luc) y por otra, con las construcciones efectoras 35S::MYB11:GFP y 35S::GFP (Control). Adicionalmente, en todas las transfecciones se incluyó el vector 35S::Renilla. Los datos fueron normalizados empleando la actividad del gen Renilla. El cambio en la activación fue calculado como el ratio entre el tratamiento con ZmMYB11 y el tratamiento con el vector efector vacío. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción del gen. Las barras de error representan el error estándar de cuatro réplicas biológicas.

3.3.2 Cistoma de los R2R3-MYB ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42, en la ruta de la síntesis de lignina

Hasta la fecha la información que existía de unión a ADN *in vivo* de ZmMYB31 (Fornale et al 2010b) y ZmMYB42 (Gray et al 2012), se restringía a la región 5' de algunas enzimas de la ruta de la síntesis de lignina y no cubría ni todas las putativas cajas AC presentes ni todos los miembros de cada familia. Asimismo, la información generada para ZmMYB11 se limitaba al promotor de *ZmCOMT*. Por lo cual, en esta parte de la investigación iniciamos un análisis extensivo del papel que estos tres factores de transcripción cumplen en la ruta de la síntesis de lignina y en la regulación de algunas enzimas de la familia *CesA*, mediante el estudio de su capacidad de unión *in vivo* a la región 5' de sus genes diana (Figura 25).

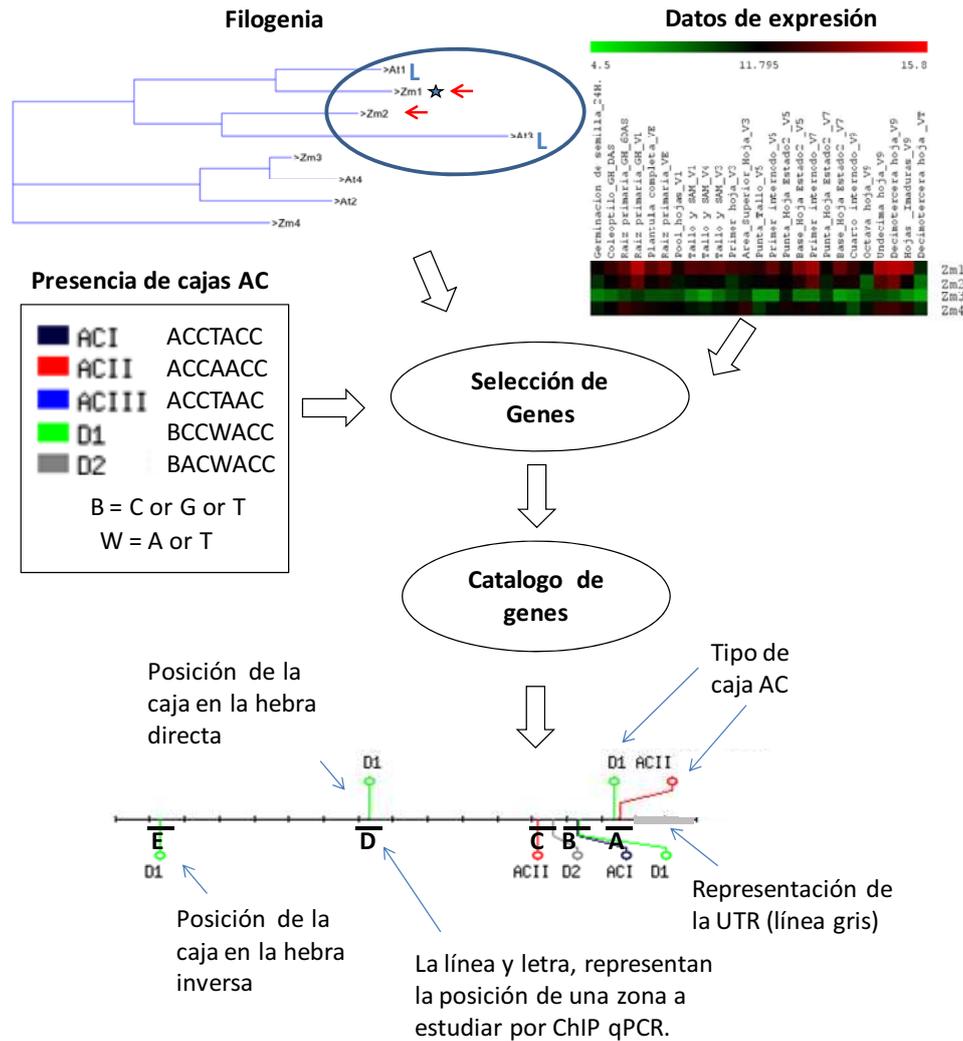


Figura 25. Esquema de trabajo adelantado para generar un catalogo de genes de interés en la síntesis de lignina.

Los análisis filogénicos comprendieron los genes descritos que conforman las distintas familias en Arabidopsis y maíz. Además, se incluyeron nuevos putativos miembros identificados mediante búsquedas basadas en homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se señalaron con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L y la F representan que ha sido señalada la importancia del gen en la síntesis de lignina y flavonoides, respectivamente. Asimismo, se indican con una estrella azul si has sido señalados con interesantes para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007). Las cajas AC fueron escaneadas en la región adyacente a los genes incluyendo la UTR y 1500 bp aguas arriba del sitio de inicio de transcripción. Se incluyeron las cajas AC canónicas AC-I (ACCTACC), AC-II (ACCAACC) y AC-III (ACCTAAC) (Hatton et al 1995, Lois et al 1989, Raes et al 2003) y dos cajas degeneradas D1(BCCWACC) y D2 (BACWACC), generadas con base en una caja AC extendida propuesta posteriormente ACC(T/A)A(A/C)(C/T) (Zhong & Ye 2012) y las cajas obtenidas mediante experimentos de SELEX para ZmMYB31 (Fornale et al 2010b) y ZmMYB42 (C. Chai. Laboratorio del Dr. E. Grotewold. Unpublished data). Finalmente, se cruzó la información filogénica, los datos de expresión y la presencia de cajas AC, para generar el catálogo de genes empleado para hacer los estudios de ChIP qPCR con ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42. En la parte inferior se muestra la representación de la región 5' de los genes, las cajas AC y las regiones amplificadas por ChIP qPCR.

La finalidad de esta aproximación es establecer si estos tres factores de transcripción tienen un papel redundante o si por el contrario hacen parte de un fino mecanismo de regulación en el que la acción de cada uno de ellos permite modular la cantidad y tipo de lignina que se origina y por finalmente, la producción de pared celular. Dado que la mayoría de las enzimas de la ruta de la síntesis de lignina en maíz hacen parte de familias multigénicas amplias, el trabajo inicio con la identificación de los miembros de cada familia, para lo que se empleo la información bibliográfica existente y se buscaron nuevos miembros en las bases de datos usando homología de secuencia.

Seguidamente, se realizaron análisis filogénicos en que se involucraron los distintos miembros en *Arabidopsis* y maíz y los resultados se complementaron con la información funcional disponible. A continuación, se estableció *in silico* el patrón de expresión de estos genes, ya que se consideró que desde el punto de vista biotecnológico era relevante indagar en la regulación de genes con un espectro de acción amplio que pudieran probablemente cumplir un papel global en la planta.

Finalmente, se contrastó tanto la información filogénica como de expresión con la presencia de cajas AC en la región 5' de los distintos miembros de las familias, para elegir los genes a ser estudiados y generar con ellos un catálogo de genes de interés en la regulación de la síntesis de lignina. Estos genes fueron incluidos en el estudio de la interacción proteína-DNA de los *R2R3-MYB* utilizando ChIP-qPCR (Figura 25).

Las figuras generadas con los datos de ChIP qPCR la familia PAL se presentan a continuación a manera de ejemplo y posteriormente, los resultados se muestran en cuadros resumen. Los criterios para establecer si una diana estaba enriquecida en un ChIP se describen detalladamente en materiales y métodos. Es de anotar que para considerar que una región era diana de un TF(s), se requirió que como mínimo estuviera enriquecido en dos réplicas biológicas.

3.3.2.1 Sitios de unión en familias de enzimas generales de la ruta de los fenilpropanoides: PAL, C4H y 4CL

Familia fenilalanina amonio liasa. PAL

La *PAL* cataliza el primer paso de la biosíntesis de fenilpropanoides, la desaminación de la fenilalanina para producir ácido p-cumarico. En las monocotiledóneas, la *PAL* también cataliza la actividad Tyr amonio liasa (TAL), utilizando la tirosina en lugar de la fenilalanina como sustrato (Guillaumie et al 2007, Rosler et al 1997). En *Arabidopsis* han sido identificadas cuatro enzimas de esta familia (Raes et al 2003, Rohde et al 2004). En maíz fue identificada primero una enzima denominada como *PAL1* (Rosler et al 1997) y posteriormente, han sido encontradas otras nueve putativas enzimas de la familia (Penning et al 2009).

En el análisis filogénico realizado en este trabajo (Figura 26), se observa que hay tres integrantes de la familia en maíz que son más cercanos a las enzimas conocidas en *Arabidopsis*, los cuales son *PAL1* y las nombradas en este proyecto como *PAL2* y *PAL3*. Estas tres enzimas PAL de maíz a su vez presentan un patrón de expresión amplio en la planta (Figura 27). Finalmente, considerando la información tanto filogénica como de expresión fueron seleccionadas estas tres enzimas para efectuar el análisis vía ChIP qPCR de la región aguas arriba del sitio de inicio de traducción, estableciendo que ZmMYB11 se une a la zona adyacente a *PAL1*. En la figura 28 se pueden observar tres réplicas biológicas de las cuales dos son estadísticamente significativas para la diana.

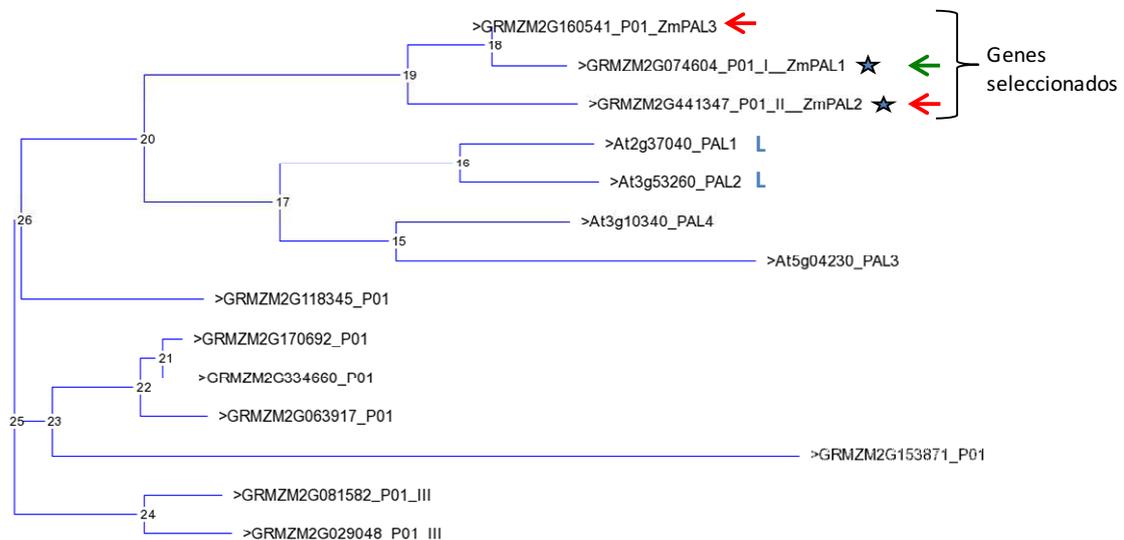


Figura 26. Árbol filogenético de la familia PAL en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia PAL conocidos en Arabidopsis *PAL1* y *PAL2* (Rohde et al 2004) y en maíz (Penning et al 2009, Rosler et al 1997). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

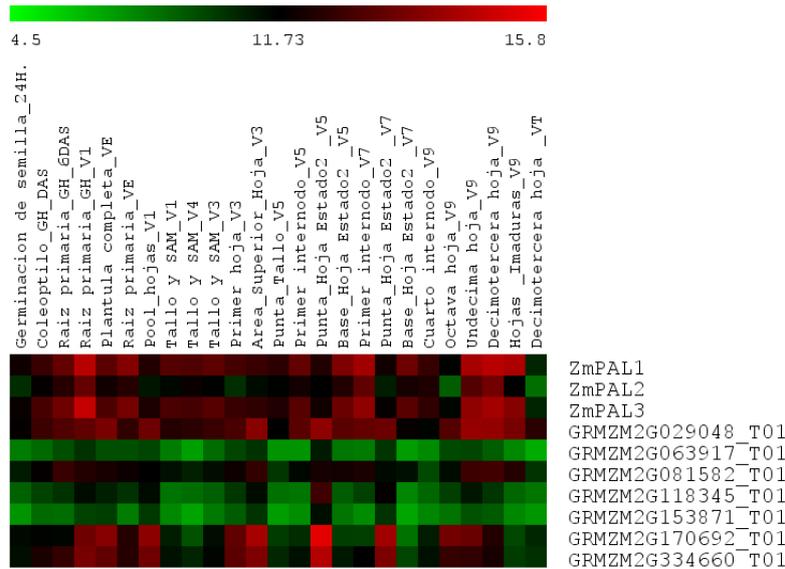


Figura 27. Patrón de expresión de la familia PAL en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia PAL. El *Heat map* fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Familia cinamato 4-hidroxilasa. C4H

Un cribado para la identificación de mutantes con reducida fluorescencia en la epidermis en Arabidopsis permitió el descubrimiento de *REF3*, que codifica para *cinamato 4-hidroxilasa (C4H)* (Franke et al 2002a). *C4H* pertenece al grupo CYP73A de la familia del citocromo P450 y cataliza la primer reacción oxidativa del metabolismo de fenilpropanoides, la hidroxilación del ácido trans-cinámico para formar ácido 4-hidroxicinámico o ácido-p-cumarico (Raes et al 2003). Esta enzima es una monooxigenasa dependiente de NADPH y oxígeno, que actúa como una oxidasa de función mixta, oxidando dos sustratos (NADPH y ácido cinámico) y reduciendo uno (el O₂).

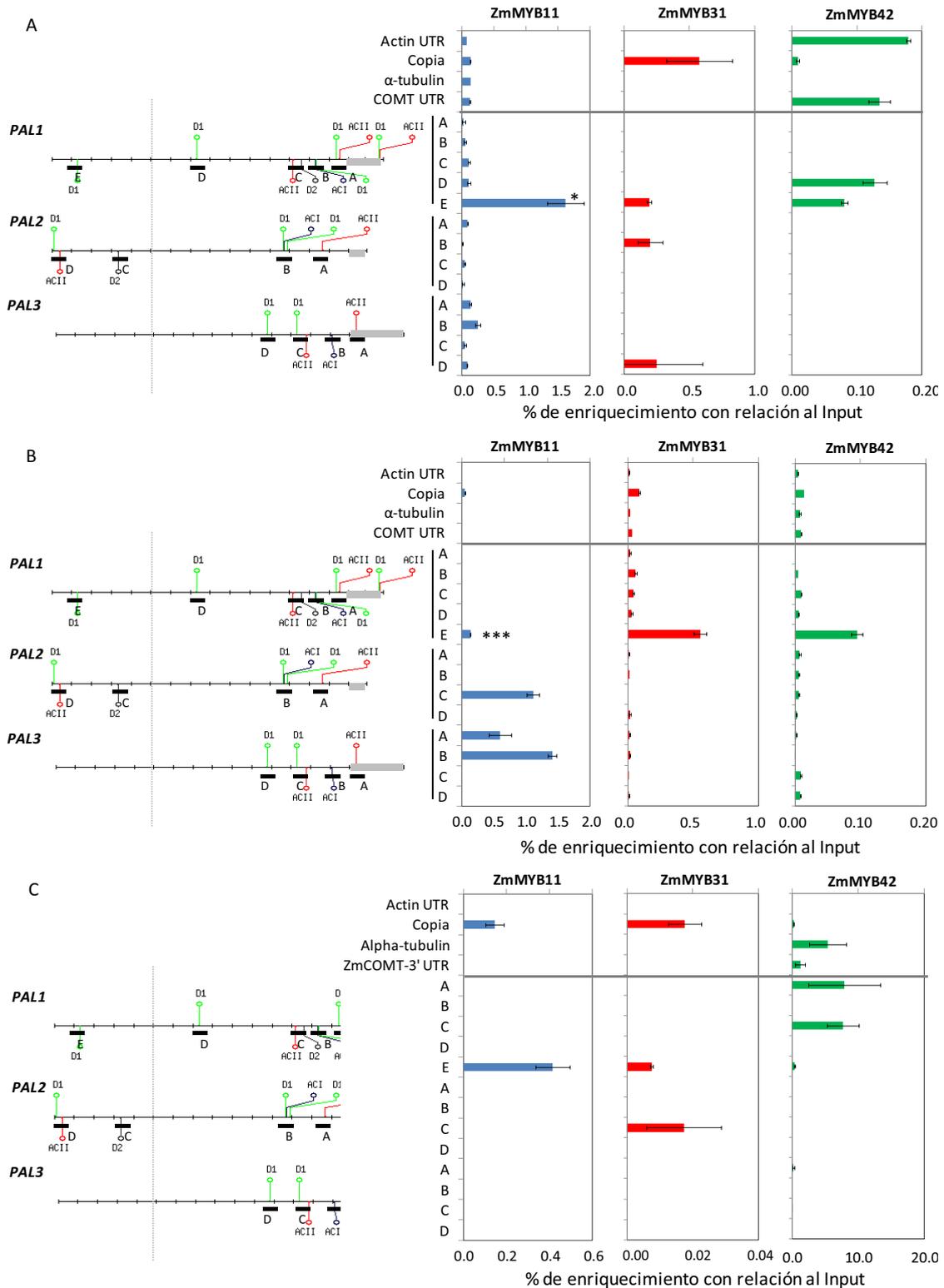


Figura 28. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *PAL*.

A, B y C son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *PAL*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y

α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T -Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas

En maíz fueron identificadas dos enzima de esta familia *C4H1* y *C4H2* (Guillaumie et al 2007) y luego en una investigación filogénica fueron encontrados otros dos probables miembros de la familia (Penning et al 2009).

Contrastando los resultados filogénicos con los datos de expresión se seleccionaron tres genes de esta familia para efectuar el estudio de interacción con los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro (figura 29 y figura 30), hallando que ZmMYB11 se une a la región 5' de *C4H1*. ZmMYB31 y ZmMYB42 no se unen a ningún miembro de la familia (Cuadro 1 y Anexo 3, Figura S1).



Figura 29. Árbol filogénico de la familia C4H en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyó el gen de *AtC4H* de Arabidopsis (Franke et al 2002a) y los miembros previamente reportados en maíz (Guillaumie et al 2007, Penning et al 2009). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 réplicas (bootstrap). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

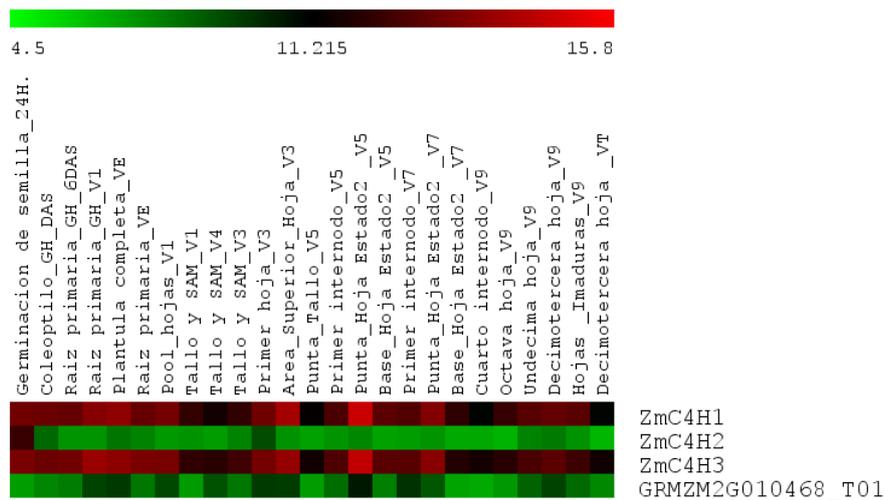


Figura 30. Patrón de expresión de la familia C4H en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia C4H. El Heat map fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11					ZmMYB31					ZmMYB42				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
ZmC4H1	A															
	B															
	C		OK	OK	OK					OK	OK					
ZmC4H2	A															
	B															
	C															
ZmC4H3	A															
	B															
	C															

Cuadro 1. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia C4H.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de CHIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 CHIPs.

4-cumarato CoA ligasa. 4CL

La enzima 4CL cataliza la formación de ésteres de CoA del ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 5-hidroxiferúlico, y ácido sinápico, cumpliendo un papel fundamental en la canalización de precursores de fenilpropanoides en diferentes vías aguas abajo cada una de las cuales conduce a una variedad de diferentes productos

(Guillaumie et al 2007, Harding et al 2002). Distintas isoformas de 4CL de Arabidopsis han sido caracterizadas ampliamente a nivel bioquímico. En maíz dos genes de la familia fueron hallados inicialmente (Puigdomenech et al 2001), seguidamente mediante análisis filogénicos fueron encontrados otros 4 integrantes de la familia (Penning et al 2009) y en esta investigación se identificaron 2 nuevos putativos miembros, mediante la búsqueda *in silico* empleando homología de secuencia.

Dado que las diferentes enzimas de la familia probable cumplan diversos papeles dentro de la ruta, no sólo se evaluaron las enzimas filogénicamente cercanas a los integrantes en Arabidopsis, sino que se analizaron todas las que presentaban un patrón de expresión extendido (Figuras 31 y 32). Finalmente, los resultados indican que ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42, se unen *in vivo* a la región aguas arriba de la enzima 4CL2. Además, ZmMYB11 se une a la zona 5' de 4CL7 y ZmMYB31 se une a 4CL4A y 4CL5 (Cuadro 2 y Anexo 3, Figura S2).

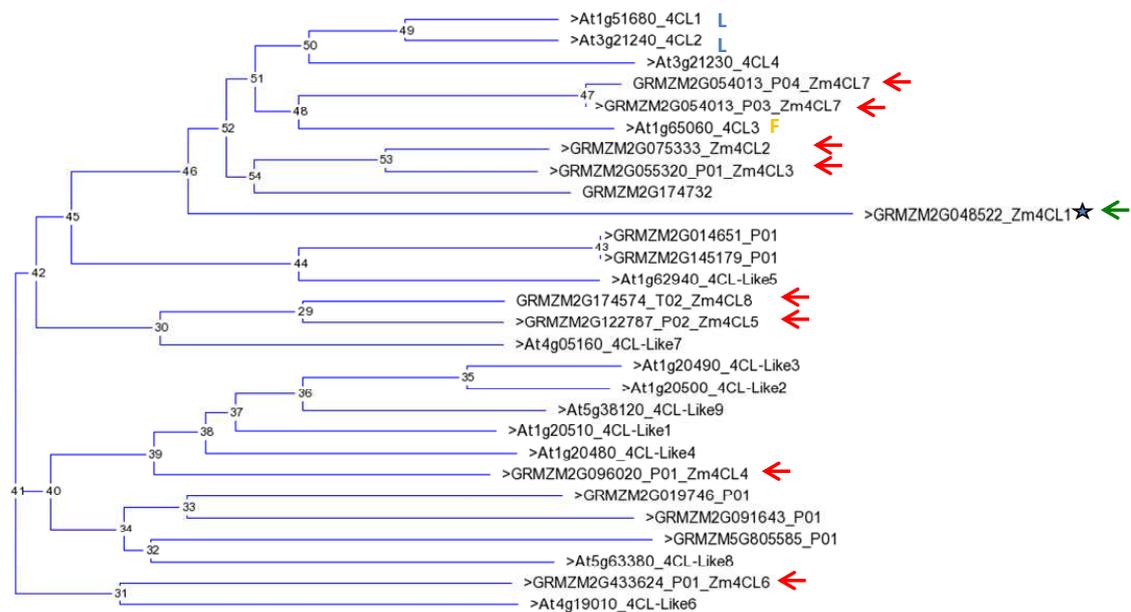


Figura 31. Árbol filogénico de la familia 4CL en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia 4CL conocidos en *Arabidopsis*, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogénicamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L y la F representan que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina y flavonoides, respectivamente. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

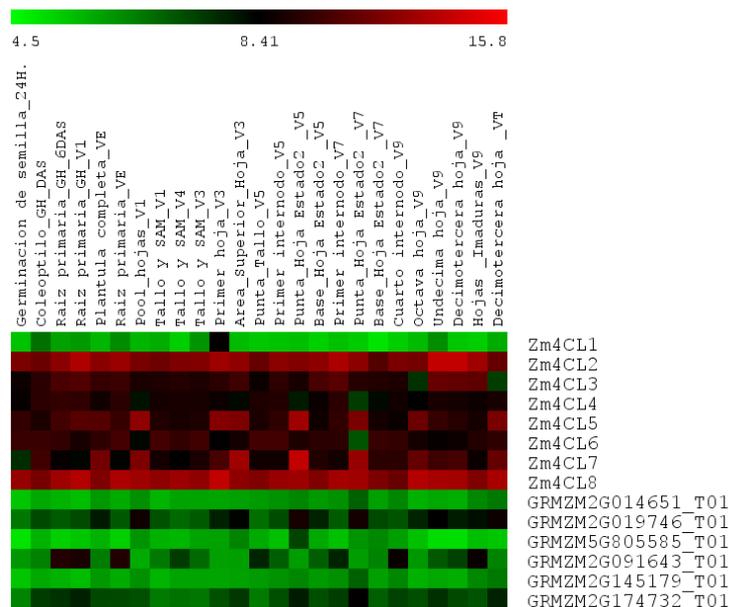


Figura 32. Patrón de expresión de la familia 4CL en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia 4CL. El Heat map fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011). No se encontraron análisis de expresión para GRMZM2G033555_T02 y GRMZM2G050076_T01.

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11					ZmMYB31					ZmMYB42				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
4CL1	A															
	B															
	C															
	D															
4CL2	A															
	B		OK	OK	ND	ND		OK	OK	ND	ND					
	C		OK	OK	ND	ND						OK	OK		ND	ND
	D															
	E															
4CL3	A						OK				OK	OK				
4CL4	A															
4CL5	A						OK	OK		ND	ND					
4CL6	A															
4CL7	A															
	B															
	C															
	D															
	E	OK	OK		ND	ND										
	F															
4CL8	A															
	B															

Cuadro 2. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia 4CL.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido y ND que no se analizó esa réplica biológica. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 ChIPs.

3.3.2.2 Sitios de unión en familias de enzimas comunes en la biosíntesis de las unidades H, G y S: CCR y CAD

Cinamoil CoA-reductasa. CCR

CCR cataliza la reducción de los tioésteres hidroxicinamil-CoA a sus correspondientes aldehídos, siendo por tanto, la primera enzima específica de la vía de los monolignoles (Raes et al 2003). La CCR no exhibe mucha especificidad de sustrato pudiendo actuar sobre cualquiera de los tioésteres hidroxicinamil-CoA. En Arabidopsis fueron identificadas dos genes esta familia (Jones et al 2001, Lauvergeat et al 2001). En una selección de mutantes irregulares en el xilema, fue hallado el mutante *irx4* que se encontró que correspondía a una alteración del gen *CCR1* (Jones et al 2001). Posteriormente, se hallaron 5 genes de la familia denominados *CCR-like* (Raes et al 2003). En maíz fueron aisladas dos enzimas *ZmCCR1* y *ZmCCR2* (Pichon et al 1998). Se incluyeron además, 16 probables genes de la familia descritos en la bibliografía (Penning et al 2009) y uno identificado en este estudio (Figura 33). Esta información se contrastó con los datos de expresión (Figura 34) y fueron seleccionados 6 genes de esta familia, para estudiar si *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, se unían *in vivo* a su región 5'. Los resultados mostraron que *ZmMYB11* y *ZmMYB31*, se une a la zona adyacente de *ZmCCR5* y *ZmCCR3*, respectivamente (Cuadro 3 y Figura S3).

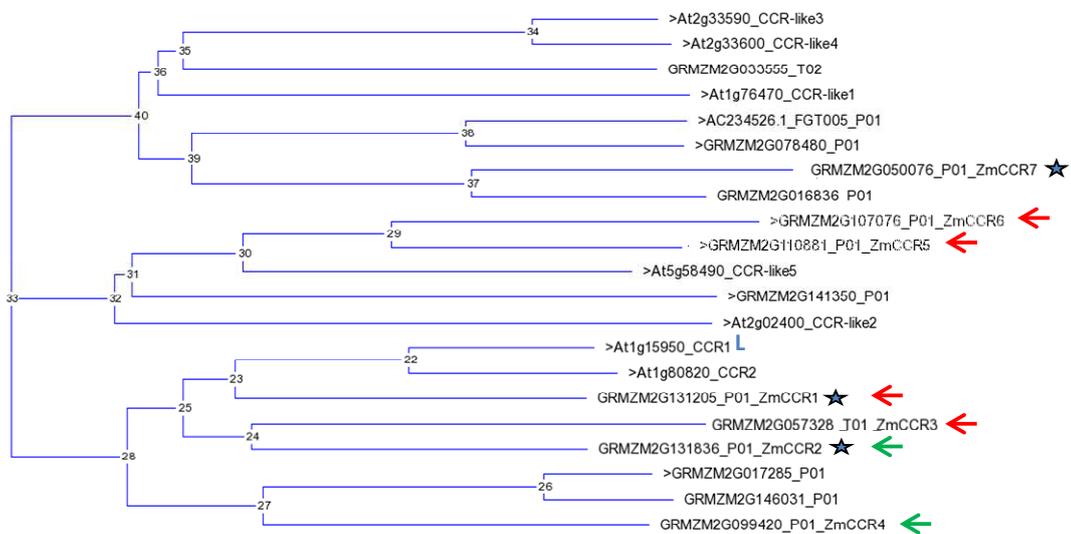


Figura 33. Árbol filogenético de la familia CCR en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia CCR conocidos en Arabidopsis, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y un nuevo putativo integrante de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido señalada la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

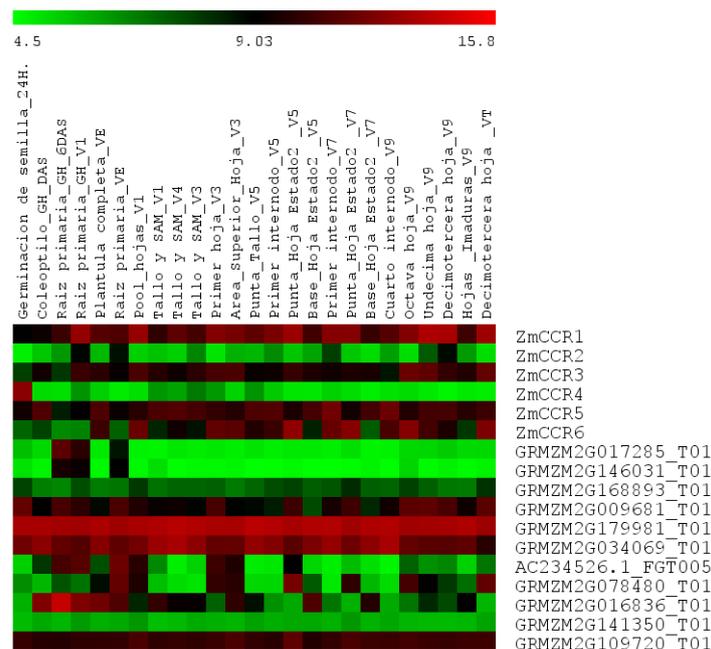


Figura 34. Patrón de expresión de la familia CCR en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia CCR. El *Heat map* fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011). No se encontraron análisis de expresión para *ZmCCR7* (GRMZM2G050076).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11			ZmMYB31			ZmMYB42		
		Rep1	Rep 2	Rep3	Rep1	Rep 2	Rep3	Rep1	Rep 2	Rep3
CCR1	A									
	B									
	C									
CCR3	A				OK	OK				
	B									
CCR4	A									
	B									
	C									
CCR5	A									
	B									
	C	OK	OK							
CCR6	A									
	B									
CCR7	A									

Cuadro 3. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia CCR.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 ChIP.

Cinamil alcohol deshidrogenasa. CAD

CAD cataliza el último paso en la biosíntesis de monolignoles, el cual es, la reducción de los hidroxicinamilaldehidos en sus alcoholes correspondientes. En el genoma de Arabidopsis, se han identificado nueve putativos genes CAD (Raes et al 2003). Es de anotar, que ha existido el debate sobre si diferentes genes CAD poseen especificidad de sustrato hacia coniferil alcohol y sinapil alcohol, determinando, al menos en cierta medida, la composición de la lignina en la planta (Li et al 2001, Sibout et al 2005). En maíz previamente ha sido caracterizada una CAD (Halpin et al 1998), que presenta una grave afectación de su expresión en el mutante *bm1*. Mediante análisis *in silico* fueron identificadas otras 5 putativas enzimas de la familia (Penning et al 2009) y en este trabajo se identificaron dos más (Figuras 35 y 36). Con base en los criterios ya mencionados, se analizaron 7 miembros de la familia en cuanto a la interacción DNA-proteína con los R2R3-MYB estudiados. Se encontró que ZmMYB11 y ZmMYB31 se unen a la región 5' de ZmCAD2 y que ZmMYB31 y ZmMYB42 se unen a la región 5' de CAD7 (Cuadro 4 y Figura S4).

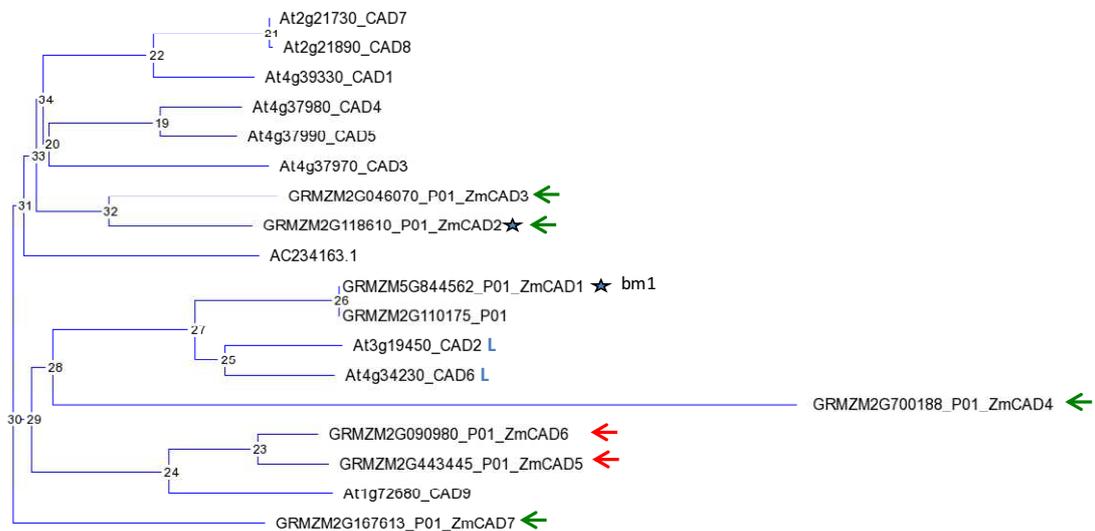


Figura 35. Árbol filogenético de la familia CAD en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia CAD conocidos en Arabidopsis, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

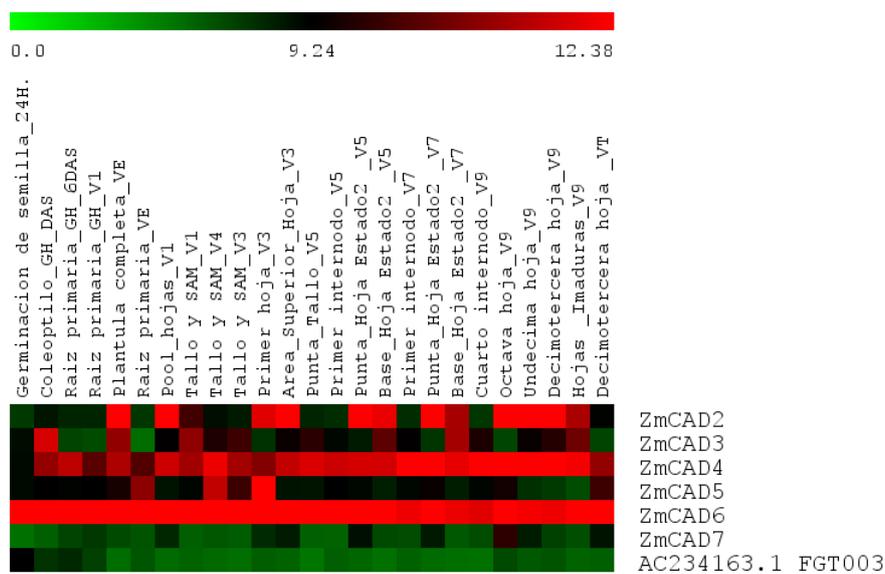


Figura 36. Patrón de expresión de la familia CAD en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia CAD. El Heat map fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011). No se encontraron datos de expresión para ZmCAD1 (GRMZM5G844562).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11					ZmMYB31					ZmMYB42				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
CAD1	A															
	B															
CAD2	A	OK		OK	ND	ND	OK		OK	ND	ND					
	B	OK		OK	ND	ND										
CAD3	A															
CAD4	A															
CAD5	A															
CAD6	A															
CAD7	A						OK	OK		ND	ND					
	B						OK	OK		ND	ND					
	C						OK			OK	OK			OK	OK	OK

Cuadro 4. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *CAD*.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de CHIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina de la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido y ND que no se analizó esa réplica biológica. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 CHIP.

3.3.2.3 Sitios de unión en familias de enzimas comunes en la biosíntesis de las unidades G y S: *HCT*, *C3H* y *CCOAOMT*

Hidroxicinamoil-CoA sikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa. *HCT*

HCT es una de las enzimas más recientemente identificada en la ruta de la síntesis de los monolignoles y pertenece a una amplia familia de acetiltransferasas. HCT cataliza la conversión de *p*-coumaroil-CoA hasta 4-coumaroil sikimato y la conversión de cafeoil sikimato, formado por la hidroxilación de C3H, hasta cafeoilil CoA (Bonawitz & Chapple 2010, Bouziri et al 2011, Hoffmann et al 2003, Raes et al 2003). En cuanto a los integrantes de esta familia, se puede anotar, que en *Arabidopsis*, sólo un gen ha sido detectado (Raes et al., 2003) y en maíz dos enzimas fueron identificadas (Guillaumie et al 2007) y posteriormente, fueron encontradas otros 36 putativos miembro de la familia (Figura 37). En base a los datos filogénicos, el patrón de expresión y la información bibliográfica se eligieron dos enzimas de la ruta para profundizar en su estudio (Figura 38). Los resultados indican que ZmMYB11 se une a *HCT2* (Cuadro 5 y Figura 5).

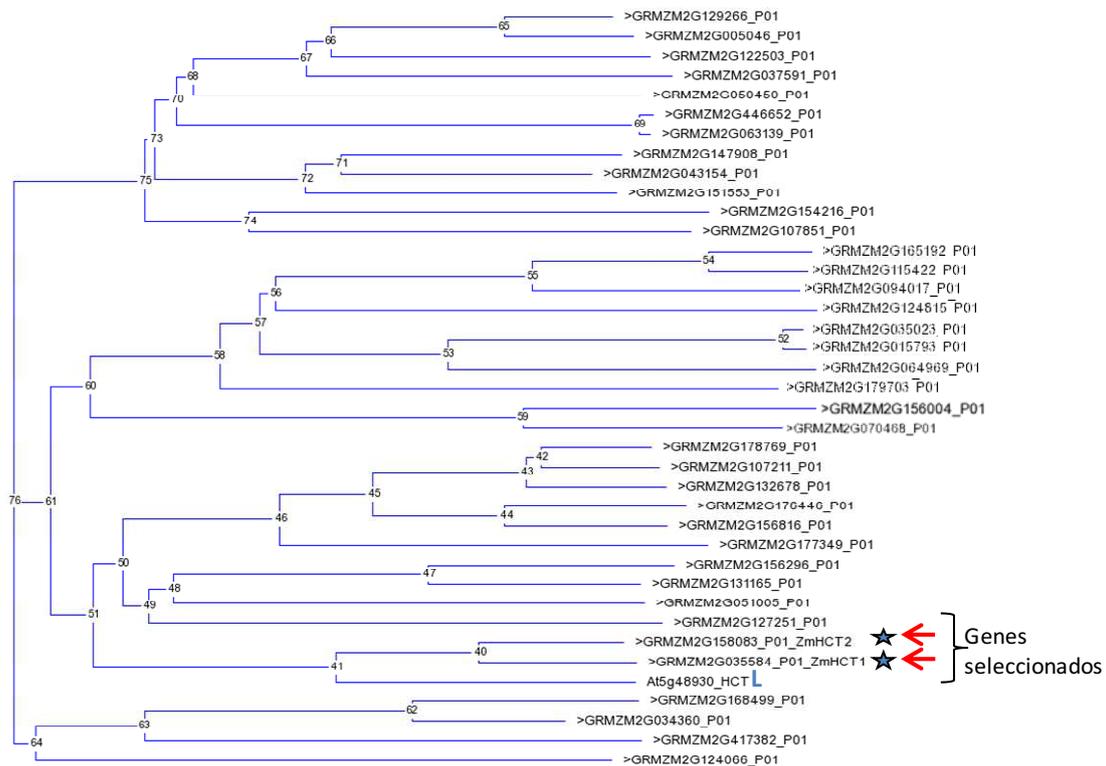


Figura 37. Árbol filogenético de la familia HCT en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia *HCT* conocidos en Arabidopsis, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 réplicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

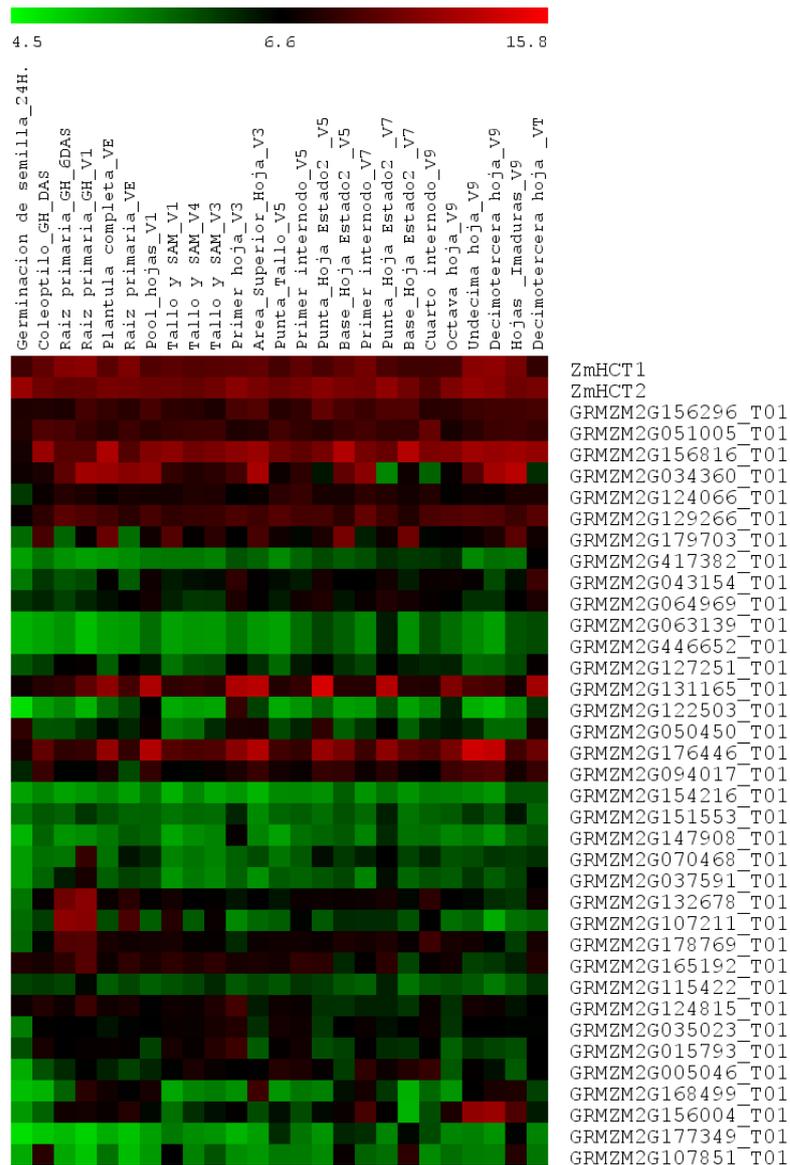


Figura 38. Patrón de expresión de la familia HCT en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia HCT El Heat map fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11					ZmMYB31					ZmMYB42				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
HCT1	A															
	B															
	C															
HCT2	D															
	B															
	C	OK	OK	OK		OK						OK	OK	OK		OK
	D															

Cuadro 5. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia HCT.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de CHIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 CHIP.

Cumarato 3 hidroxilasa. C3H

C3H preferencialmente convierte los ésteres de siquimato y quinato de ácido p-cumárico, mediante la hidroxilación en tercera posición, en su correspondiente ácido cafeico conjugado. Sin embargo, el ácido p-cumárico y el p-cumaroil-CoA, no son sustratos para esta enzima (Franke et al 2002b), (Schoch et al 2001). En un cribado de mutantes con reducida fluorescencia en la epidermis en *Arabidopsis* fue identificado el mutante *ref8* que tiene alterado el gen que codifica para *C3H3* (Franke et al 2002b). En cuanto a los miembros de esta familia, en *Arabidopsis* han sido identificados tres genes (Raes et al 2003) y en maíz ha sido encontrado uno (Guillaumie et al 2007). La información filogenética y de expresión de este gen se presenta en las Figura 39 y Figura 40, respectivamente. Ninguno de los *R2R3-MYB* estudiados interactúan con la región 5' de este gen (Figura S6).

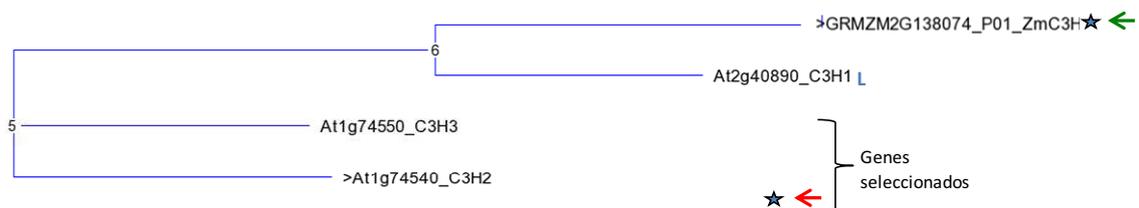


Figura 39. Árbol filogenético de la familia C3H en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia *C3H* conocidos en *Arabidopsis*, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 réplicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en *Arabidopsis* se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido señalada la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

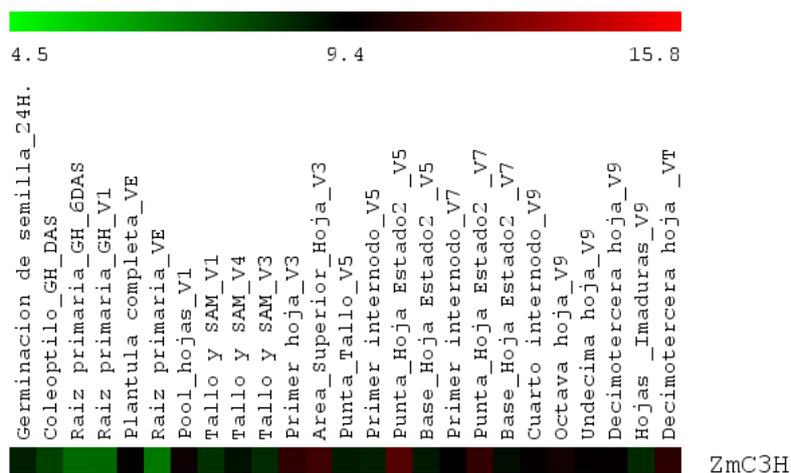


Figura 40. Patrón de expresión de la familia C3H en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia C3H El *Heat map* fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Cafeoil-CoA O-metiltransferasa. CCoAOMT

CCoAOMT cataliza la metilación de cafeoil-CoA a feruloil-CoA (*in vitro* e *in vivo*) y 5-hidroxi feruloil-CoA a sinapoyl-CoA (al menos *in vitro*) y junto con *COMT*, es responsable de la metilación de los precursores de los monolignoles (Guillaumie et al 2007, Pincon et al 2001, Ye et al 1994, Zhong et al 1998). En el genoma de *Arabidopsis* fueron identificados dos miembros de la familia (Raes et al 2003). En maíz primero fueron reportados dos secuencias de CCoAOMT, CCoAOMT1 y CCoAOMT2 (Civardi et al., 1999) y seguidamente, se identificaron otras 4 putativas enzimas (Penning et al 2009). Con base en la información filogénica y los datos de expresión se eligieron 4 enzimas de esta ruta para profundizar en su análisis (Figura 41 y Figura 42). Los tres *R2R3-MYB* investigados se unen a genes de la familia CCoAOMT, *ZmMYB11* y *ZmMYB31*, se unen a la región 5' de *CCoAOMT2*, *ZmMYB42* se une a la zona 5' de *CCoAOMT1* y *CCoAOMT4* (Cuadro 6 y Figura S7).

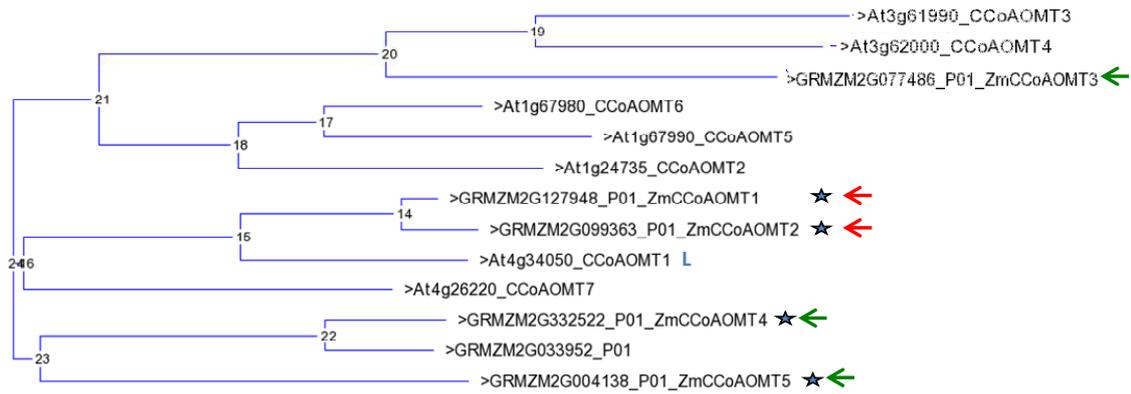


Figura 41. Árbol filogenético de la familia CCoAOMT en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia *CCoAOMT* conocidos en Arabidopsis, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTALW efectuando 1000 réplicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

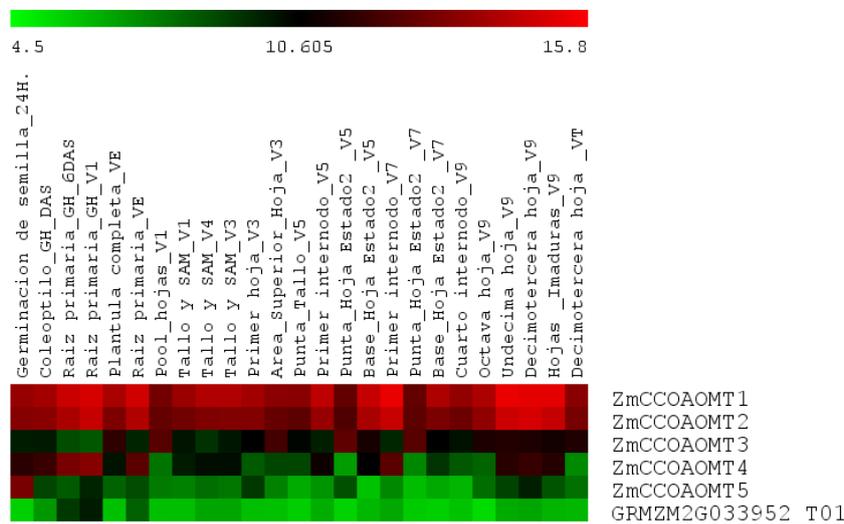


Figura 42. Patrón de expresión de la familia CCoAOMT en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia *CCoAOMT*. El *Heat map* fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11					ZmMYB31					ZmMYB42				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
CCoAOMT1	A															
	B															
	C															
	D												OK	OK	ND	ND
CCoAOMT2	A	OK	OK	OK	ND	ND	OK	OK	OK	ND	ND					
	B															
	C															
	D															
CCoAOMT3	A															
	B															
CCoAOMT4	A												OK	OK		OK
	B															
	C															

Cuadro 6. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia CCoAOMT.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido y ND que no se analizó esa réplica biológica. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 ChIP.

3.3.2.4 Sitios de unión en familias de enzimas comunes en la biosíntesis de la unidad

S: F5H y COMT

Ferulato 5- hidroxilasa. F5H

F5H, es una *monooxigenasa dependiente del citocromo P450*, que se requiere para la producción de lignina siringil, ya que es responsable de la 5-hidroxilación de coniferaldehído y/o coniferilico de alcohol (Humphreys & Chapple 2002, Humphreys et al 1999, Li et al 2000). En *Arabidopsis* dos genes de esta familia han sido identificados (Raes et al 2003) y en maíz se han encontrado también dos enzimas de esta familia *F5H1* (Puigdomenech et al 2001) y *F5H2* (Guillaumie et al 2007) (Figura 43 y 44). Los resultados indicaron que ZmMYB11 se une a la zona adyacente a *F5H2* (cuadro 7 y Figura S8).

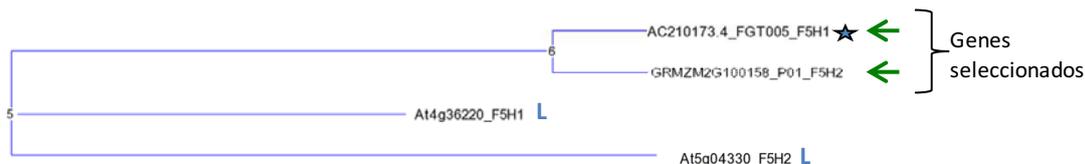


Figura 43. Árbol filogenético de la familia *F5H* en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia *F5H* conocidos en Arabidopsis, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

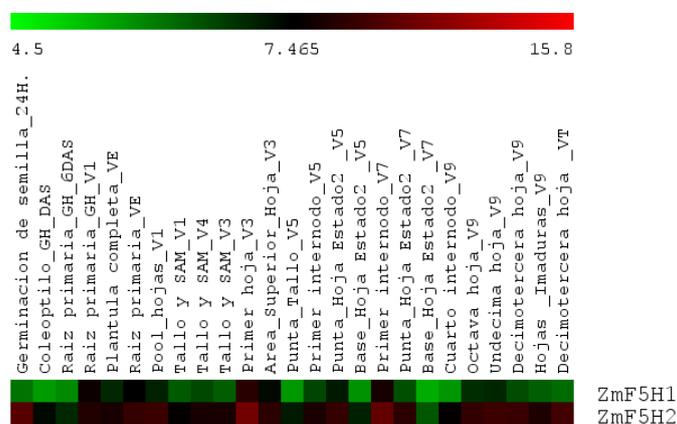


Figura 44. Patrón de expresión de la familia *F5H* en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia *F5H*. El *Heat map* fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11			ZmMYB31			ZmMYB42		
		Rep1	Rep 2	Rep3	Rep1	Rep 2	Rep3	Rep1	Rep 2	Rep3
<i>F5H1</i>	A									
<i>F5H2</i>	A	OK	OK							
	B									
	C									

Cuadro 7. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *F5H*.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido y ND que no se analizó esa réplica biológica. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 ChIP.

Caffeic acid O-methyltransferase. COMT

COMT se postuló originalmente como una enzima bifuncional de metilación de ácido cafeico y ácido 5-hidroxiferúlico, sin embargo, experimentos *in vitro* y estudios con plantas transgénicos revelaron que el papel predominante de la COMT es la metilación de 5-hidroxiconiferaldehído y/o alcohol 5-hidroxiconiferil a sinapaldehído y/o alcohol sinapílico, respectivamente (Congdon et al 2008, Li et al 2000, Liu et al 2008, Swami et al 2010, Xie et al 2008, Zhu et al 2008).

En Arabidopsis sólo ha sido encontrada una enzima COMT (Raes et al 2003). Sin embargo, 13 proteínas similares a COMT fueron detectadas en el clado de la enzima COMT caracterizada funcionalmente (Nirmalan et al 2006, Rogers et al 2009). En el maíz, ha sido analizado un gen que codifica para COMT (Collazo et al., 1992) y se ha establecido que en el mutante *bm3* la expresión de este gen está alterada negativamente (Bansal et al 2008). Adicionalmente, han sido identificados otros dos putativos miembros de la familia (Penning et al 2009) (Figura 45 y Figura 46).

En este estudio se analizaron los tres probables miembros de la familia, encontrando que ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42, se unen *in vivo* a la región 5' de la enzima COMT1 (cuadro 8 y Figura S9), como ya estaba descrito en la bibliografía para ZmMYB31 (Fornale et al 2010b) y ZmMYB42 (Gray et al 2012). Además, ZmMYB11 se une a la región 5' de COMT3.



Figura 45. Árbol filogenético de la familia COMT en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia COMT conocidos en Arabidopsis, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTALW efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido establecida la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

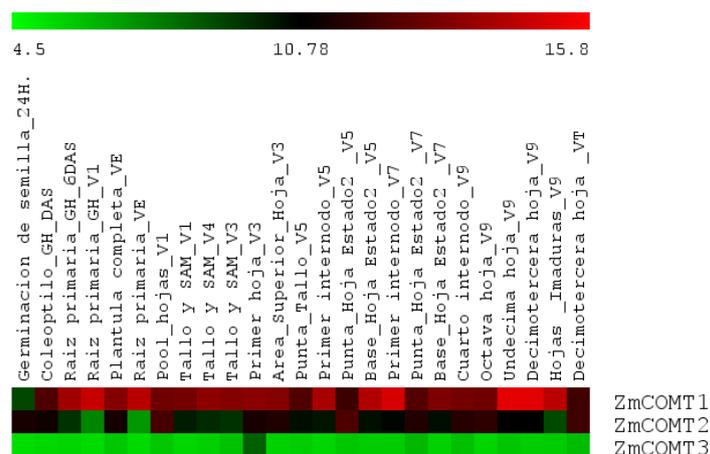


Figura 46. Patrón de expresión de la familia COMT en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia COMT. El Heat map fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11			ZmMYB31			ZmMYB42		
		Rep1	Rep 2	Rep3	Rep1	Rep 2	Rep3	Rep1	Rep 2	Rep3
COMT1	A									
	B	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	C	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	D									
COMT2	A									
	B									
COMT3	A	OK	OK							
	B									

Cuadro 8. Análisis in vivo del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia COMT.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de CHIP realizados utilizando los anticuerpos purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión está enriquecido. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 ChIP.

3.3.2.5 Sitios de unión de familias de enzimas de genes de la síntesis de celulosa

La celulosa es la base de la pared celular, sirviendo de armazón para la unión de otros componentes. Las proteínas Cesa conforman familias multigénicas amplias, siendo su número de miembros en Arabidopsis (pared tipo I) de 10 y en maíz de 13 (pared tipo II) (Appenzeller et al 2004, Johnson & Stephenson 1980, Penning et al 2009, Richard et al 2001). La familia Cesa en arroz y maíz, forman grupos similares a los existentes en Arabidopsis, los cuales se conocen por actuar en determinadas fases del desarrollo y diferenciación celular (Richard et al 2001, Taylor et al 2003, Vergara & Carpita 2001). Al menos tres genes Cesa son expresados en células en crecimiento produciendo celulosa en la pared celular primaria y otros, tres genes son co-expresados en células que participan en la síntesis de celulosa de la pared secundaria en Arabidopsis (Taylor et al 2003), arroz (Tanaka et al 2003), maíz (Appenzeller et al 2004) y cebada (Burton et al 2004). En maíz las enzimas Cesa6, Cesa7 y Cesa8, están relacionadas con la transición de la pared celular secundaria hasta la primaria y Cesa10, Cesa11 y Cesa12, están involucradas con la síntesis de pared celular secundaria. De acuerdo a la información filogénica y de expresión (Figuras 47 y 48), en este trabajo se analizó la interacción de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42, con la región en 5' de los genes que codifican las proteínas Cesa antes mencionadas, encontrando que ZmMYB42, se une a la zona adyacente a Cesa7 (cuadro 9 y Figura S9).

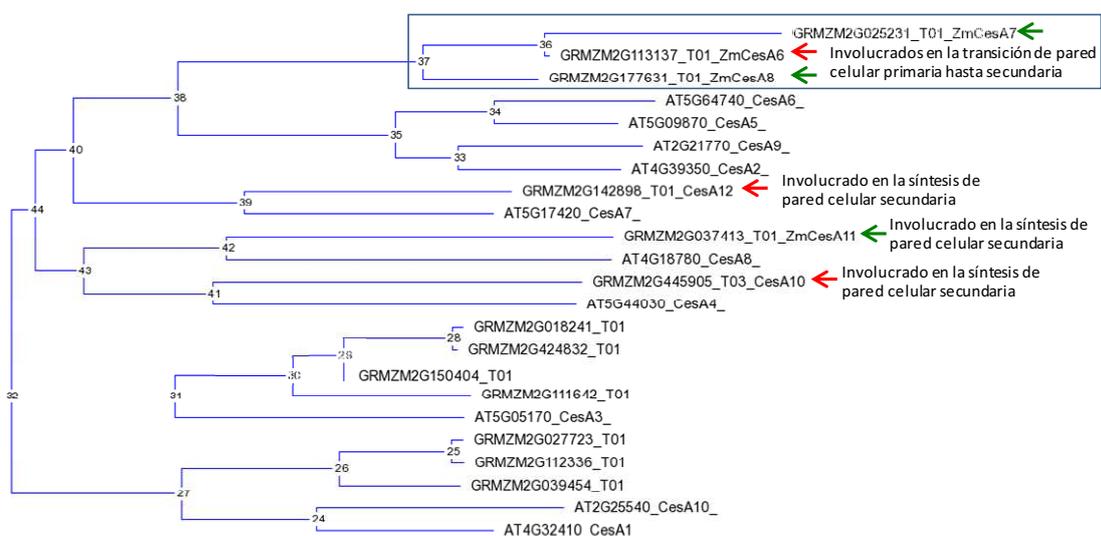


Figura 47. Árbol filogénico de la familia Cesa en Arabidopsis y maíz.

En este análisis se incluyeron los genes de la familia Cesa conocidos en Arabidopsis, los miembros previamente reportados en la línea B73 de maíz (Penning et al 2009) y nuevos integrantes putativos de

la familia identificados mediante homología de secuencia. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas fueron extraídas de las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>) y alineadas empleando el método CLUSTAL W efectuando 1000 replicas (*bootstrap*). Los genes de la familia en maíz filogenéticamente cercanos a los miembros en Arabidopsis se indican con una flecha roja si su nivel de expresión es elevada y con una flecha verde si su expresión es baja, de acuerdo con los datos de transcripción del atlas de maíz (Sekhon et al 2011). La L representa que ha sido señalada la importancia del gen en la síntesis de lignina. Asimismo, se indica con una estrella azul si ha sido señalado como interesante para el estudio de la síntesis de lignina (Guillaumie et al 2007).

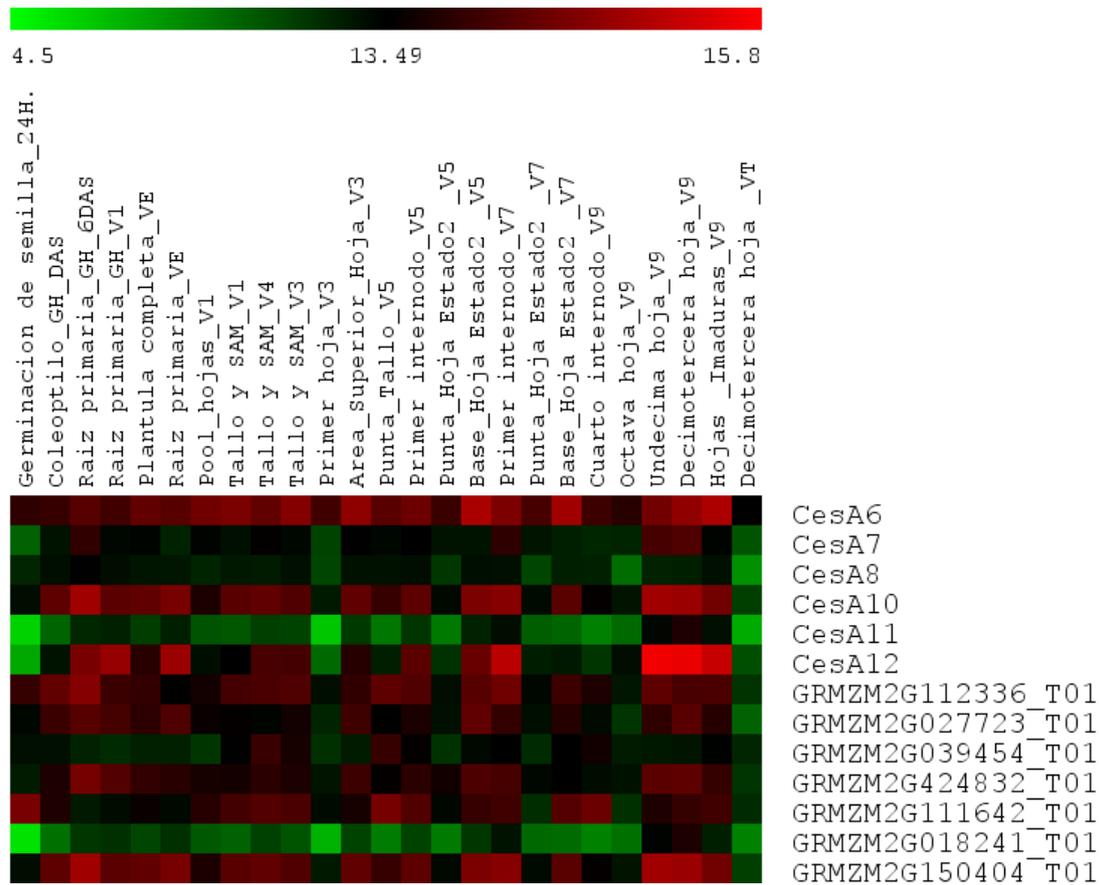


Figura 48. Patrón de expresión de la familia CesA en diferentes tejidos de maíz.

Heat map del patrón de expresión en varios tejidos de maíz (variedad B73) de los genes la familia CesA. El Heat map fue generado por agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson como medida de similitud. Rojo, negro y verde indican niveles altos, medios y bajos de expresión transcripcional, respectivamente. Los datos fueron extraídos de *Genome-wide atlas of transcription* (Sekhon et al 2011).

Gen diana	Sitio de unión	ZmMYB11					ZmMYB31					ZmMYB42				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
CesA6	A															
	B															
	C															
CesA7	A													OK	OK	OK
CesA8	A															
	B															
	C															
	D						OK	OK								
	E															
CesA11	A															
	B															
	C															
	D															
	E															
CesA12	A															
	B															
	C															

Cuadro 9. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia R2R3-MYB del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia CesA.

El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. OK significa que el sitio de unión esta enriquecido y ND que no se analizo esa replica biológica. Se consideraron enriquecidos los sitios de unión que presentan enriquecimiento estadísticamente significativo en 2 de 3 o 3 de 5 ChIP.

3.3.2.6 Sitio de unión consenso *in vivo* de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42

Los tres R2R3-MYB estudiados tienen dianas comunes como ZmCOMT1 y Zm4Cl2, pero también compartidas entre dos de ellos, siendo el caso de CAD2 y CCoAOMT2 entre ZmMYB11, y ZmMYB31 y CAD7 entre ZmMYB31 y ZmMYB42. Asimismo, presentan dianas exclusivas para cada uno de ellos (Figura 49. A). Por tanto, se quiso indagar si existía una especificidad en la secuencia reconocida por cada uno de estos factores de transcripción, por lo cual, informáticamente obtuvimos la secuencia consenso *in vivo* de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42. Para obtener los sitios de unión consenso *in vivo* se insertaron los fragmentos que se consideraron enriquecidos en el análisis realizado por ChIP-qPCR en el programa MEME, que generó el motivo que con más frecuencia se encontraba en dichas regiones. Posteriormente, se agruparon en un árbol las típicas cajas AC descritas en la bibliografía, la información de SELEX disponible para ZmMYB31 y ZmMYB42 y los datos obtenidos *in vivo* (Figura 49. B). Los resultados indican que *in vivo* probablemente las cajas a las que se unen con mayor afinidad estos tres MYB son

similares a las cajas ACII. Por el contrario, los datos producidos llevando a cabo SELEX con *ZmMYB31* generan una caja intermedia entre las cajas ACI y AC expandida y los de *ZmMYB42* una caja con menor similitud a las otras cajas AC.

3.3.2.7 Visión general del *Cistoma* de los genes de la ruta de la síntesis de lignina y miembros de la familia CesaA de los *R2R3-MYB* *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42* y significancia de los resultados.

Con los resultados obtenidos se elaboró un resumen con las diferentes regiones en cis con los que interactúan *in vivo* los *R2R3-MYB* *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42* y se adiciono información sobre la significancia estadística de los resultados (Figura 50). Posteriormente, se buscó establecer el patrón de represión de las proteínas *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42* en la vía de la síntesis de lignina. En las figuras 51, 52 y 53, se pueden observar las isoformas de cada familia que son dianas de estos TFs y a su vez, a que familias preferencialmente se unen.

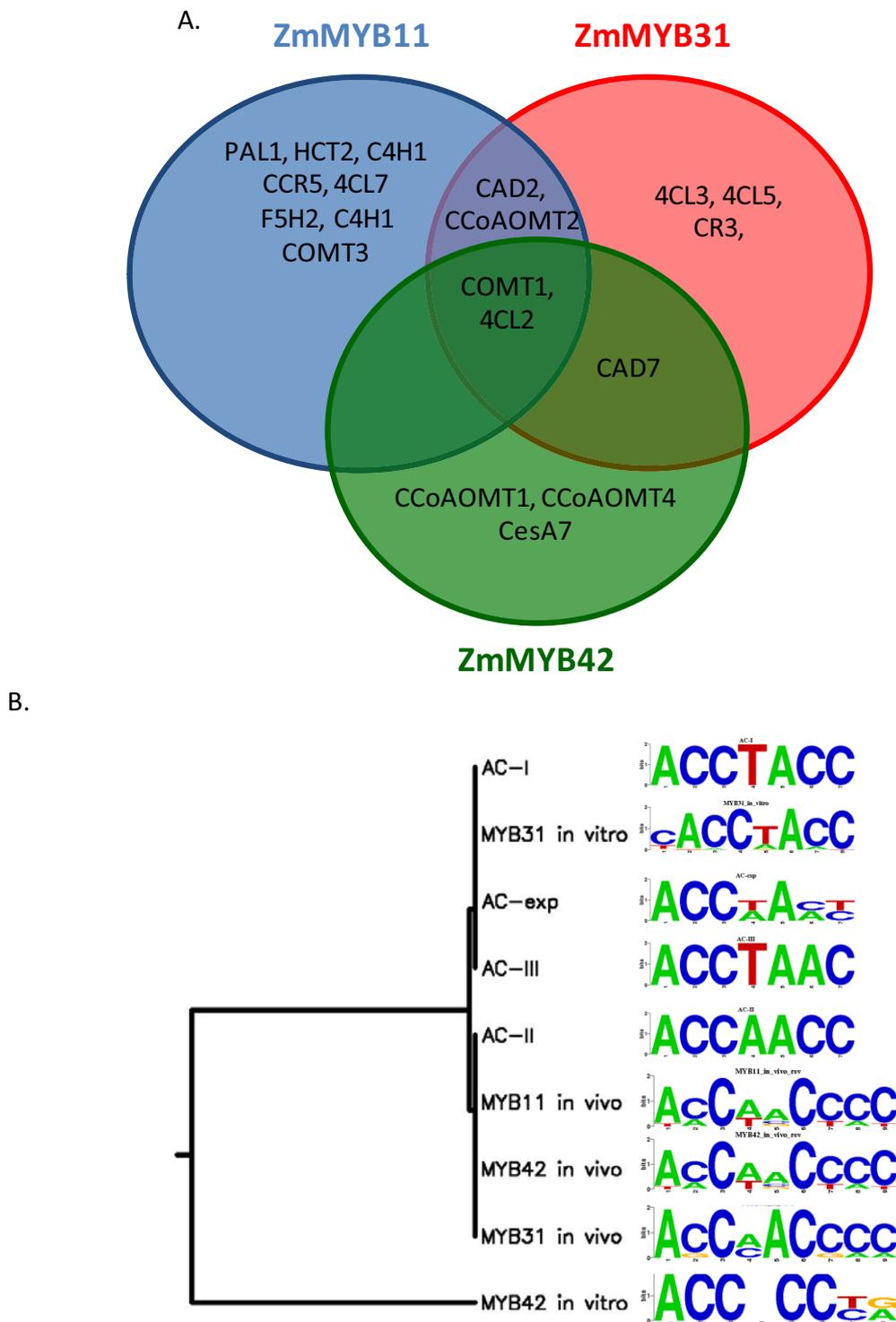


Figura 49. Dianas y sitios de unión *in vivo* e *in vitro* de los R2R3-MYB ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.
 A. Dianas específicas y comunes de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42. B. Árbol generado con las cajas AC canónicas AC-I (ACCTACC), AC-II (ACCAACC) y AC-III (ACCTAAC) (Hatton et al 1995, Lois et al 1989, Raes et al 2003), la caja AC extendida propuesta posteriormente ACC(T/A)A(A/C)(C/T) (Zhong & Ye 2012), las cajas obtenidas mediante experimentos de SELEX para ZmMYB31 (Fornale et al 2010b) y ZmMYB42 (C. Chai. Laboratorio del Dr. E. Grotewold. *Unpublished data*) y las secuencias consenso *in vivo* obtenidas utilizando el programa MEME. El árbol se generó empleando el programa STAMP con los siguientes parámetros: *Metric=PCC*, *alignment=SWU*, *gap-open=1000*, *GAP-extend=1000*, *-nooverlapalign*, *multiple alignment=PPA* y *tree=UPGMA*.

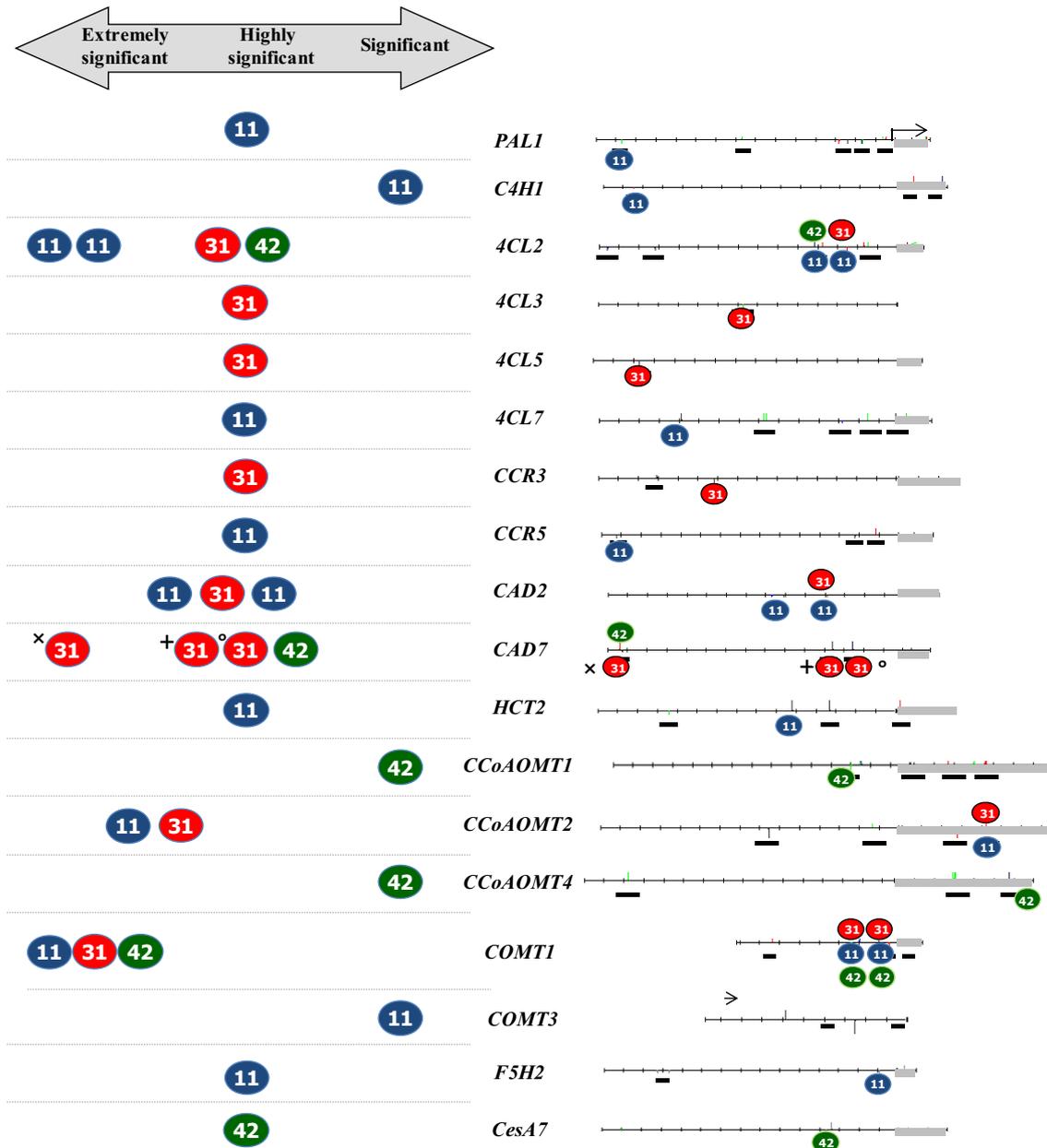


Figura 50. Cistoma de los genes de la ruta de la síntesis de lignina y miembros de la familia CesA de los R2R3-MYB ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.

A la izquierda se presenta la combinación de la significancia de los resultados de enriquecimiento obtenidos como mínimo en dos réplicas biológicas de ChIP qPCR con ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42. El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T-Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. A la derecha se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. Los símbolos x, + y o, indican la significancia de la interacción con cada sitio de unión en el caso de que estén presentes varias dianas en el mismo promotor.

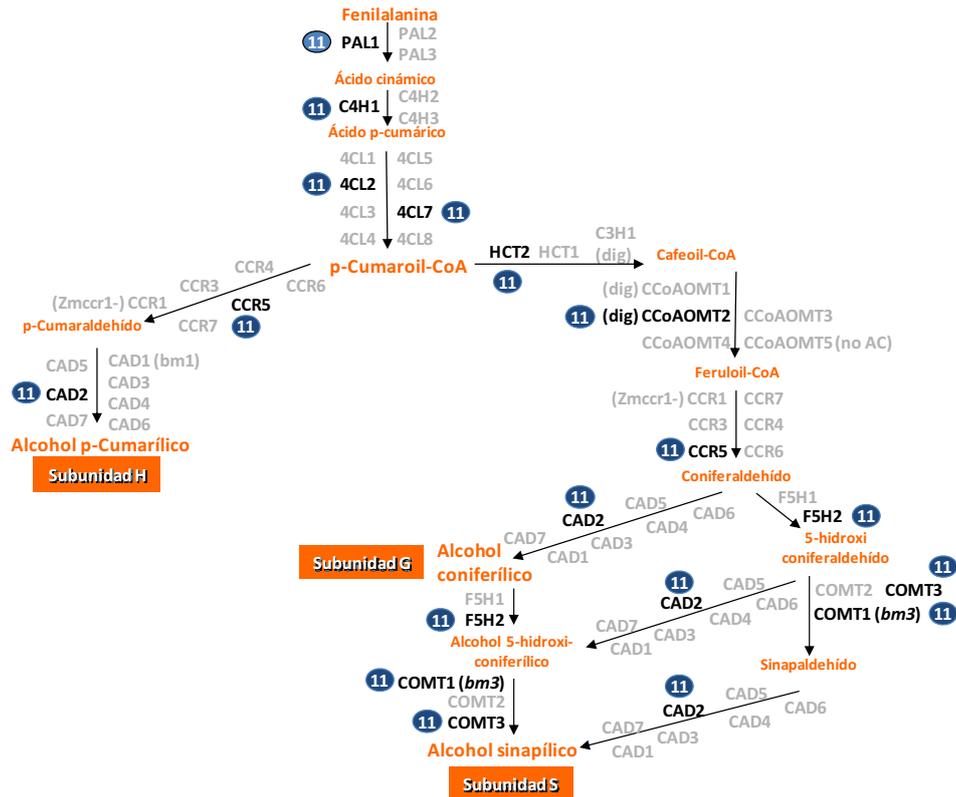


Figura 51. Cistoma de ZmMYB11 en la ruta de la síntesis de lignina.

Se presenta una visión de las dianas de ZmMYB11 en las diferentes familias involucradas en la síntesis de lignina.

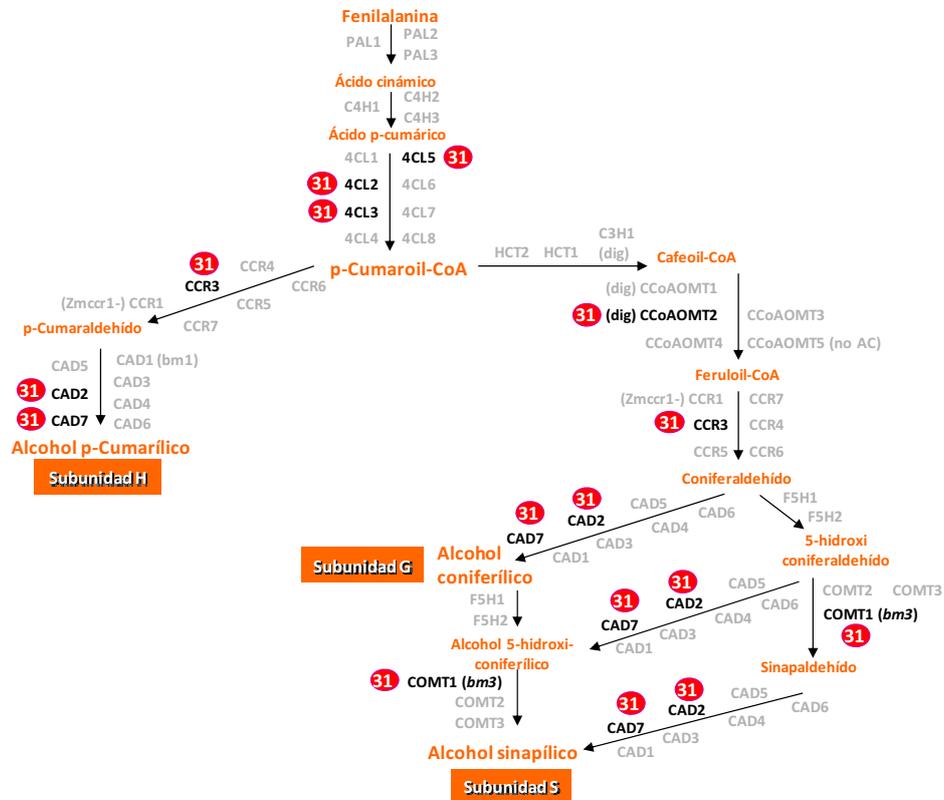


Figura 52. Cistoma de ZmMYB31 en la ruta de la síntesis de lignina.

Se presenta una visión de las dianas de ZmMYB31 en las diferentes familias involucradas en la síntesis de lignina.

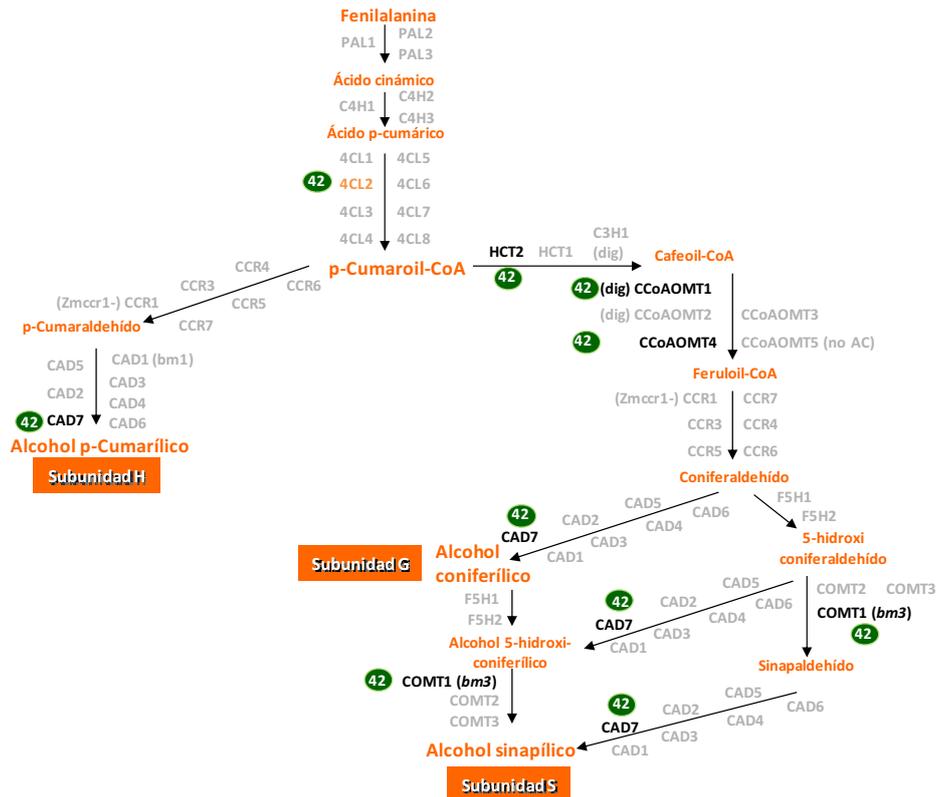


Figura 53. Cistoma de ZmMYB42 en la ruta de la síntesis de lignina.

Se presenta una visión de las dianas de ZmMYB42 en las diferentes familias involucradas en la síntesis de lignina.

3.3.2.8 Identificación de dianas de los R2R3-MYB ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42, mediante CHIP Seq

Con el propósito de identificar dianas a nivel genómico de los tres R2R3-MYB analizados se generaron librerías de CHIP. El número de librerías elaborado para ZmMYB11, ZmMYB31, ZmMYB42 y ZmInput fue de tres, cuatro, cuatro y tres, respectivamente (Figura 54). Hasta la fecha han sido secuenciadas 1 librería tanto de ZmMYB31, ZmMYB42 y ZmInput y dos de ZmMYB11. En la tabla 8 se muestran algunas dianas identificadas correspondientes a enzimas de la ruta de los fenilpropanoides. En los resultados se puede observar que dianas ya identificadas como ZmCOMT1, ZmA1 y CCR5, también aparecieron enriquecidos en los resultados de la secuenciación masiva. Por otra parte, algunos genes que codifican para enzimas de la ruta de la síntesis de

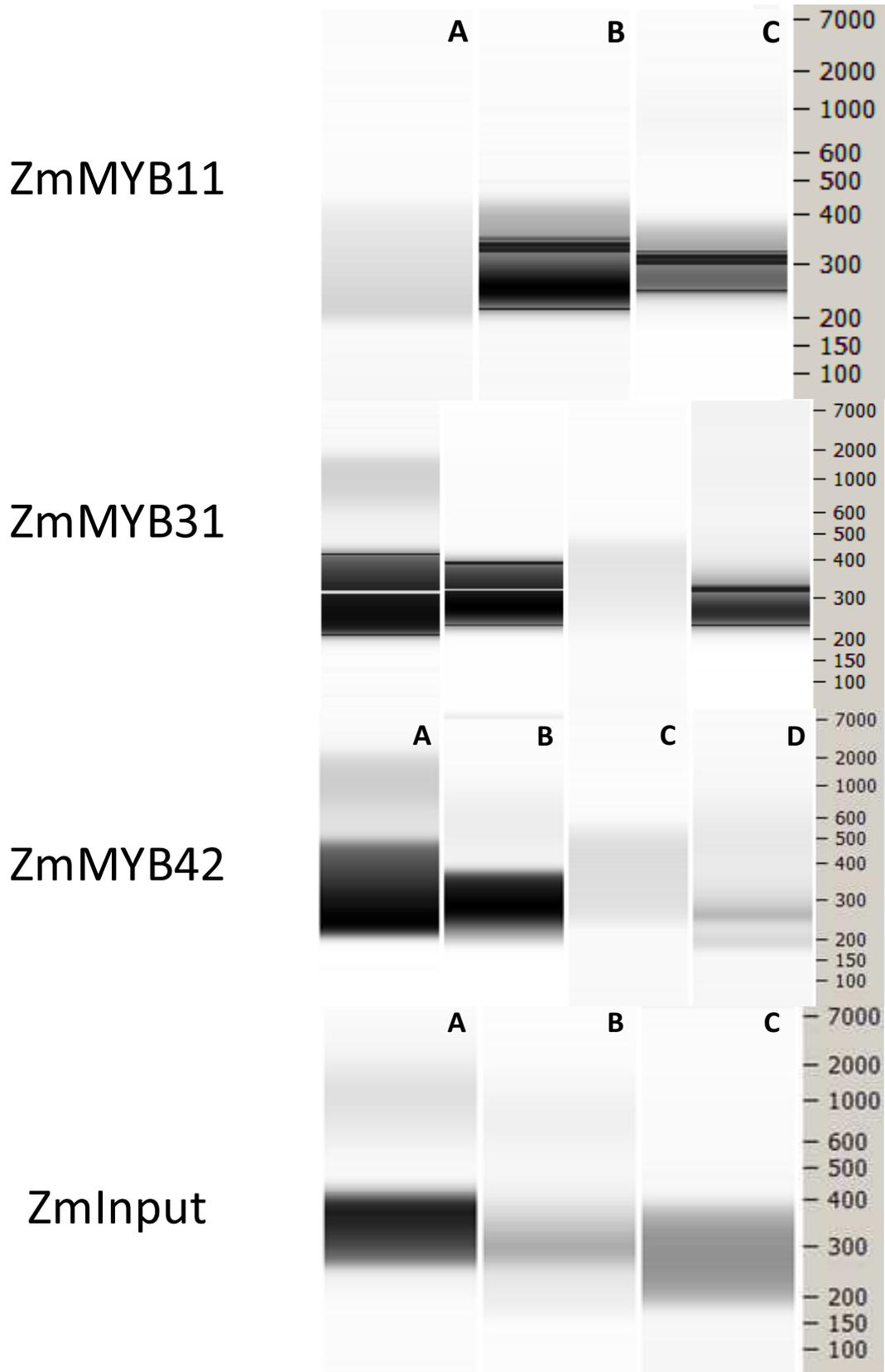


Figura 54. Librerías de CHIP de *ZmMYB11*, *ZmMYB31*, *ZmMYB42* y *ZmInput*.

Resultado del análisis de las librerías empleando Bioanalyzer. A, B, C y D representan réplicas biológicas independientes (n:16). Se observa el patrón de distribución entre 200 bp y 400 bp de librerías generadas con hojas de maíz.

lignina que no habían sido seleccionados para efectuar el análisis de CHIP qPCR, se encontraron enriquecidos en la secuenciación masiva siendo este el caso de GRMZM2G081582 (familia PAL), GRMZM2G017285 (familia CCR), GRMZM2G179981 (familia CCR) y GRMZM2G178769 (Familia HCT). Igualmente, algunos factores de transcripción que han sido descritos como relevantes en la regulación de la vía de los fenilpropanoides aparecen enriquecidos en los datos obtenidos con la secuenciación. Además, *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, aparecen enriquecidos en las librerías de *ZmMYB11* y *ZmMYB31* (tabla 9).

GRMZM	Nombre o familia	ZmMYB11	ZmMYB31	ZmMYB42
GRMZM2G081582	Familia PAL	OK		
GRMZM2G028677	C4H2	OK		
GRMZM2G131205	CCR1	OK		
GRMZM2G110881	CCR5	OK		
GRMZM2G017285	Familia CCR	OK		
GRMZM2G179981	Familia CCR	OK		
GRMZM2G700188	CAD4	OK		
GRMZM2G178769	Familia HCT	OK		
AC196475.3_FG004	COMT1	OK - OK	OK	
GRMZM2G026930	DFR (A1)	OK		
GRMZM2G161335	Bx9	OK		
GRMZM2G083130	3-GT			OK
GRMZM2G117246	F3H			OK
GRMZM2G166767	RHM1			OK

Tabla 8. Enzimas de la vía de los fenilpropanoides identificadas como dianas de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42 mediante CHIP Seq.

Estos resultados corresponden a dos librerías de *ZmMYB11* y una librería tanto de *ZmMYB31* como de *ZmMYB42*. OK y OK-OK, significa que la diana ha sido identificada en una o dos librerías, respectivamente.

GRMZM	Nombre o familia	ZmMYB11	ZmMYB31	ZmMYB42
GRMZM2G000818	ZmMYB11	OK-OK	OK	
GRMZM2G050305	ZmMYB31	OK-OK	OK	
GRMZM2G419239	ZmMYB42	OK-OK	OK	
GRMZM2G084583	Zm38/ZmMYB161	OK		
GRMZM2G084799	ZmP1	OK	OK	
GRMZM2G005066	ZmC1	OK		
GRMZM5G822829	ZmR	OK-OK	OK	
GRMZM2G051256	ZmMYB40	OK-OK	OK	
GRMZM2G064638	ZmbHLH139	OK	OK	
GRMZM2G171395	Similar a OsSAN1	OK		

Tabla 9. Factores de Transcripción de la vía de los fenilpropanoides identificadas como dianas de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42 mediante CHIP Seq.

Estos resultados corresponden a dos librerías de *ZmMYB11* y una librería tanto de *ZmMYB31* como de *ZmMYB42*. OK y OK-OK, significa que la diana ha sido identificada en una o dos librerías, respectivamente.

3.4 Discusión de resultados

3.4.1 Relevancia biológica y validez técnica del Cistoma construido para los MYB-R2R3 ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.

Los resultados obtenidos mediante ChIP nano qPCR se contrastaron con los datos de este tipo disponibles para ZmMYB31 (*Fornale et al 2010b*) y ZmMYB42 (Xinhui 2011), con el fin de evaluar su replicabilidad. Se había descrito en estos trabajos que ZmMYB31 y ZmMYB42, se unían *in vivo* al promotor de *ZmCOMT* (Zona amplificada C) y que ZmMYB31 y ZmMYB42 se unían específicamente a la región 5' de *ZmF5H1* (zona denominada A, en esta investigación) y *Zm4CL2* (cerca a la zona denominada C, en esta investigación), respectivamente. En total se habían evaluado 12 probables sitios de unión para ambos factores de transcripción (Figura 55).

Las zonas determinadas como enriquecidas en este estudio coinciden con los datos ya existentes de ChIP para ZmMYB31 y ZmMYB42, ya que en ambos trabajos la zona denominada como C del promotor de *ZmCOMT*, se estableció que es una diana de estos TF(s). Asimismo, en este proyecto en los experimentos de ChIP qPCR con ZmMYB42 se encontró que la zona C de la región 5' de *Zm4CL2* estaba enriquecida y esta zona es cercana a la región considerada como enriquecida (aproximadamente a 27 bp en los experimentos disponibles para ZmMYB42, Xinhui 2011). Además, las otras 5 zonas que son comunes en la evaluación entre los trabajos arrojaron un resultado similar, el cual fue, que no presentaban enriquecimiento. La única excepción fue *ZmF5H1* el cual estaba descrito como diana de ZmMYB31 y no presentó enriquecimiento en los experimentos de ChIP efectuados en el marco de esta tesis.

Entre las causas más probables de esta discordancia en los resultados se postuló que las plantas empleadas no tenían el mismo grado de desarrollo y el material no correspondían al mismo tipo de tejido, siendo usada la base de la segunda hoja de plantas de 9 días de edad en este proyecto y hojas de plantas de 3 semanas de edad en la publicación sobre *ZmMYB31*.

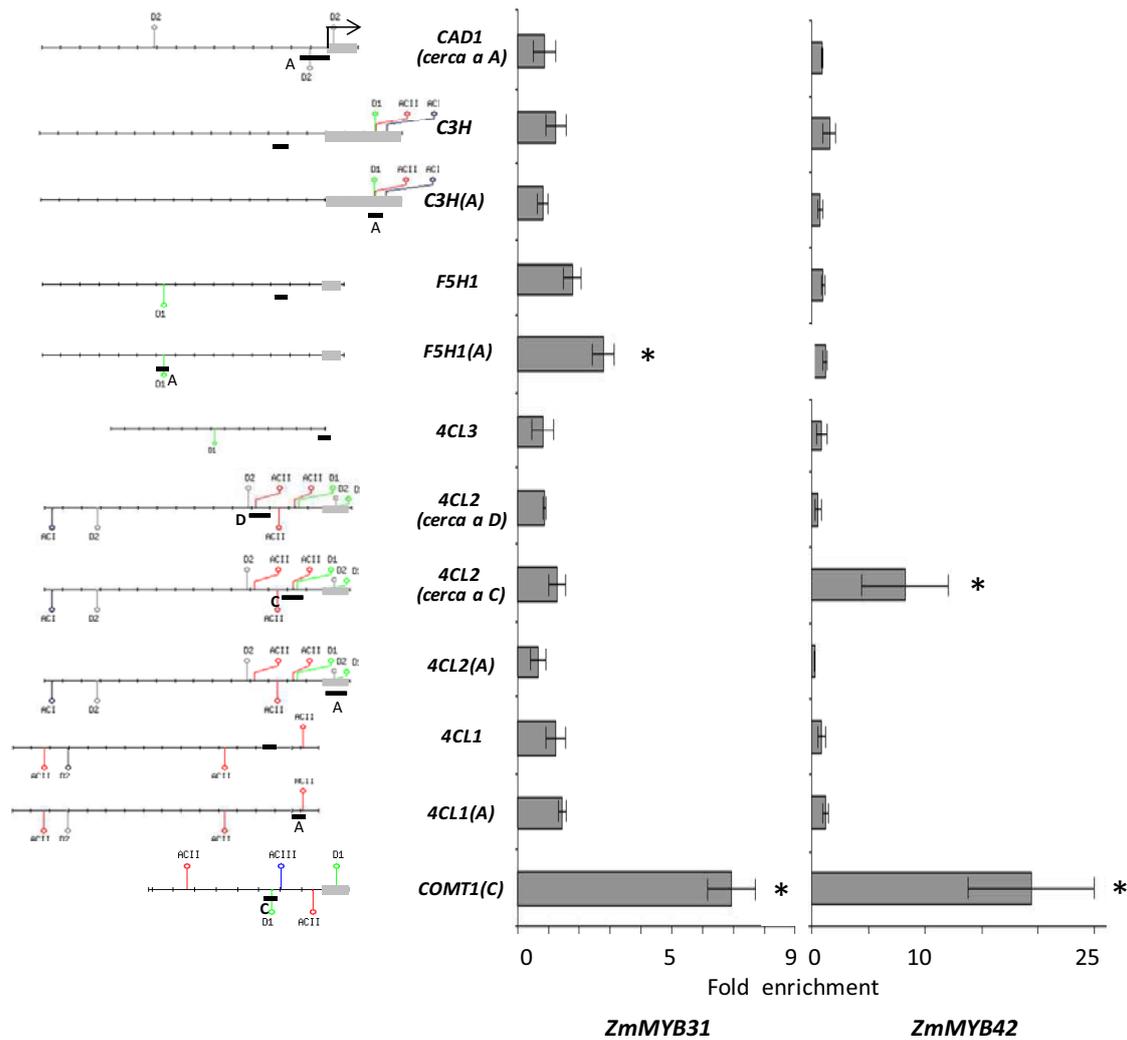


Figura 55. Dianas descritas para ZmMYB31 y ZmMYB42.

[Datos existentes para ZmMYB31 (Fornale et al 2010b) y ZmMYB42 (Xinhui 2011)]. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de las familias analizadas. Se indica con una flecha el sitio de inicio de transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC localizadas en los estudios antes citados, que a su vez corresponde con el área que amplificaron mediante CHIP qPCR. Las cajas AC que fueron investigadas en esta tesis se indican en color azul oscuro AC-I: (ACCTACC), rojo: AC-II (ACCAACC), azul: AC-III (ACCTAAC) y verde: cajas degeneradas D1(BCCWACC) y D2 (BACWACC). La letra corresponde a la posición de las regiones amplificadas en este proyecto y que coinciden o son próximas a las regiones analizadas en las publicaciones en mención. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de CHIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina hojas de plantas de *Maíz* de la variedad B73 de tres semanas de edad. El análisis de enriquecimiento es relativo al enriquecimiento del gen ZmActin. El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba t de Student. Los asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$). Las barras de error indican el error estándar.

Para concluir se puede afirmar que establecer la funcionalidad de un sitio de unión reviste una elevada complejidad, no estando claro actualmente, si los miles de sitios identificados por CHIP-Seq o los cientos encontrados por CHIP qPCR, verdaderamente representan acontecimientos de unión funcionalmente activos (Hoffman & Jones 2009). Este es un tema en el que debe profundizarse en la investigación. Hoffman, *et al.* (2009), exponen que sería de gran valor evaluar la funcionalidad de sitios de unión que estén categorizados en niveles de confianza descendientes, con el fin determinar si hay algún umbral, o profundidad en la secuenciación, en que los sitios funcionales están saturados en un experimento.

3.4.2 Preferencias de posición y secuencia diana en la unión a ADN de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.

En cuanto a la relación entre la posición de los TFBS(s) dentro de la zona adyacente a los genes y la afinidad de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42 a los mismos, en los resultados obtenidos mediante CHIP qPCR, no se observó una diferencia en la afinidad asociada con las distintas zonas de la región 5' de los genes analizadas. Los tres MYBs estudiados se unieron indistintamente a la 5' UTR, el núcleo del promotor y promotor proximal. Con la generación de datos a escala genómica mediante la técnica de CHIP Seq se ha observado que los factores de transcripción se unen a una amplia variedad de regiones en el genoma. No existiendo ninguna distinción en cuanto a la afinidad de unión entre zonas distales o proximales a los genes o genes activos o inactivos (Hoffman & Jones 2009).

En relación a la existencia de una preferencia en la hebra de ADN a la que se unen ZmMYB31 y ZmMYB42 con base en los datos de CHIP, se encontró que estos se unen *in vivo* a 5 y 4 sitios detectados en la hebra directa, respectivamente y a 7 y 5 sitios identificados en la hebra reversa complementaria, correspondientemente. Por lo tanto, en los resultados de CHIP no se encontró una preferencia en cuanto a una de las cadenas por parte de estos dos TF(s). Por el contrario, ZmMYB11 se une en la hebra directa en 9 casos y a la hebra reversa complementaria en 4, por lo cual probablemente tenga una mayor afinidad por los sitios ubicados en la cadena directa.

Sin embargo, esta observación debe contrastarse con los resultados de una aproximación que generé un mayor número de datos como el ChIP-Seq.

No se realizó una caracterización de las secuencias con las que ZmMYB11 interacciona con mayor afinidad *in vitro* (SELEX o PbMs), sin embargo empleando los resultados obtenidos en cuanto a interacción Proteína-ADN generados por ChIP, entre los genes de la ruta de la síntesis de lignina y ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42, se estimó *in vivo* la secuencia consenso de unión de estos TF(s) (matrices de peso de posición). La secuencia consenso *in vitro* obtenidas empleando la técnica SELEX para ZmMYB31 (Fornale et al 2010b) es similar a la obtenida *in vivo* para ZmMYB31, pero la secuencia originada por SELEX para ZmMYB42 (Datos sin publicar, C. Chai. Laboratorio del Dr. Grotewold), tiene menor similitud que la generada *in vivo* para ZmMYB42 y a su vez, diverge con relación a las típicas cajas AC. En general, los resultados *in vivo* indicaron que los tres *MYB-R2R3* estudiados se unen a secuencias levemente diferentes que en conjunto guardan similitud con la caja canónica AC-II. La coincidencia obtenida empleando distintas aproximaciones refuerza los resultados obtenidos y valida la aproximación de obtener una secuencia consenso de unión empleando los datos de ChIP.

3.4.3 Cistoma de los MYB-R2R3 *ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42* en la ruta de la síntesis de lignina.

Los resultados indican que ZmMYB11 *in vivo* se une a la región 5' de *ZmPAL1, ZmC4H1, Zm4CL2, Zm4CL7, ZmCCR5, ZmCAD2, ZmHCT2, ZmCCoAOMT2, ZmF5H2 y ZmCOMT*. Las tres primeras dianas hacen parte de familias de enzimas generales de la ruta de los fenilpropanoides. Por lo cual, su regulación probablemente impacte el contenido total de lignina. Por otra parte, *ZmCCR5, ZmCAD2* hacen parte de familias necesarias para la producción de unidades H, G y S, pero son junto a las enzimas generales de la ruta las únicas necesarias para la producción de unidades H. Es de anotar, también que *ZmCCR5* es una diana exclusiva de ZmMYB11.

Con respecto a *ZmHCT2* y *ZmCCoAOMT2* se puede mencionar que hacen parte de familias necesarios para la producción tanto de unidades G como S. Siendo *ZmHCT2* una diana exclusiva de *ZmMYB11* y *ZmCCoAOMT2* una diana común con *ZmMYB31*. Finalmente, al igual que *ZmMYB42* y *ZmMYB31* regula la expresión del gen que codifica para la enzima *ZmCOMT* y particularmente se une a la región 5' de *F5H2*.

La expresión heteróloga de *ZmMYB11* en *Arabidopsis* no generó alteraciones fenotípicas detectables a nivel macroscópico siendo por ejemplo el tamaño de las plantas igual al de individuos WT, a diferencia de lo observado en líneas de *Arabidopsis* en la que se expresaron constitutivamente *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, en cuyo caso las plantas sufrieron una disminución de tamaño (Fornale et al 2010b, Sonbol et al 2009). De igual modo, ni el contenido de lignina ni el ratio S/G se vieron modificados. En cuando a la represión de genes de la ruta de la vía de la lignina solamente se vieron alterados *AtC4H* y *AtHCT*. Es de anotar que *AtC4H* y *AtHCT2* son filogenéticamente cercanos a *ZmC4H1* y *ZmHCT2*, respectivamente, que como ya se mencionó son dianas de *ZmMYB11*. Además, el gen homólogo en *Arabidopsis* *AtMYB4*, presenta como diana a *AtC4H* (Jin et al 2000). Con base en estos datos se elaboró una propuesta de metabolon en el que se sugiere que las dianas de *ZmMYB11* probablemente estén involucradas en la síntesis de unidades H. Esto explicaría que en las líneas transgénicas de *Arabidopsis* expresando de forma heteróloga *ZmMYB11* no presenten una alteración en el ratio S/G (Figura 56).

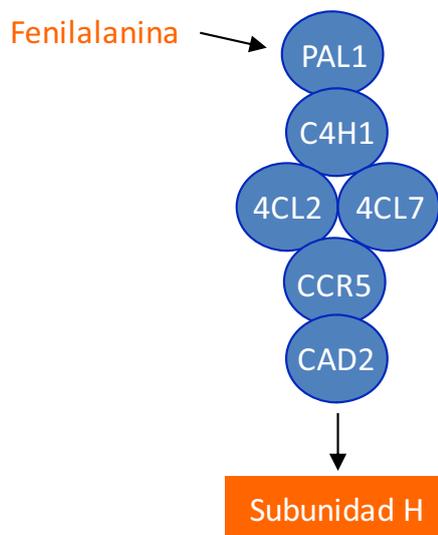


Figura 56. Propuesta de metaboloma asociado con el patrón de represión de ZmMYB11.

Esta propuesta de metaboloma se generó con base en el patrón de represión *in vivo* de ZmMYB11 y la expresión heteróloga de ZmMYB11 en Arabidopsis. Las dianas de ZmMYB11 estarían principalmente involucradas en la producción de subunidades H.

Por su parte ZmMYB31 *in vivo* se une a la región 5' de *Zm4CL2, Zm4CL3, Zm4CL5, ZmCCR3, ZmCAD2, ZmCAD7, ZmCCoAOMT2 y ZmCOMT*. La familia 4CL hace parte de las enzimas generales de la ruta de los fenilpropanoides y su regulación por tanto, es importante en la cantidad total de lignina producida. Tanto *Zm4CL3* como *Zm4CL5* son dianas específicas de *ZmMYB31* y por el contrario, *Zm4CL2* es una diana común con *ZmMYB11* y *ZmMYB42*. De igual modo, *ZmMYB31* posee dos dianas en la familia CAD que comparte con *ZmMYB11* y *ZmMYB42*, que son *ZmCAD2* y *ZmCAD7*, respectivamente. En contraste, en la familia ZmCCR presenta una sola diana de forma específica en relación a los otros dos MYB estudiados. *ZmMYB31* en la familia ZmCCoAOMT que como ya se mencionó hace parte de las enzimas necesarias para la síntesis de unidades G y S, posee una diana común con *ZmMYB11*, la cual es *ZmCCoAOMT2*. Por último, es necesario recordar que *ZmMYB31* comparte como diana a *ZmCOMT* con *ZmMYB11* y *ZmMYB42*.

Las líneas transgénicas de Arabidopsis que expresaban de modo heterólogo a *ZmMYB31* exhibieron una fuerte reducción de tamaño en comparación de las plantas WT, siendo de solo la tercera parte y sufrieron una dramática reducción del contenido total de lignina, el cual fue del 30 %; sin embargo no presentaron una alteración del ratio S/G. A nivel molecular la sobre-expresión de *ZmMYB31* en Arabidopsis, redujo la expresión de los genes *At4CL1, At4CL2, AtC3H, AtF5H* y *AtCOMT* (Fornale et al 2010b, Sonbol et al 2009). Siendo *At4CL3* y *At4CL2* filogenéticamente cercanas a *Zm4CL2* y *Zm4CL3*, las dianas de dicho gen identificadas *in vivo* en maíz. Además, los resultados de la sobre-expresión del *AtMYB4* mostraron una reducción en los niveles de expresión de *At4CL1* y *At4CL3*, aunque no se pudo comprobar que esta disminución se debiera a un efecto directo (Jin et al 2000). *At4CL1* es también filogenéticamente cercano a *Zm4CL2* y *Zm4CL3*. Considerando que el patrón de represión de *ZmMYB31* cubre principalmente enzimas relacionadas con la síntesis de unidades H, G y S como son 4CL y CAD y que la sobre-expresión heteróloga de *ZmMYB31* en Arabidopsis no generó una

alteración en el ratio S/G, pero si una caída en el contenido de lignina, se propone un metabolon asociado a ZmMYB31 involucrado principalmente en la producción total de monolignoles (Figura 57).

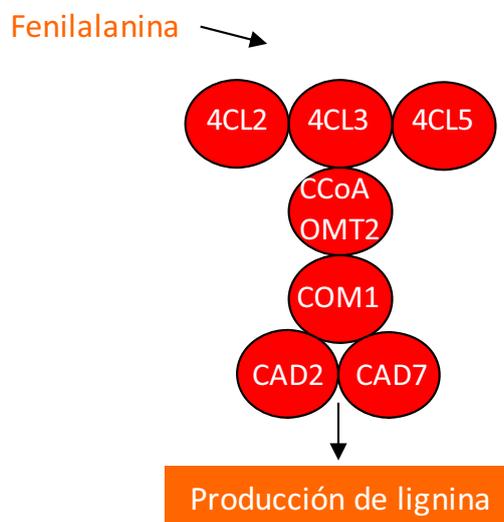


Figura 57. Propuesta de metaboloma asociado con el patrón de represión de ZmMYB31.

Esta propuesta de metabolon se generó con base en el patrón de represión *in vivo* de ZmMYB31 y la expresión heteróloga de ZmMYB31 en Arabidopsis. Los genes regulados por ZmMYB31 estarían relacionadas con la cantidad de lignina por ser enzimas generales de la ruta como la familia 4CL o por ser miembros de una misma familia pero especializados en la elaboración de unidades S o G y ser dianas del mismo gen. Esto último conduciría a la disminución de la generación de lignina sin alterar el ratio S/G y se plantea que podría estar ocurriendo con ZmCAD2 y ZmCAD.

Los resultados indican que ZmMYB42 *in vivo* se une a la región 5' de Zm4CL2, ZmCAD7, ZmCCoAOMT1, ZmCCoAOMT4 y ZmCOMT. Siendo los genes de la familia CCoAOMT específicos de ZmMYB42 al igual que el gen que codifica para ZmCesA7. La expresión heteróloga de ZmMYB42 en Arabidopsis produjo una reducción en el tamaño de la planta del 50 % y del contenido de lignina a un 60 %, con relación a las plantas WT. Sin embargo, lo más llamativo es que altero el ratio de unidades S/G, disminuyendo la cantidad de unidades S e incrementando las unidades G. En cuando a los efectos moleculares en Arabidopsis, ZmMYB42 redujo los niveles de expresión de AtPAL1, AtC4H, At4CL1, AtHCT, AtF5H, AtCAD6 y AtCOMT. At4CL1 también muestra una reducción en los niveles de expresión en las líneas que expresan de forma heteróloga ZmMYB31 (Fornale et al 2010b, Sonbol et al 2009). Esto es interesante si se considera que el homólogo cercado de dicho gen Zm4CL2 es una diana común entre los tres MYB-R2R3 estudiados. Estos resultados permiten sugerir una propuesta de metabolon

en el que las enzimas *ZmCAD7*, *ZmCCoAOMT1* y *ZmCCoAOMT4*, estarían participando principalmente en la generación de unidades S, lo cual explicaría la alteración en el ratio S/G en las líneas transgénicas *ZmMYB42* en *Arabidopsis* (Figura 58).

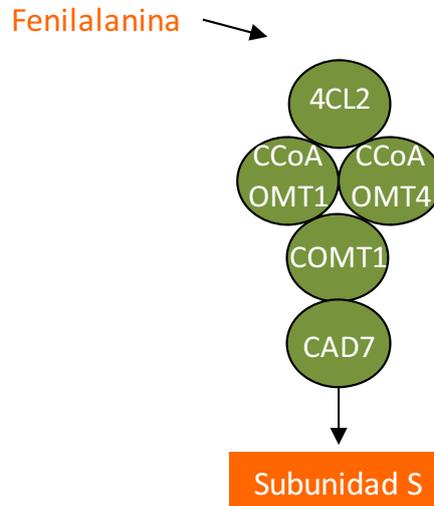


Figura 58. Propuesta de metaboloma asociado con el patrón de represión de *ZmMYB42*.

Esta propuesta de metabolon se generó con base en el patrón de represión *in vivo* de *ZmMYB31* y la expresión heteróloga de *ZmMYB42* en *Arabidopsis*. Las dianas de *ZmMYB11* estarían principalmente involucradas en la producción de subunidades S.

4. El modulo regulador AC-GATA/C en el promotor de ZmCOMT media la respuesta al Ácido Jasmónico

En algún sitio algo increíble espera ser descubierto.

Carl Sagan

4.1 Introducción

La coordinación de procesos biológicos en eucariotas ocurre debido a complejos sistemas de regulación entre los cuales se encuentra la regulación transcripcional, la cual a través de la acción combinada de los factores de transcripción, permite controlar la expresión génica y modular rutas metabólicas, en respuesta a los requerimientos de los diferentes momentos del desarrollo y a una gran variedad de estímulos ambientales. Uno de los mecanismos empleados para permitir que a partir de un número limitado de factores de transcripción se regule una amplia variedad de respuestas son los módulos reguladores en *cis*, que se pueden definir como combinaciones de sitios de unión en una región delimitada, donde varios factores de transcripción interactúan para regular la expresión de un gen (Turatsinze et al 2008).

En la ruta de la biosíntesis de fenilpropanoides se generan compuestos como los flavonoides, antocianinas y proantocianinas y la lignina. La vía de la síntesis de lignina presenta por tanto pasos comunes con los otros compuestos fenólicos e inicia con la desaminación de la fenilalanina para formar ácido cinámico, pero luego diverge para finalmente generar los monolignoles que dan lugar cuando son incorporados al polímero lignina a las subunidades p hidroxifenil-(**H**), guaiacílico (**G**) y syringyl (**S**), respectivamente (Boerjan et al 2003, Neutelings 2011). La lignina se forma por tanto mediante la polimerización oxidativa de los monolignoles.

Es de anotar que los genes de la vía de los fenilpropanoides son inducidos por herida (Bell-Lelong et al, 1997;. Ehltng et al, 1999;. Mizutani et al, 1997). La herida mecánica en *Arabidopsis* induce la expresión de genes de la ruta de la síntesis de lignina como *AtPAL2*, *At4CL*, *AtCCR* y *AtCOMT*, y esta respuesta es dependiente de la proteína F-box COI1 (CORONATINE INSENSITIVE1) que es el co-receptor de la fitohormona Ácido Jasmónico (JA), esencial en el núcleo del módulo de señalización por JA en plantas y el cual forma parte del complejo tipo E3 ubiquitina ligasa Skp-Culina-F-box (SCFCOI1) (Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002). Prueba de lo anterior, se evidencia en que en el mutante insensible a JA *coi1-1* no incrementan los niveles de expresión de dichos genes de la ruta de la síntesis de lignina (Reymond et al 2000). La expresión de un gen

reportero controlado por el promotor del gen que codifica para *ZmCOMT* tanto en maíz como en tabaco es inducida por herida (Capellades et al 1996) y de igual modo, en tabaco un gen reportero controlado por el promotor del gen que codifica para ácido Cafeico O-metiltransferasa de clase II (COMT II), es inducido por herida y MeJA (Toquin et al 2003). Ha sido descrito además que la ruta de los monolignoles es activada a nivel transcripcional no solo en respuesta a herida sino a Ácido Jasmónico en un mecanismo dependiente de COI1 (Devoto et al 2005) y que el incremento de dichos genes por la aplicación de MeJA, da lugar a un aumento en la producción de monolignoles y oligolignoles, que son los bloques de construcción de la lignina (Pauwels et al 2008).

Los genes MYB están involucrados en múltiples procesos biológicos de la planta como el crecimiento y la diferenciación celular (Lee & Schiefelbein 1999), la morfogénesis celular (Romero et al 1998), el metabolismo de los fenilpropanoides (Deluc et al 2006, Sablowski et al 1994) y la respuesta a estímulos de origen hormonal y medioambiental (Xie et al 2010), entre muchos otros. Los MYB presentan un dominio conservado de unión a ADN (DBD), que es homólogo al DBD animal c-Myb (Aasland et al 1996) y que está conformado típicamente por entre 1 a 4 repeticiones imperfectas (R) (Dubos et al 2010, Lipsick 1996). Cada repetición es de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud y codificada para un 3 a-hélice.

En plantas el gen C1 de maíz implicado en la biosíntesis de antocianinas, fue tanto el primer TF identificado como el primer miembro de la familia MYB aislado (Paz-Ares et al 1987). El tipo más común de genes MYB existentes en plantas son los *R2R3-MYB* (con 2 repeticiones), estos forman una familia multigénica amplia, de la que hasta el momento se han encontrado en maíz 88 genes y en Arabidopsis 137 genes (Feller et al 2011).

Considerando la elevada conservación del DBD, se han empleado principalmente los motivos aminoácídicos presentes en la región C-terminal para dividir la familia *R2R3-MYB* en 22 sub-grupos en Arabidopsis (Dubos et al 2010, Kranz et al 1998, Xie et al 2010). Los *MYB-R2R3* del subgrupo cuatro han sido descritos como represores

transcripcionales que intervienen en la regulación de la biosíntesis de monolignoles (Fornale et al 2010a, Hemm et al 2001, Jin et al 2000, Sonbol et al 2009).

En *Arabidopsis*, se han estudiado dos miembros de los *MYB-R2R3* del subgrupo cuatro *AtMYB4* y *AtMYB32*. En la biosíntesis de fenilpropanoides *AtMYB4* reduce la expresión del gen *AtC4H* que codifica para una enzima involucrada en uno de los primeros pasos de la ruta (Jin et al 2000) y *AtMYB32* regula la expresión de *AtCOMT*, ya que el mutante de pérdida de función *atmyb32* muestra ligeramente mayor expresión de *AtCOMT* (Preston et al 2004). Además, ha sido descrito que *AtMYB4* y otro miembro del subgrupo 4 denominado *AtMYB7*, se inducen por aplicación de MeJA a nivel transcripcional (Yanhui et al 2006). En cuanto a los *R2R3-MYB* del subgrupo 4 de maíz se puede anotar, que la expresión heteróloga de *ZmMYB42* y *ZmMYB31* en *Arabidopsis*, ocasiona la reducción de los niveles de expresión de algunos de los genes de la biosíntesis de lignina. En *maíz* se demostró *in vivo* que *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, directamente se unen al promotor del gen de la ruta de la síntesis de lignina *ZmCOMT* (Fornale et al 2010b, Gray et al 2012) y se conoce que estos genes se inducen en respuesta a herida (Fornale et al 2006).

De otra parte, se debe anotar que recientemente se ha identificado un nuevo factor de transcripción de maíz llamado *ZmZIM91*, que pertenece a la subfamilia ZIM de la familia TIFY, se une *in vivo* al promotor de *ZmCOMT* a través del motivo de unión a DNA GATC/GATA. Los resultados de la investigación muestran que *ZmZIM91* actúa como un represor del promotor de *ZmCOMT* y que además se degrada por herida y MeJA. También se estableció que el factor de transcripción *ZmZIM91* podía interactuar con los factores *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, que son dos miembros *MYB-R2R3* del subgrupo cuatro (Vélez-Bermúdez, I.C., 2013).

Con base en estos datos se estableció la hipótesis de que probablemente *ZmMYB11* u otro miembro del subgrupo cuatro de los *R2R3-MYB* y *ZmZIM91* actuarían como un modulo regulador *in cis*, relevante en la regulación de *ZmCOMT* en respuesta a MeJA.

Una de las modificaciones más notables en la estructura de la lignina proviene de la alteración de COMT. Se ha establecido que el mutante natural *brown midrib3* (*bm3*) de maíz, presenta una reacción en el nivel de expresión del gen que codifica para COMT. Las plantas que presentan la mutación *bm3* exhiben una pigmentación de color marrón rojizo en la vena central de la hoja cuando la planta posee entre cuatro y cinco hojas, además tienen alterada la composición de la lignina y muestran mayor digestibilidad (Vignols et al 1995). Así mismo, una línea transgénica con la expresión del gen *ZmCOMT* reducida exhibió una drástica modificación del contenido y composición de la lignina y presento mejor digestibilidad (Piquemal et al 2002).

Finalmente, es de anotar que los polímeros de la pared secundaria (celulosa, hemicelulosa y lignina), conforman la denominada biomasa lignocelulósica, que es el tipo de biomasa más abundante en el planeta y puede ser utilizada para la producción de combustibles líquidos (Bioetanol, de segunda generación) o la alimentación animal. Sin embargo, para emplear la biomasa lignocelulósica es necesario reducir la complejidad de estos biopolímeros y transformarlos en moléculas más simples, para lo cual la lignina es una característica no deseada (Zhong & Ye 2009). Por tanto, es importante estudiar la regulación de la síntesis de lignina, en especial de los TF(s) encargados de la represión de las enzimas que hacen parte de esta vía para emprender mejoras biotecnológicas.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Análisis de proteínas mediante *Western Blot*

La obtención de extractos proteicos vegetales, la electroforesis de proteínas en gel SDS-PAGE y transferencia de proteínas se efectuó como se describe en el capítulo 2.

Las plantas de maíz fueron tratadas con MeJA como se describe a continuación:

Empleando un spray se pulverizaron muestras por una parte con 0.01% de MeJA diluido en agua destilada (inicialmente el MeJA se diluye en DMSO hasta una concentración del 10%) y por otra, con DMSO diluido en agua destilada como control

(Mock). Los tratamientos con MeJA+MG132, se efectuaron de la misma manera empleando 0,01% de MeJA mezclado con 100 μ M de MG132 y diluido en agua destilada y como control DMSO diluido en agua destilada. Los tratamientos se efectuaron en cubículos cerrados. Se emplearon los anticuerpos contra la proteína endógena α ZmMYB11 y α ZmZIM91.

4.2.2 Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los ChIP fueron realizados como se explica en el capítulo 2. Para la realización de serial ChIP se siguió el protocolo convencional con algunas modificaciones y se empleo la metodología propuesta en una publicación sobre la técnica (Xie & Grotewold 2008). Se adicono al protocolo de ChIP la realización de un cross-linking entre las Dynabeads/Protein A (Invitrogen) y los anticuerpos antes de la primera inmunoprecipitación con el fin de evitar contaminación cruzada en la segunda inmunoprecipitación y se efectuó la primera elución de ADN siguiendo las recomendaciones del documento sobre serial ChIP (Xie & Grotewold 2008).

4.2.3 Análisis de material inmunoprecipitado mediante ChIP qPCR y ChIP Nano-qPCR

Las PCR cuantitativas fueron realizadas empleando LightCycler[®] 480 DNASYBR Green I Master (Roche Diagnostics, BS, SE) en 10 ul de reacción. Para elaborar la reacción se emplearon 2.5 ul de ChIP o Input provenientes de una dilución 1:3, los cuales se adicionaron a 5 ul de mix y 0,3 μ L de cada cebador (10 μ M; concentración final 0,3 μ M). La amplificación se llevo a cabo utilizando el equipo LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, BS, SE) y un programa de amplificación en el que primero se desnaturalizo el ADN empleando 95 °C durante 10 minutos y posteriormente, se efectuaron 40 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y extensión a 60 °C por 1 minuto. Los experimentos de Nano-qPCR se realizaron empleando el sistema de micro fluidos BioMark HD System (Fluidigm), como se describe en el capítulo 2.

4.2.4 Extracción y purificación de ARN de maíz

El material empleado para la extracción de ARN fue plántulas de maíz de 9 días de la variedad B73 crecidas en invernadero. Específicamente el material se obtuvo cortando 4 cm a partir de la base de hoja ligule 2 (El mismo material utilizado para hacer ChIP).

La extracción inicio con la trituración de 300 mg de material vegetal usando nitrógeno (N_2) líquido y morteros libres de RNasas. El material macerado se resuspendió en 1 ml de Trizol, se transfirió a un tubo eppendorf y se incubo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se adiciono 0.2 ml de cloroformo, se agitaron los tubos durante 15 segundos y se mantuvieron 3 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a centrifugar las muestras a 12,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se le añadió 0.5 ml de isopropanol, se realizo una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación la muestra fue centrifugada a 12,000 x g 10 minutos a 4 °C. Se retiro el sobrenadante, el pellet fue lavado con etanol fresco al 75% y se realizo una centrifugación de la muestra a 7,500 x g durante 5 minutos a 4 °C.

Finalmente, el sobrenadante fue retirado, el pellet se dejó 15 minutos a temperatura ambiente hasta que se terminara de evaporar los restos de etanol y finalmente se resuspendió el ARN en agua *milli-Q* libre de RNasas.

4.2.5 Generación de cDNA

EL cDNA se genero usando las muestras de ARN obtenidas como se describe en el punto anterior y el *Kit QuantiTect® Reverse Transcription* (QIAGEN) y el protocolo sugerido por la casa comercial.

4.2.6 Cuantificación de niveles de expresión mediante qPCR

Para efectuar la cuantificación empleando qPCR las muestras de cDNA se diluyeron 1:5 en H_2O . La reacción se elaboro empleando 2 μ L de cDNA (15-25 ng/ μ L), 5 μ L de SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics, BS, SE), 0,3 μ L del cebador directo (10 μ M; concentración final 0,3 μ M), 0,3 μ L del cebador reverso (10 μ M; concentración

final 0,3 μ M) y 2,4 μ L de H₂O. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 10. La reacción se llevo a cabo en el equipo Lightcycler 480 (Roche Diagnostics, BS, SE), empleando un programa de amplificación que consta de una desnaturalización inicial de 3' a 94 °C y 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30" e hibridación y extensión a 60 °C durante 30". Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Nombre cebador	Maize genome version 5b.60	Secuencia cebador
MYB11UTR5'_A5'	GRMZM2G000818	GAACGTTGTGGACTTGCATC
MYB11UTR5'_A3'	GRMZM2G000818	AACGAGAGATGCAAACATCG
91UTR3'A5'	GRMZM2G058479	GCGGTCAGCTGCTGTACTAT
91UTR3'A3'	GRMZM2G058479	GCACTGTCATAGCTCTTAACACAGG
COMTUTR5'A5'	AC196475.3_FGT0045	GAGCCCAGCAGAGAAAAGG
COMTUTR5'A3'	AC196475.3_FGT0045	GAGCCCATGGCTATTACGAT
actin1F'	GRMZM2G126010	TTTAAGGCTGCTGTACTGCTGTAGA
actin1R'	GRMZM2G126010	CACCTTCTGCTCATGGTTTAAGG

Tabla 10. Secuencia de los cebadores usados para realizar análisis de expresión mediante qPCR.

F' y R': Significa que el cebador está ubicado en la cadena directa o reversa, respectivamente.

4.2.7 Experimentos de expresión transiente en protoplastos de maíz

La transformación transiente de protoplastos de maíz y los ensayos empleando el gen reportero *Luciferasa*, se llevaron a cabo de igual modo que como se describe en el capítulo 2.

4.2.8 Ensayos de interacción proteína-proteína

4.2.8.1 Complementación Bimolecular

Los experimentos de complementación bimolecular se efectuaron utilizando dos plásmidos pENTRY3C modificados para Complementación Bimolecular (BiFC) y recombinación empleando el sistema GATEWAY desarrollados por A. Ferrando (Ferrando *et al.*, 2000), disponibles en (<http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>). Estos plásmidos fueron transfectados en protoplastos de maíz. La detección de la YFP se efectuó usando un microscopio Confocal Olympus.

4.2.8.2 Ensayos con el sistema de doble híbrido

Para la detección de la interacción entre dos proteínas mediante la técnica de doble híbrido, se utilizaron las cepas de *Levadura* pJ694 α y YM4271a. La cepa pJ694 α se transforma con el plásmido que contiene la proteína fusionada al dominio de unión BD (BD-X) y se siembra en placas con medio SD-T. De igual modo, se transforma la cepa YM4271a con el plásmido que tiene la proteína fusionada al dominio de activación AD (AD-Y) y se siembra en medio SD-LT. El ensayo inicia con la inoculación de 2 ml de medio YPAD con colonias fresca de la construcción en la cual esta codificada la proteína fusionada a BD-X e igualmente se inocula un cultivo de 2ml de medio YPAD con la construcción que contiene la proteína unida al AD-Y. Estos cultivos se incuban a 28 °C durante 24 horas en agitación. Seguidamente se adiciona a un tubo de 10 ml, 500 μ l de cultivo BD-X y 500 μ l del cultivo AD-Y, se efectúa la mezcla de ambos y se incuba por 48 h a 28 °C sin agitación. Se procede a la preparación del enriquecimiento empleando células diploides, para lo cual se inoculan 2 ml de medio SD-LT con 200 μ l de la mezcla de los cultivos BD-X y AD-Y y se lleva a cabo una incubación a 28 °C con agitación por 48 h. A continuación, se generan tres alícuotas de este ultimo cultivo a diferentes concentraciones: Sin diluir, 10^{-1} y 10^{-2} . Finalmente, se siembra en forma de gota 5 o 10 μ L de las diluciones en medio agar SD-LT (comprobación de mating) y SD-HLT (comprobación de la interacción de las proteínas).

Medio YPAD (500 mL): 10 g Peptona, 5 g Yeast extract, 10 g D-glucosa y 10 gr Agar (Difco o BD). Se ajusta el pH a 5,8 en un volumen de 500 ml. Este medio se autoclava durante 15 minutos, se enfría a 55 °C y se le añade 7,5 ml de la solución de Adenina hemisulfato al 0,2% (p/v).

Medio SD- (450 mL): 3,35 gr de Yeast Nitrogen Base (without amino acids), 10 gr D-glucosa, 10 gr Agar (Difco). Se ajusta el pH a 5,8 en un volumen de 450 ml. Se autoclava el medio durante 15 min, se enfría a 55 °C y se le adiciona 50 ml de la solución 10xDO apropiada, previamente autoclavada por 15 minutos.

10x DO-LT (200 ml): 1,28 gr DO-LT en 200 ml de agua

10x DO-L (200 ml): 1,38 gr DO-L en 200 ml de agua

10x DO-T (200 ml): 1,58 gr DO-T + en 200 ml de agua

10x DO-HLT (200 ml): 1,24 gr DO-His-Leu-Trp en 200 ml de agua.

4.2.8.3 Experimentos de Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)

Para efectuar las inmunoprecipitaciones se empleo como material de partida 500 mg de material vegetal proveniente de la base de hoja ligule 2 de tres plantas de maíz de 9 días de la variedad B73. El material fue triturado empleando nitrógeno liquido y un mortero. Se emplearon los anticuerpo purificados α MYB11 y α ZIM91 y el kit Dynabeads Co-Immuno-precipitation Cat. No. 143.21D (INVITROGEN). El material triturado fue diluido en 500 ul de buffer de lisis. Los anticuerpos fueron incubados durante 12 horas a 4 °C en agitación. Las inmunoprecipitaciones se realizaron siguiendo las recomendaciones de la compañía.

4.2.9 Generación de construcciones de fragmentos de ADN de *Zea mays*

Para la clonación de fragmentos de ADN se empleo la tecnología Gateway (Invitrogen). En la tabla 11 se muestran las construcciones empleadas en la investigación y los vectores en los cuales se generaron.

El modulo regulador AC-GATA/C en el promotor de *ZmCOMT*

Nombre del plásmido	Vector	Resistencia	Información adicional
35S::MYB11:GFP	16LF-51(C-GFP) Procedente: Lab. JC Jang	Carbenicilina	ZmMYB11 controlado por un promotor 35S y fusionado a GFP
ZmMYB11 [EAR-Mutated]- Entryclone	pDONR 221	Kanamicina	Clon de entrada Gateway
35S::MYB11 [EAR- Mutated]:GFP	16LF-51(C-GFP) Procedente: Lab. JC Jang	Carbenicilina	ZmMYB11 controlado por un promotor 35S y fusionado a GFP
35S:: ZmZIM91:GFP	16LF-51(C-GFP) Procedente: Lab. JC Jang	Carbenicilina	ZmZIM91 controlado por un promotor 35S y fusionado a GFP. Procedente: (Velez-Bermudez 2013)
35S::MYB11:YFP ^N	YFP ^N Procedente: Ferrando et al., 2000	Kanamicina	Construcción utilizada en transformación transitoria para efectuar complementación Bimolecular
35S::MYB11:YFP ^C	YFP ^C Procedente: Ferrando et al., 2000	Kanamicina	Construcción utilizada en transformación transitoria para efectuar Complementación Bimolecular
35S::MYB11 [EAR- Mutated]:YFP ^N	YFP ^N Procedente: Ferrando et al., 2000	Kanamicina	Construcción utilizada en transformación transitoria para efectuar complementación Bimolecular
35S::MYB11: [EAR- Mutated]YFP ^C	YFP ^C Procedente: Ferrando et al., 2000	Kanamicina	Construcción utilizada en transformación transitoria para efectuar Complementación Bimolecular
35S::MYB91:YFP ^N	YFP ^N Procedente: Ferrando et al., 2000	Kanamicina	Construcción utilizada en transformación transitoria para efectuar complementación Bimolecular Procedente: (Velez-Bermudez 2013)
35S::MYB91:YFP ^C	YFP ^C Procedente: Ferrando et al., 2000	Kanamicina	Construcción utilizada en transformación transitoria para efectuar complementación Bimolecular Procedente: (Velez-Bermudez 2013)
MYB11- PGBKT7	PGBKT7	Kanamicina	Vector usado para ensayo de doble híbrido; dominio BD. Gateway.
MYB11- PGADT7	PGADT7	Carbenicilina	Vector usado para ensayo de

ZIM91- PGBKT7	PGBKT7	Kanamicina	doble híbrido; dominio AD. Gateway. Vector usado para ensayo de doble híbrido; dominio BD. Gateway.
ZIM91- PGADT7	PGADT7	Carbenicilina	Vector usado para ensayo de doble híbrido; dominio AD. Gateway.
pZmCOMT::luc	pGWB635	Espectinomicina	Promotor conduciendo el gen reportero <i>Luciferase</i> en experimentos de transformación transitoria.
pZmCOMT-Mut::luc	pGWB635	Espectinomicina	Promotor conduciendo el gen reportero <i>Luciferase</i> en experimentos de transformación transitoria.

Tabla 11. Construcciones utilizadas en el estudio de la regulación del modulo AC - GATA/C.

4.2.10 Análisis de datos

4.2.10.1 Análisis de datos de regiones enriquecidas en elementos reguladores en *cis* CRERs

Con el fin de establecer si la región 5' del gen COMT de varias especies de plantas y de los genes de las familias implicadas en la síntesis de lignina se encontraba enriquecida en el probable modulo regulatorio AC-GATA/C se empleo el programa matrix-scan (Turatsinze JV, 2008), el cual identifica los CRMs como regiones enriquecidas en elementos reguladores en *cis* (CRERs) y se encuentra disponible en línea en <http://rsat.ulb.ac.be/>. Para la identificación de probables CRMs en la región 5' de los genes se emplearon matrices transfac que representan la afinidad de un TF por un determinado sitio de unión, las cuales fueron construidas a partir de los datos obtenidos *in vitro* mediante PMB11 para ZmZIM91 e *in vivo* a través de los experimentos de ChIP con ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42.

Los parámetros empleados para la identificación de CRERs correspondientes a dianas putativas de ZmZIM91 y ZmMYB11 en la región 5' del gen COMT de varias especies de plantas fueron los siguientes: CRERs (Cis-Regulatory element Enriched Regions),

background model: Markov Chain Order 0 (construido a partir de las secuencias Input) y CRER sig: 2. En la búsqueda de de CRERs en la región 5' de los genes implicados en la síntesis de lignina se emplearon las condiciones que se muestran seguidamente: background model: Markov Chain Order 3 (construido con las secuencias de la región correspondiente a 1500 bp aguas arriba de todos los genes identificados en el genoma del maíz), CRER size: 30 - 500, site P-value: 1e-3, CRER sites: 1e-3, CRER pval: 1e-3 y CRER sig: 1.

4.2.10.2 Análisis de datos de expresión obtenidos por qPCR

Para cuantificar los niveles de expresión génica se empleo el método del doble delta CT. El ratio de cambio en la expresión del gen diana en cada punto de tiempo fue calculado como se describe a continuación (Livak & Schmittgen 2001, Stephenson 2010):

$$\text{Fold change} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta\Delta Ct = (\text{CT Gen diana} - \text{CT Actin})_{\text{tratamiento}} - (\text{CT Gen diana} - \text{CT Actin})_{\text{control}}$$

4.2.10.3 Análisis de datos de CHIP qPCR y CHIP Nano qPCR

Para la determinación de la ocupación de los TF(s) de una región determinada se utilizo el método basado en el % de Input. En el caso de los datos obtenidos de CHIP secuencial se calculo el % de Input y se siguió la metodología sugerida en una revisión de la técnica (Xie & Grotewold 2008). El análisis de enriquecimiento en muestra sometidas a tratamiento se calculo como la diferencia en el enriquecimiento entre los grupos tratado y control (Fold difference), se calculo dividiendo el **Fold Enrichment** del grupo tratado por el **Fold Enrichment** del grupo control.

Fold Difference = Fold Enrichment del grupo tratado/ Fold Enrichment del grupo control.

$$\text{Fold Enrichment} = 2^{(-\Delta\Delta Ct [IP])}$$

$\Delta\Delta Ct [IP] = \Delta Ct \text{ Diana [ChIP Normalizado con relación al input]} - \Delta Ct \text{ Referencia [ChIP Normalizado con relación al input]}$

Para cada pareja de cebadores se sustraen los CT (Input) de los CT (ChIP), para obtener un **$\Delta Ct[\text{ChIP Normalizado con relación al input}]$** . Este valor representa la diferencia en ciclos entre el ChIP y el Input. **$\Delta Ct[\text{ChIP Normalizado}]$** : (Ct [ChIP] - (Ct [Input])). La corrección del factor de dilución del Input se efectuó como se describe en el Capítulo 3.

4.2.10.4 Procesamiento de datos de ensayos de gen reportero *Luciferasa*

Los datos se procesaron como se explica en el capítulo 3.

4.3 Resultados

4.3.1 Identificación de las regiones de unión de ZmZIM91 al promotor de ZmCOMT

En esta investigación previamente había sido demostrado que ZmMYB11 interactuaba con el promotor de ZmCOMT y en un estudio previo había sido establecido que ZmZIM91 se unía a este promotor (Velez-Bermudez 2013), (región C de la figura 59). Con el fin de identificar detalladamente las zonas del promotor a los que se unía ZmZIM91, se llevó a cabo un experimento de ChIP qPCR empleando los anticuerpos α ZIM91 y como diana las mismas regiones del promotor de ZmCOMT estudiadas para ZmMYB11. Los resultados mostraron que ZmZIM91 se une a las mismas regiones del promotor ZmCOMT en las que se hallan tanto cajas AC como GATA/C. Estos resultados permiten sugerir la existencia de un modulo regulatorio involucrado en la regulación de dicho promotor por ZmMYB11 y ZmZIM91.

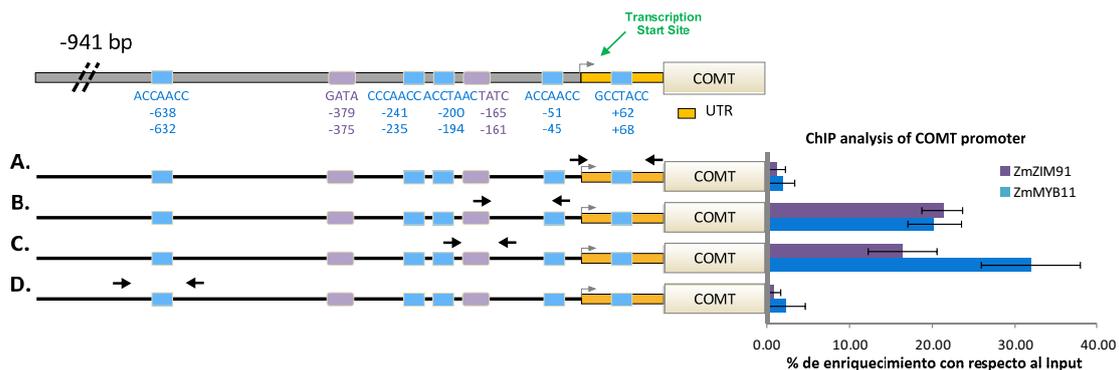


Figura 59. Análisis de ChIP qPCR de la unión de ZmMYB11 y ZmZIM91 al promotor de *ZmCOMT*.

En la parte superior se muestra el promotor de *ZmCOMT* donde se localizan los motivos AC (cajas azul claro) y GATA/TC (cajas lila claro). En la parte inferior, se encuentra el resultado de los ChIP qPCR de ZmMYB11 y ZmZIM91, donde las barras de color azul representan a ZmMYB11 y las lila a ZmZIM91. Las inmunoprecipitaciones se efectuaron empleando los anticuerpos purificados α ZmMYB11 y α ZmZIM91 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73 de 9 días.

4.3.2 ZmMYB11 y ZmZIM91 forman un heterodímero

Había sido determinado mediante experimentos de complementación bimolecular que las proteínas ZmMYB31 y ZmMYB42 podían interactuar con ZmZIM91 (Velez-Bermudez 2013). Por tanto, se busco determinar si ZmMYB11 y ZmZIM91 podían interactuar empleando (i) las técnicas de complementación bimolecular en protoplastos de maíz transformados de modo transiente, (ii) doble híbrido en levadura y (iii) de Co-Imunoprecipitación *in vivo* del complejo formado por ambas proteínas

empleando plantas de maíz. Este conjunto de resultados demostró que ambas proteínas interactúan tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 60. A, B, C).

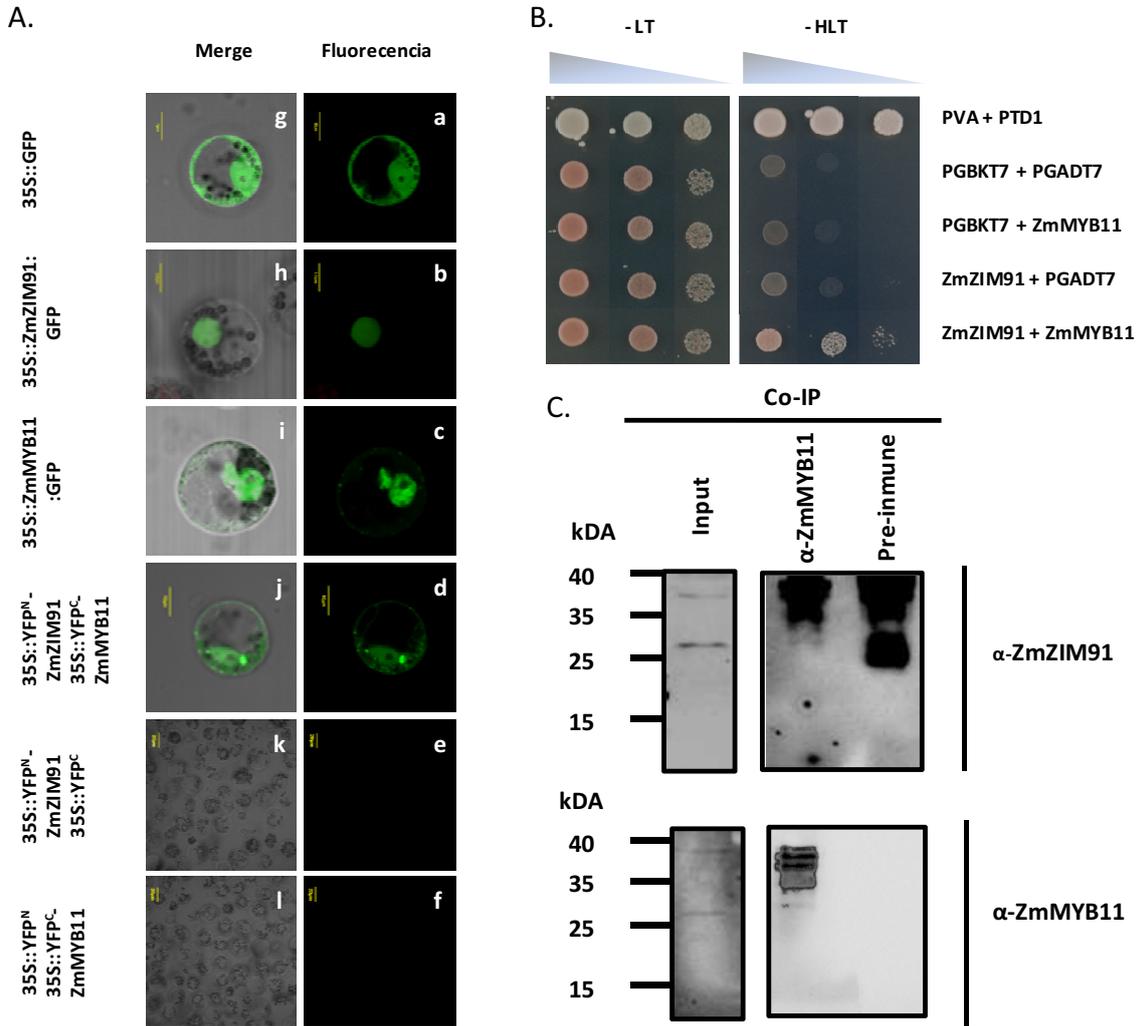


Figura 60. ZmMYB11 y ZmZIM91 pueden interactuar a nivel proteína-proteína.

A. Experimento de complementación bimolecular entre ZmMYB11 y ZmMYB11. Se muestra la interacción entre ZmZIM91 y ZmMYB11 mediante la reconstitución de la YFP. El control negativo 35S::GFP (a, g) se localiza en el núcleo y el citosol, ZmZIM91 (b, h) se localiza en el núcleo, ZmMYB11 (c, i) se localiza en el núcleo y el citosol y la interacción mediante complementación bimolecular en protoplastos de maíz entre ambos factores de transcripción se da en el núcleo y el citosol (d, j). Los controles negativos del experimento de interacción se muestran en e, k y f, l. B. Ensayo de doble híbrido en levadura. La siembra en medio -LT se realizó como control de crecimiento y se evaluó la interacción en el medio restrictivo -HLT. PVA y PTD1 son controles positivos usados en el experimento. C. Co-inmunoprecipitación *in vivo* de ZmMYB11 y ZmZIM91. Como material de partida se empleó la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de 9 días de la variedad B73. Para efectuar la inmunoprecipitación se utilizó el anticuerpo α ZmMYB11 y suero pre-inmune como control negativo. Seguidamente, se efectuó la detección de ZmZIM91 tanto en el input como en la muestra inmunoprecipitada empleando α ZmZIM91 y de igual modo de ZmMYB11 en el input y el material precipitado, demostrando que ambos factores de transcripción heterodimerizan en plantas.

4.3.3 ZmMYB11 necesita el motivo EAR para interactuar con ZmZIM91

Dado que está descrito que el motivo EAR puede actuar como un dominio de interacción proteína-proteína, se quiso establecer si cumplía un papel en la interacción entre ZmMYB11 y ZmZIM91, para lo que se efectuaron experimentos de complementación bimolecular empleando protoplastos de maíz transformados de modo transiente con ZmMYB11 (EAR-WT) o ZmMYB11 con el EAR mutado (EAR-Mutated) y ZmZIM91 (Figura 61. A y B). Los resultados del experimento muestran que el EAR es necesario para mediar la interacción entre ambas proteínas.

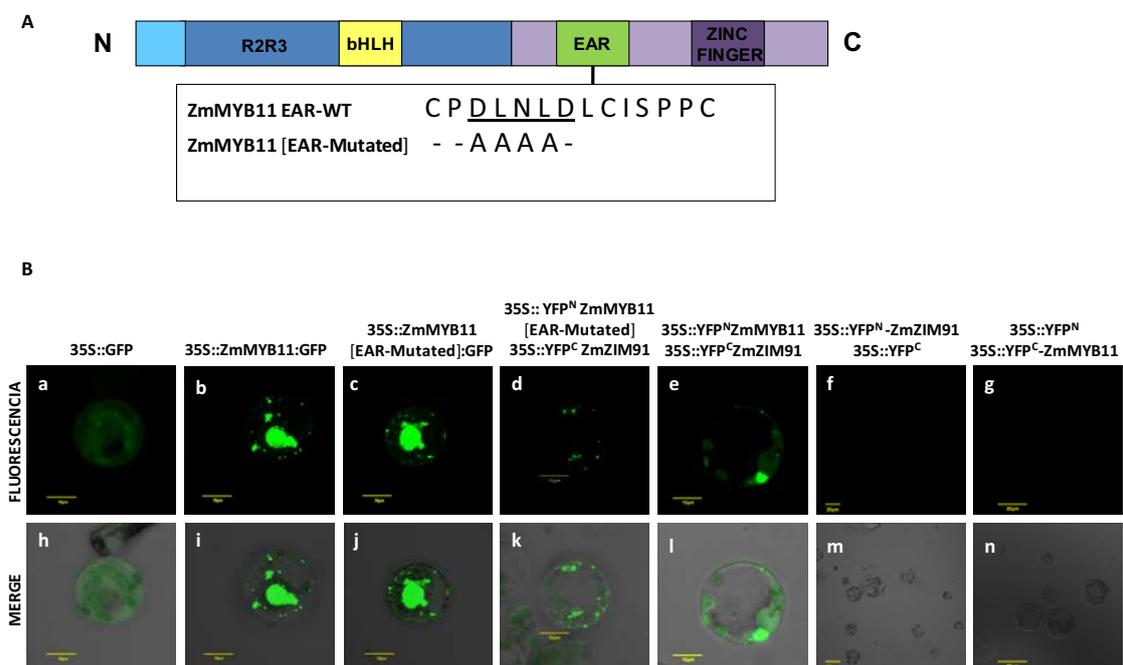


Figura 61. ZmMYB11 requiere el motivo EAR para su interacción con ZmZIM91.

En A se muestra el esquema de la proteína ZmMYB11 y la mutación en el motivo EAR entre los aminoácidos 153-156 (ZmMYB11[EAR-Mutated]). En B se presenta la imagen del experimento de complementación bimolecular en protoplastos de maíz, donde se puede observar que ZmMYB11[EAR-Mutated] no es capaz de interactuar con ZmZIM91. El control con 35S::GFP (a, h) se localiza en el núcleo y el citosol, ZmMYB11 (b,i) y ZmMYB11[EAR-Mutated] (c, j) fusionadas a la GFP se localizan en el núcleo y el citosol. Los resultados del experimento de complementación bimolecular entre ZmZIM91 y ZmMYB11 se muestran en e, l. Por otra parte, los resultados entre ZmZIM91 y ZmMYB11[EAR-Mutated] se muestran en d, k. los controles negativos son mostrados en f, m y g, n.

4.3.4 ZmMYB11 se degrada en presencia de MeJA

Considerando I. que los R2R3-MYB del subgrupo cuatro en maíz (Fornale et al 2006) se inducían por herida, II. que los genes implicados en la síntesis de los monolignoles incrementan sus niveles de expresión cuando la planta es sometida a herida mecánica

o aplicación exógena de MeJA, III. que la proteína ZmZIM91 se degrada en presencia de MeJA (Velez-Bermudez 2013) y IV. que ZmMYB11 y ZmZIM91 forman un heterodímero; se planteo la posibilidad de que ZmMYB11 también pudiera degradarse en presencia de MeJA.

En primer lugar, se llevo a cabo un experimento en el que a protoplastos de maíz que sobre-expresaban la proteína ZmMYB11 fusionada a la GFP y controlada por un promotor 35S, se les aplicó 25 μ M de MeJA y posterior al tratamiento se monitoreo su comportamiento empleando microscopia confocal (Figura 62). Los resultados muestran que de manera similar a lo que ocurre con ZmZIM91 (Velez-Bermudez 2013), ZmMYB11 se degrada en presencia de MeJA después de una hora de exposición y en cambio no se degrada cuando se realiza tratamiento con MeJA y el inhibidor de proteasoma MG132. Seguidamente, se caracterizó en plantas de maíz la respuesta en el transcurso del tiempo de ZmMYB11 a la aplicación de MeJA empleando anticuerpos específicos contra las proteínas endógenas y la técnica de *Wester blot* (Figura 63. A). Los resultados obtenidos fueron similares a los arrojados por los ensayos de expresión transiente en protoplastos, encontrándose que ZmMYB11 se degrada después de 1 hora del tratamiento con MeJA.

Adicionalmente, con el fin de conocer si los cambios en la cantidad de proteína ZmMYB11 y ZmZIM91 en presencia de MeJA aplicado exógenamente estaban asociados con su regulación a nivel transcripcional se evaluó en las mismas muestras empleadas para realizar western blot los niveles de expresión de estos dos factores de transcripción en el transcurso del tiempo. Los resultados indican que después de 1 hora de efectuada la aplicación de MeJA incrementan los niveles de expresión de *ZmMYB11* (Figura 63. B).

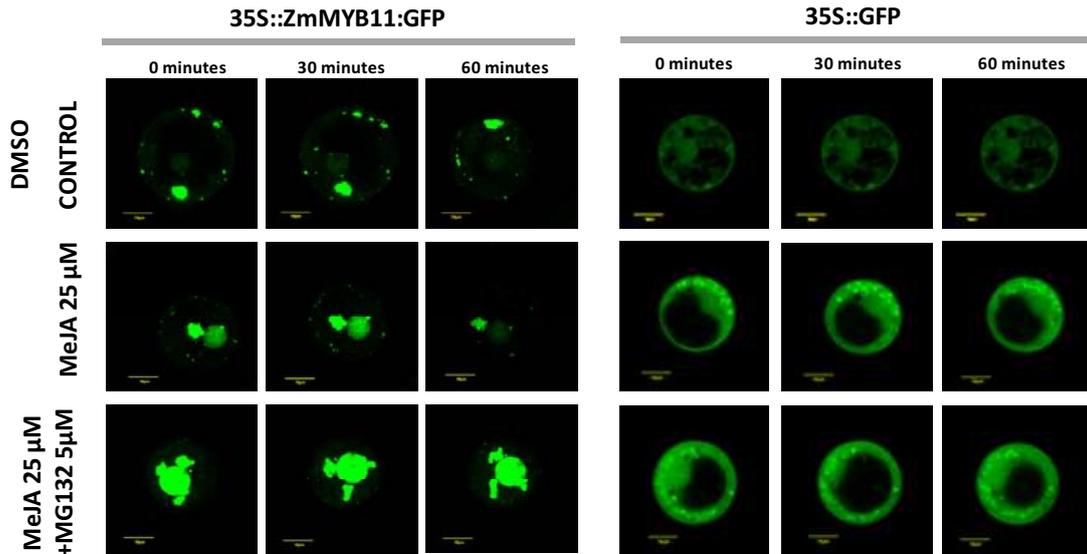


Figura 62. ZmMYB11 es degradado bajo tratamientos con MeJA en protoplastos de maíz.

ZmMYB11 fusionado a la GFP mostro un decrecimiento en la fluorescencia después de una hora de tratamientos con MeJA. Los niveles del control de GFP no fueron afectados bajo el mismo tratamiento. La adición de MG132 al sistema inhibió la degradación de ZmMYB11.

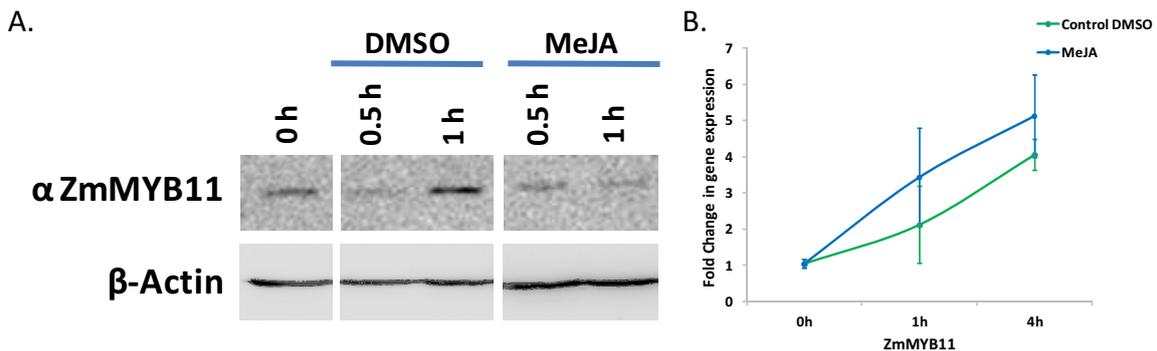


Figura 63. El MeJA modula la proteína ZmMYB11

A. Análisis de la degradación en plantas de maíz de ZmMYB11 en presencia de MeJA por *western blot*. Se empleo material aislado de la base de la hoja ligule 2 de plantas de maíz de 9 días de la variedad B73, tratadas con MeJA y DMSO como control. Se observa que la proteína ZmMYB11 se degrada después de una hora de tratamiento con MeJA. La proteína codificada por el gen Actin1 fue usado como control de carga. B. Análisis de la expresión de ZmMYB11 y ZmZIM91 en respuesta a MeJA. Se realizo un análisis cuantitativo empleando qPCR y cDNA proveniente de las mismas tres replicas biológicas independientes empleadas para realizar *western blot*. La expresión a tiempo 0 fue llevada a 1. Las barras representan el error estándar.

4.3.5 ZmMYB11 necesita el motivo EAR para ser regulado por MeJA

Con base en los resultados descritos anteriormente se planteo la hipótesis de que el motivo EAR de ZmMYB11 podría cumplir además una función en la degradación de esta proteína en presencia de MeJA, por lo cual se efectuaron experimentos transientes con y sin aplicación de MeJA en protoplastos transformados con las

proteínas ZmMYB11 (EAR-WT) y ZmMYB11 (EAR-Mutated), fusionados a la GFP y bajo la dirección del promotor 35S. En las imágenes se puede observar que la proteína ZmMYB11 (EAR-Mutated) no muestra degradación en presencia de MeJA sugiriendo que este motivo juega un papel importante en la regulación efectuada por dicha hormona (Figura 64. A). Por otra parte, teniendo en cuenta que se ha descrito que la función del motivo EAR es mediar la represión transcripcional en plantas (Kagale, S., Rozwadowski, K., 2011), se analizo el efecto que podría tener la mutación del motivo EAR en la capacidad de ZmMYB11 de reprimir la expresión de *ZmCOMT*, mediante un experimento de expresión transiente en protoplastos de maíz con *ZmCOMT* fusionado al gen reportero *Luciferasa* (Figura 64. B). Los resultados mostraron que la mutación en el EAR de ZmMYB11 no elimino la capacidad de este factor de transcripción para reprimir la expresión de *ZmCOMT*.

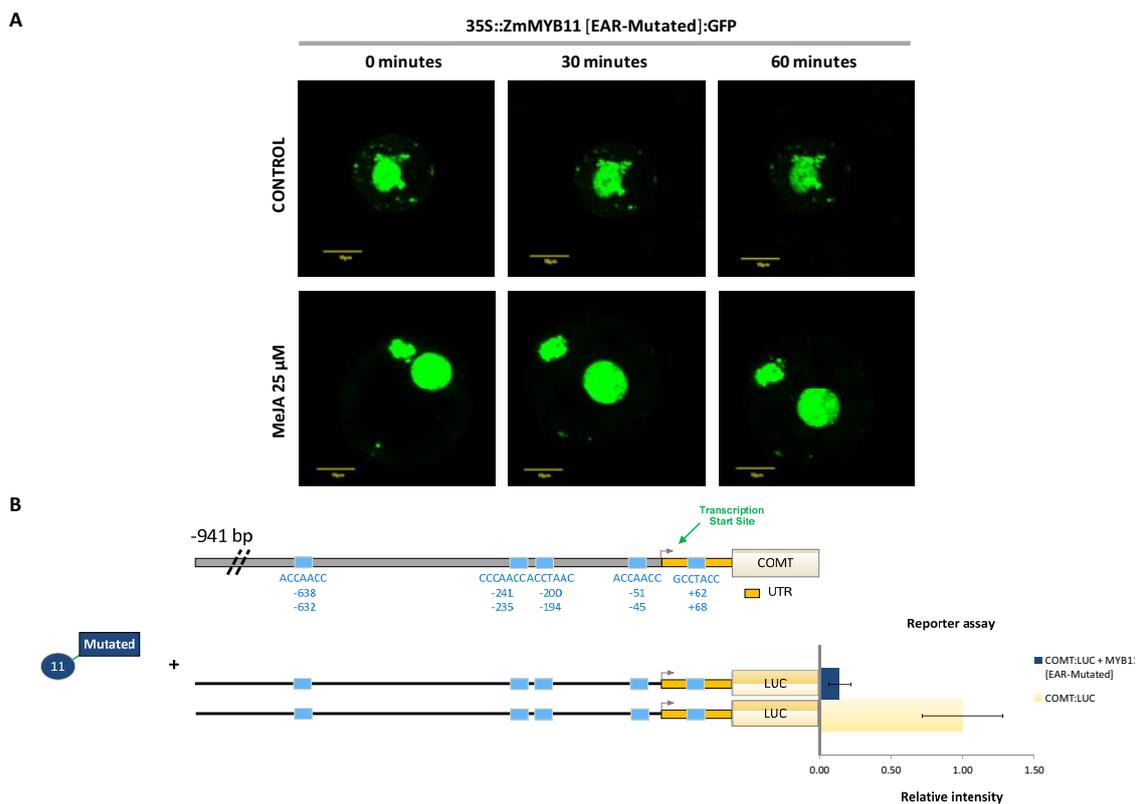


Figura 64. ZmMYB11 requiere del motivo EAR para su regulación por MeJA.

En A se presenta el ensayo de respuesta a MeJA en protoplastos de maíz sobre-expresando ZmMYB11[EAR-Mutated] fusionado a GFP. La imagen de los protoplastos tratados con 25 μM de metil jasmonato a 1 hora, muestran que ZmMYB11 mutado en el motivo EAR no pueden ser degradado a 1 hora bajo este tratamiento. En B es mostrado el experimento de represión de la expresión de *ZmCOMT* por ZmMYB11[EAR-Mutated] en protoplastos de maíz utilizando ensayos con el gen reportero *Luciferasa*, donde se evidencia que ZmMYB11[EAR-Mutated] conserva su capacidad de reprimir a dicho promotor (n=3).

4.3.6 El modulo AC-GATA/C esta conservado en el promotor del gen *ZmCOMT* de varias especies de plantas.

La conservación conjunta de elementos regulatorios en *cis* sugieren que probablemente tienen relevancia biológica y que podrían ser un mecanismo de regulación conservado, por tanto para obtener evidencias acerca de si las cajas AC y GATA/C forman un modulo regulador en *cis*, se examinó en el promotor de *ZmCOMT* de diferentes especies la presencia conjunta de las cajas ACII (Hatton et al 1995, Lois et al 1989, Raes et al 2003) y GATA/C, empleando por una parte la secuencias consenso *in vivo* de *ZmMYB11* obtenida en esta investigación con datos de ChIP y por otra, la secuencia consenso *in vitro* de *ZmZIM91* generada con un experimento de unión de proteína a un micro arreglo de ADN (*Protein-binding microarrays, PbMs*) (Vélez-Bermúdez, I.C., 2013). Los resultados indican que la presencia y distribución de los sitios de unión de *ZmMYB11* y *ZmZIM91* se encuentran principalmente conservados entre monocotiledóneas y además, que se encuentran enriquecidos en las mismas regiones (Figura 65).

Es de anotar que en *brachypodium* solo aparece enriquecido el modulo regulatorio AC-GATA/C en el gen *BdCOMT4*. Interesantemente, análisis filogénicos han mostrado que *BdCOMT4* es un ortólogo del gen *COMT* bien caracterizado en otras especies de gramíneas y estudios de expresión demostraron que su transcrito presenta un patrón de distribución amplio y diferente al de los otros miembros de la familia. Además, la caracterización bioquímica de la actividad enzimática y especificidad de sustrato mostraron que *BdCOMT4* tiene un significativo efecto sobre una amplia gama de sustratos con mayor preferencia por el ácido cafeico (Wu et al 2013).

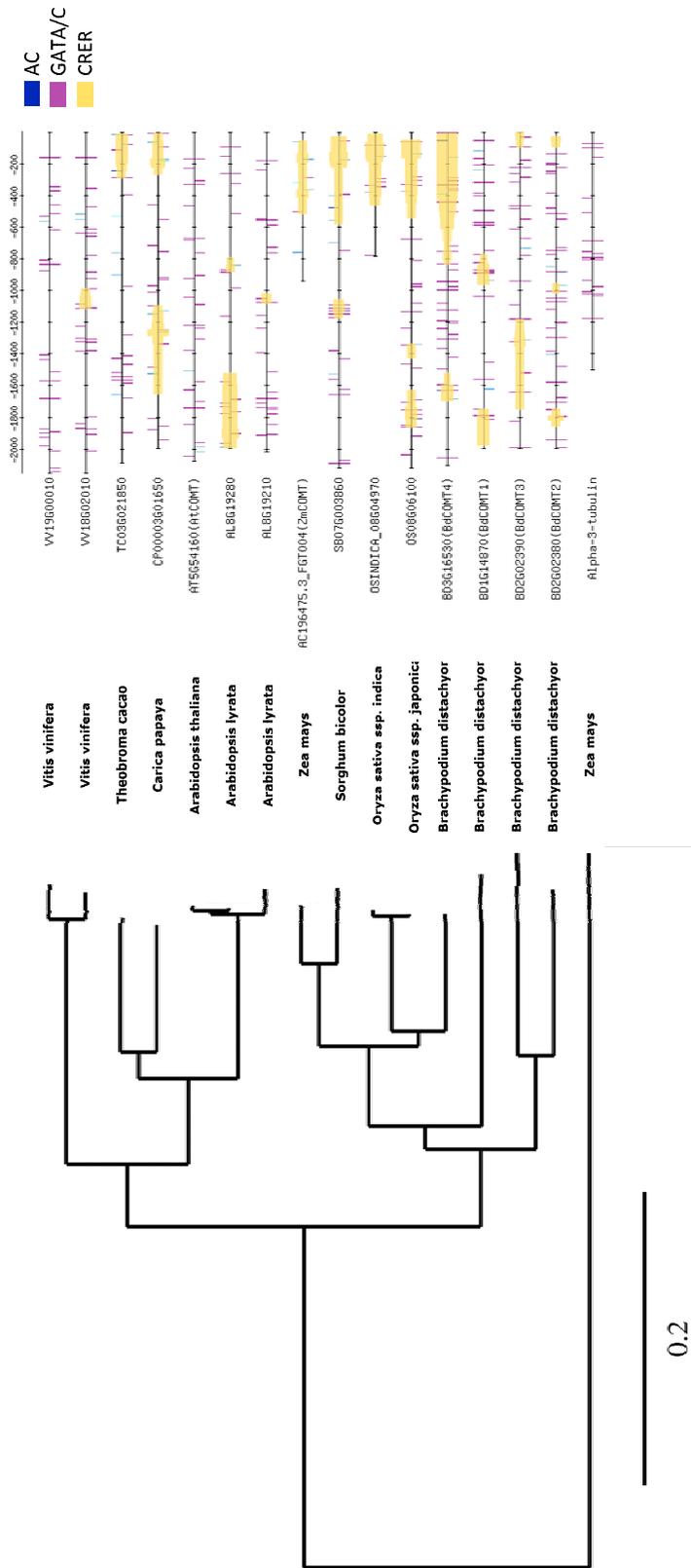


Figura 65. Visualización del modulo regulador en cis (CRM) del promotor de COMT conservado entre gramíneas. Las barras de color representan los motivos de unión a ADN AC y las lílas los motivos GATA/TC. En verde se presentan los módulos reguladores en *cis*.

4.3.7 *ZmMYB11* y *ZmZIM91* interactúan con la región que contiene las secuencias AC y GATA/C en el promotor de *ZmCOMT*

Con el fin de comprobar la hipótesis de que *ZmMYB11* y *ZmZIM91* regulan conjuntamente un CRM en el promotor de *ZmCOMT*, se empleó la técnica de serial ChIP. La inmunoprecipitación seriada permite establecer si dos factores de transcripción se unen a la misma región del promotor, al mismo tiempo y en las mismas células o exclusivamente se une uno u otro. Con el fin de caracterizar detalladamente toda la región promotora de *ZmCOMT* se empleó Nano ChIP qPCR y sondas ubicadas sobre todas las cajas AC y GATA/C. Se efectuó una primera inmunoprecipitación con α *ZmMYB11* y α *ZmZIM91* y seguidamente, una segunda inmunoprecipitación con α *ZmZIM91*. Se puede observar que la región donde están presentes conjuntamente cajas AC y GATA/C se encuentran enriquecidas tanto el ChIP efectuado dos veces con α *ZIM91* como en el ChIP realizado con α *ZIM91* a partir de ChIP de α *ZmMYB11* (Figura 66 A, B y C). Los resultados indican que ambos factores de transcripción interactúan *in vivo* en las mismas células y en el mismo periodo de tiempo con la zona enriquecida en el modulo AC-GATA/C en el promotor de *ZmCOMT*.

A continuación con el propósito de establecer el porcentaje de co-ocupación en el promotor de *ZmCOMT* de *ZmMYB11* y *ZmZIM91*, se evaluaron mediante qPCR convencional empleando cebadores que amplifican la zona denominada como C en el promotor de *ZmCOMT* (COMT1C), inmunoprecipitaciones seriadas de ChIP realizadas con α *ZmMYB11* y α *ZmZIM91* a partir tanto ChIP generado con α *ZmMYB11* como con α *ZmZIM91*. Seguidamente, se evaluó la co-ocupación usando el ratio: $[C:ZIM91/MYB11]/[D:ZIM91/ZIM91] / [A:(MYB11/MYB11)]/[B:MYB11/ZmZIM91]$ y los datos de % de enriquecimiento en relación al input. Un resultado igual a 1 mostraría una perfecta co-ocupación y un valor cercano a 0 la exclusión de la co-ocupación de ambas proteínas. Los resultados de las replicas biológicas R1 y R2 muestran una mayor ocupación del promotor por parte de *ZmZIM91* que de *ZmMYB11*. (Figura 67. A, B y C).

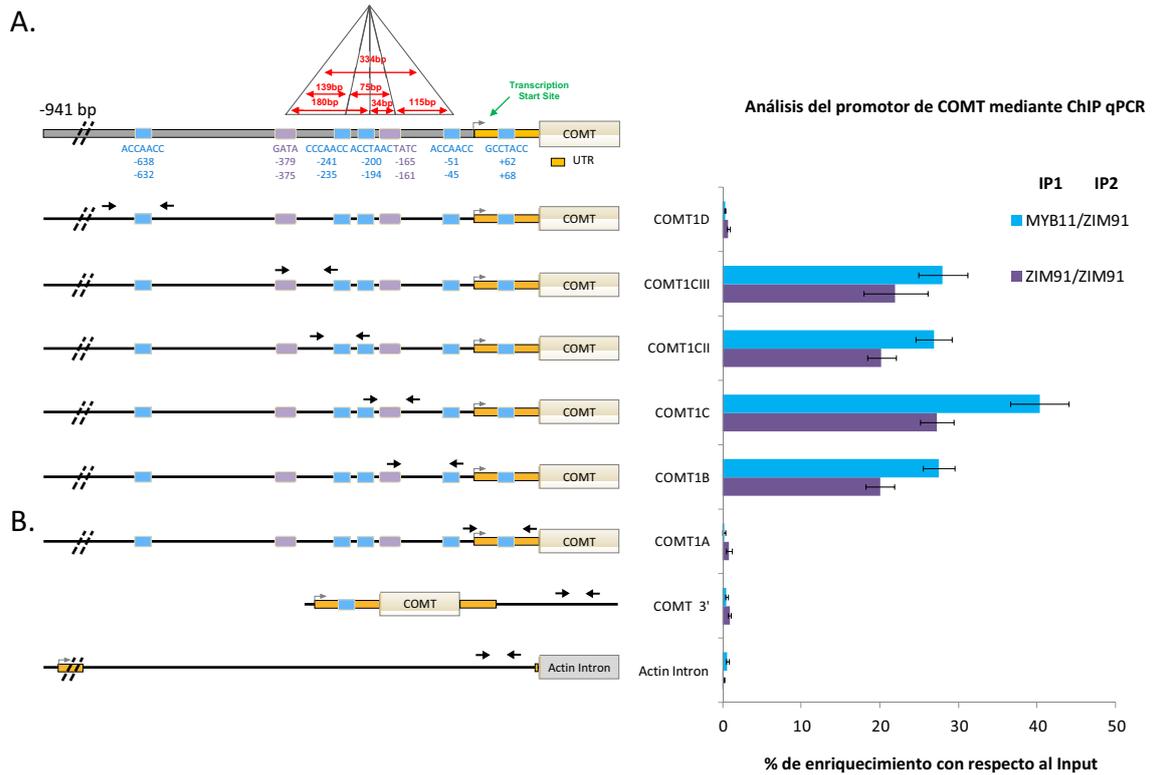


Figura 66. ZmZIM91 y ZmMYB11 interactúan con la región que contiene las secuencias AC y GATA/C en el promotor de *ZmCOMT*.

En A se muestra una representación esquemática del promotor de *ZmCOMT* donde se indican los sitios de unión del modulo regulador en cis AC-GATA/C. En B se enseñan los resultados en % de enriquecimiento con respecto al Input de una inmunoprecipitación secuencial (Serial ChIP o Re-ChIP) en la que primero se efectuaron inmunoprecipitaciones empleando anticuerpos contra las proteína endógenas ZmMYB11 y ZmZIM91 y a continuación una re-inmunoprecipitación utilizando α ZmZIM91. Con flechas se representa la posición en la que se ubican las zonas amplificadas. Se evaluaron mediante ChIP Nano qPCR las zonas del promotor en las que se encuentran presentes cajas AC o GATA/C y como control negativo una región ubicada en el primer Intrón del gen *Actin* y la región 3' del gen *ZmCOMT*. Las inmunoprecipitaciones se efectuaron empleando el anticuerpo purificado α ZmMYB11 y α ZmZIM91 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73 de 9 días. En la parte inferior se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). Los datos corresponde a tres replicas biológicas con tres replicas técnicas cada uno.

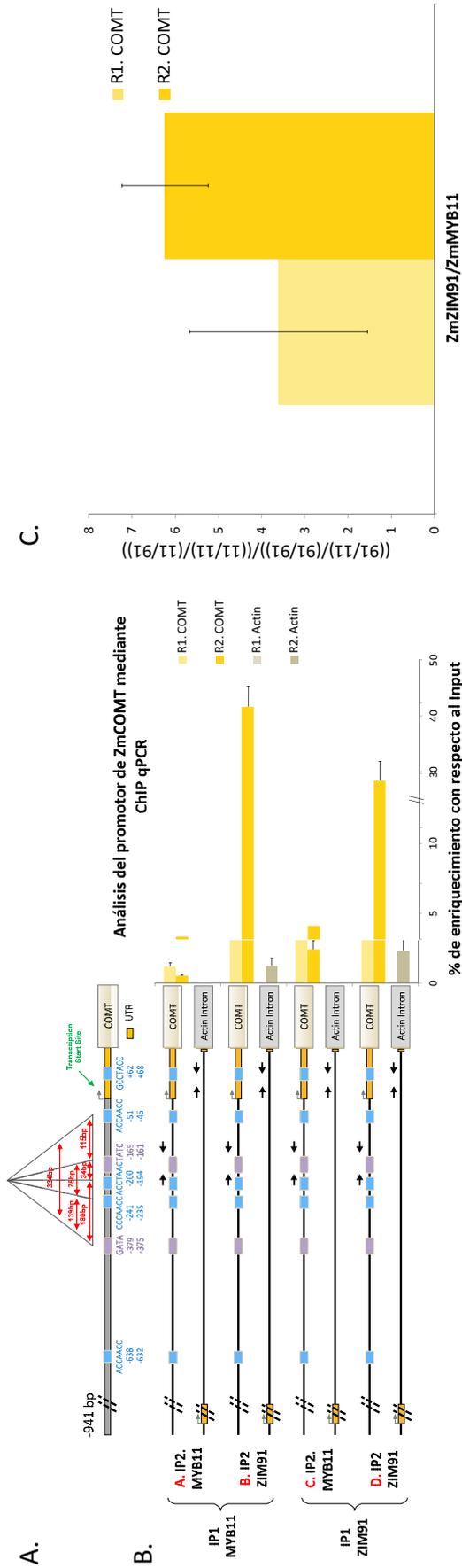


Figura 67. *ZmZIM91* y *ZmMYB11* co-ocupan un modulo regulador en el promotor de *ZmCOMT*.

En A se muestra una representación esquemática del promotor de *ZmCOMT* donde se indican los sitios de unión del modulo regulador en cis AC-GATA/C. En B se enseñan los resultados en % de enriquecimiento con respecto al Input de una inmunoprecipitación secuencial (Serial ChIP o Re-ChIP) en la que primero se efectuó una inmunoprecipitación empleando anticuerpos contra la proteína endógena *ZmMYB11* y seguidamente, se realizaron inmunoprecipitaciones utilizando nuevamente el anticuerpo α *ZmMYB11* y también α *ZmZIM91*. Este mismo procedimiento se llevo a cabo con α *ZmZIM91*. Se evaluó mediante ChIP qPCR convencional una región enriquecida en el modulo AC-GATA/C y como control negativo una región ubicada en el primer Intrón del gen *Actin*. Con flechas se representa la posición en la que se ubican las zonas amplificadas. En C se muestra el análisis de co-ocupancia del promotor de *ZmCOMT* por parte de las proteínas *ZmZIM91* y *ZmMYB11*. En los ratios de 3 réplicas biológicas (*ZmZIM91/ZmMYB11/ZmZIM91*) / (*ZmMYB11/ZmMYB11/ZmZIM91*), se observa que en las réplicas 1 y 2 (R1 y R2) hay una mayor ocupación de *ZmZIM91* en el promotor de *ZmCOMT* que de *ZmMYB11*, mientras en la réplica 3 (R3) no se observa una co-ocupación de *ZmZIM91* y *ZmMYB11*. Las inmunoprecipitaciones se efectuaron empleando los anticuerpos purificados α *ZmMYB11* y α *ZmZIM91* y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73 de 9 días.

4.3.8 El heterodimero ZmMYB11 y ZmZIM91 reprime la expresión dirigida por el promotor *ZmCOMT*

Dado que *in vivo* ambos factores de transcripción interactúan con la misma región de *ZmCOMT* y considerando que se conocía que ambas proteínas podían reprimir la expresión dirigida por el promotor *ZmCOMT* en ensayos con gen reportero, se quiso conocer el probable papel conjunto de las proteínas ZmMYB11 and ZmZIM91 en la regulación del módulo AC - GATA/C. Con este propósito se efectuaron experimentos de transformación transitoria de protoplastos de maíz en los que se efectuó una transfección por una parte con el promotor de *ZmCOMT* tanto nativo como mutado en todas las cajas AC y GATA/C, unido al gen reportero *Luciferasa* y por otra, con *ZmMYB11*, *ZmMYB11* [EAR-mutated] y *ZmZIM91*, dirigidos por un promotor 35S. Estos últimos se transformaron tanto solos como en combinación (Figura 68).

Los resultados indicaron que ZmMYB11 presenta una mayor capacidad de reprimir que ZmZIM91 y ZmMYB11 [EAR-mutated], pero los tres presentaron un efecto negativo en los niveles de expresión del gen reportero. Sin embargo, la represión más fuerte del gen reportero se presentó cuando se transformaron los protoplastos conjuntamente con *ZmZIM91* y *ZmMYB11* como efectores y por el contrario, no se observó una represión significativa en la transformación con ZmZIM91 y ZmMYB11 [EAR-mutated]. En el promotor de *ZmCOMT* en el que se habían mutado todas las cajas AC y GATA/C no se observaron cambios en la actividad del gen reportero al co-transformar con *ZmMYB11*, *ZmMYB11* [EAR-mutated] y *ZmZIM91*, lo cual indica que la regulación efectuada por estos es dependiente de su interacción con las cajas AC y GATA/C.

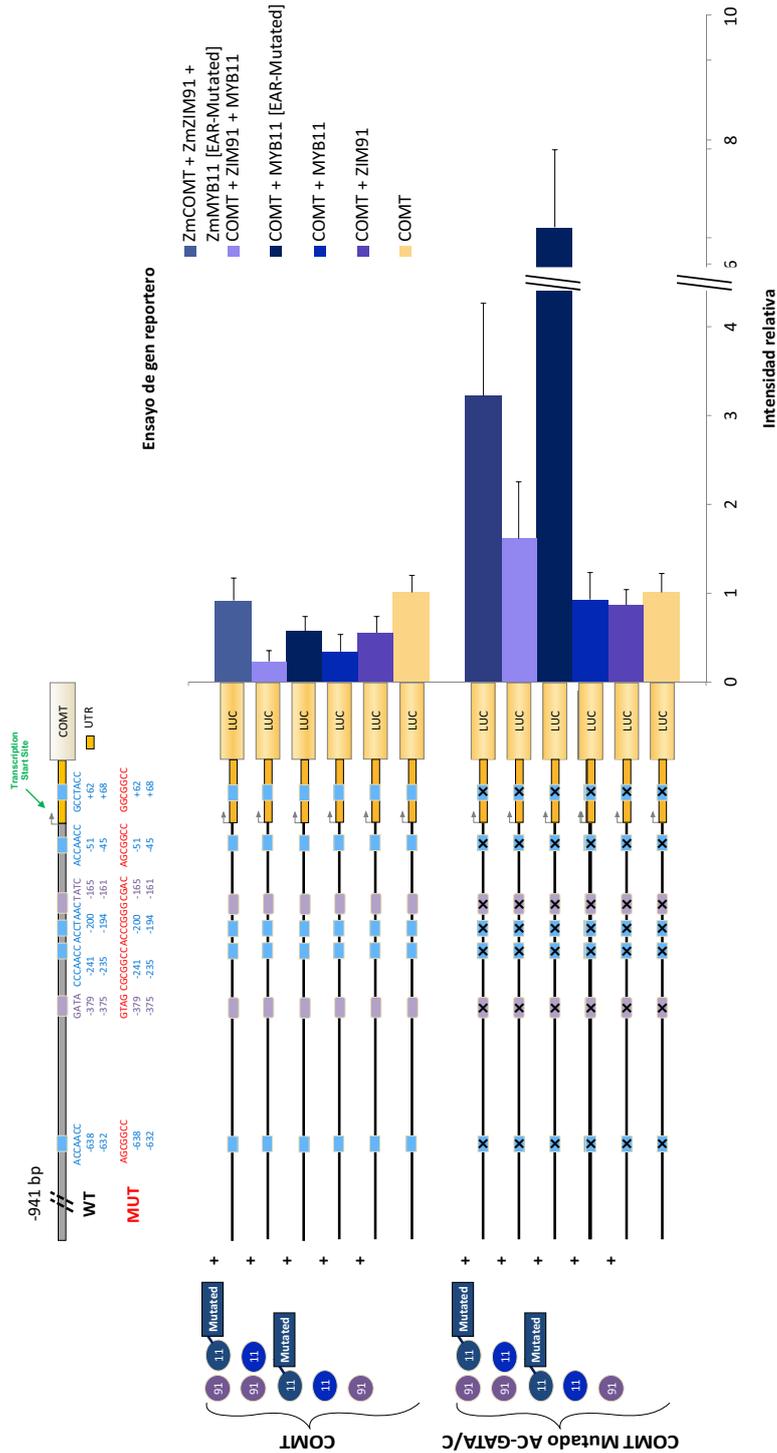


Figura 68. ZmMYB11 y ZmZIM91 reprimen fuertemente la expresión de *ZmCOMT* en experimentos de expresión transiente en protoplastos de maíz. Se realizaron ensayos de expresión transiente usando protoplastos de maíz transfectedos por una parte con construcciones reporteras en la que el promotor de *ZmCOMT* WT y mutado, fueron fusionados al gen *Firefly luciferase* (*ZmCOMT::Luc*) y por otra, con las construcciones efectoras 35S::MYB11:GFP, 35S::MYB11[EAR-mutated]:GFP, 35S::ZmZIM91:GFP y 35S::GFP (Control) solas y en combinación. Adicionalmente, en todas las transfecciones se incluyó el vector 35S::Renilla. Los datos fueron normalizados empleando la actividad Renilla. El cambio en la activación fue calculado como el ratio entre el tratamiento con las construcciones efectoras y el tratamiento con el vector efector vacío. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción del gen. Las barras de error representan el error estándar de tres replicas biológicas independientes con tres replicas técnicas.

4.3.9 El Metil Jasmonato induce la expresión de *ZmCOMT* y reduce la capacidad de *ZmMYB11* y *ZmZIM91* de unirse a su promotor

Una vez establecido que *ZmMYB11* y *ZmZIM91* son regulados por MeJA a nivel de proteína y que a su vez, estos TFs regulan un CRM en el promotor de *ZmCOMT* y considerando que había sido descrito que la expresión del promotor de *ZmCOMT* es inducida por herida (Capellades et al 1996) el cual es un estímulo en cuya respuesta está involucrado el Ácido Jasmónico, se quiso conocer más acerca de la función biológica de esta interacción y el probable mecanismo molecular del cual hacen parte. Para obtener más información al respecto se efectuaron tratamientos con MeJA a plantas de maíz de 9 días y se analizó la expresión de *ZmCOMT*. Los resultados muestran que este gen es fuertemente inducido por la aplicación exógena de MeJA a 1 hora (Figura 69. A). Seguidamente, se quiso demostrar que *ZmMYB11* y *ZmZIM91* podían regular los niveles endógenos de *ZmCOMT*, para lo cual se analizaron los niveles de expresión de dicho gen en protoplastos de maíz transformados de modo transiente con estos factores de transcripción dirigidos por el promotor 35S y con el vector vacío como control. Los resultados muestran que la sobre-expresión de *ZmMYB11* y *ZmZIM91* reprime la expresión de *ZmCOMT* (Figura 69. B).

Después de determinar que los niveles de expresión de *ZmCOMT* aumentan después de una hora de aplicación de MeJA y conociendo que *ZmMYB11* y *ZmZIM91* se degradan en presencia de MeJA aplicado exógenamente y que estos TFs reprimen la expresión de *ZmCOMT* tanto de modo individual como conjunto, se quiso conocer si el MeJA podía influir en la capacidad de estos dos factores de transcripción para interactuar *in vivo* con el promotor *ZmCOMT*, para lo cual se realizó ChIP empleando plantas de maíz de la variedad B73 de 9 días tratadas con MeJA y con DMSO como control. Las muestras tratadas con MeJA presentaron un menor enriquecimiento que las muestras control (Figura 69. C).

4.3.10 El modulo AC-GATA/C se encuentra enriquecido en la región 5' de genes de la ruta de la síntesis de lignina

Para establecer si el modulo regulador AC-GATA/C podría ser un mecanismo de regulación relevante dentro de la ruta de la síntesis de lignina se procedió a analizar informáticamente si la región 5' de genes pertenecientes a esta vía estaban enriquecidos en dichas cajas. Los resultados generados muestran que hay zonas adyacentes a estos genes que muestran la presencia conjunta de cajas AC y GATA/C a una densidad tal, que pueden ser consideradas como áreas enriquecidas en este modulo regulador (Figura 70).

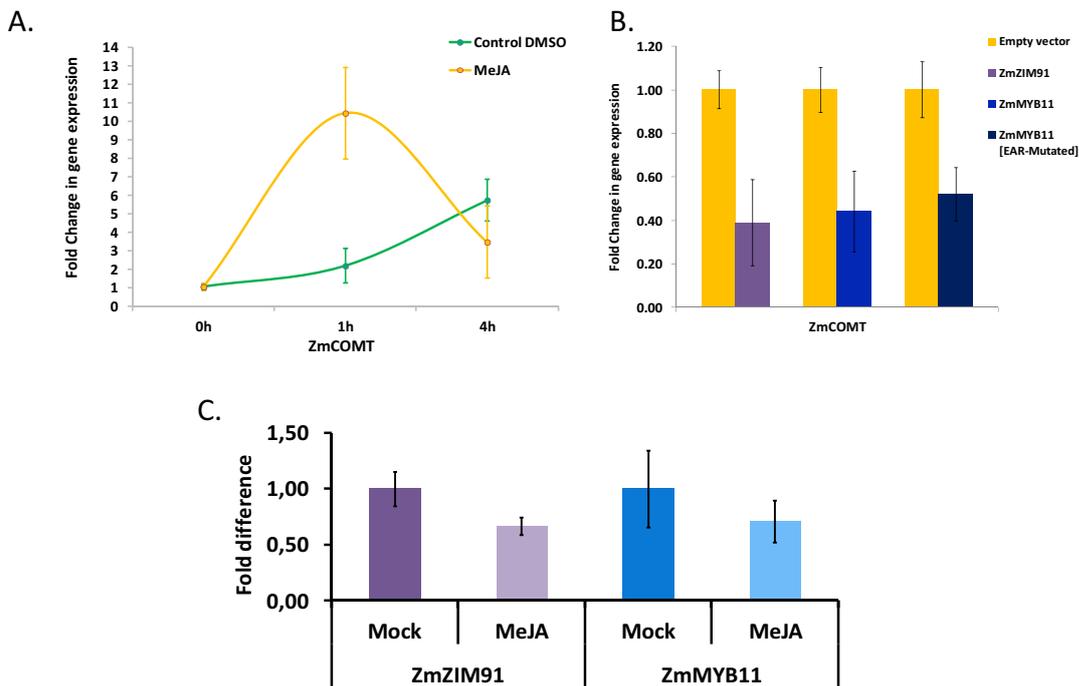


Figura 69. El MeJA modula la expresión de *ZmCOMT* y la capacidad de unión a ADN de sus represores *ZmZIM91* y *ZmMYB11*.

A. *ZmCOMT* es inducido por MeJA. Se efectuó un análisis cuantitativo empleando qPCR a cDNA de tres replicas biológicas independientes de material aislado de la base de la hoja ligule 2 de plantas de maíz de 9 días de la variedad B73, tratadas con MeJA y con DMSO como control, durante 1 y 4 horas. La expresión a tiempo 0 fue llevada a 1. Las barras representan el error estándar. B. La sobre-expresión de *ZmZIM91*, *ZmMYB11* y *ZmMYB11*[EAR-Mutated], reprime la expresión de *ZmCOMT*. Se efectuó un análisis cuantitativo empleando qPCR a cDNA de tres replicas biológicas independientes de protoplastos transformados transitoriamente con 35S::ZIM91:GFP, 35S::MYB11:GFP y 35S::MYB11[EAR-Mutated]:GFP y el vector vacío como control (Empty vector). El nivel de expresión del vector vacío fue llevado a 1 y empleado para normalizar los datos. Las barras representan el error estándar. C. La aplicación exógena de MeJA reduce *in vivo* la capacidad de unión a ADN de *ZmZIM91* y *ZmMYB11*. La diferencia en el enriquecimiento entre los grupos tratado y control (Fold difference), se calculo dividiendo el enriquecimiento en el ChIP del grupo tratado por el enriquecimiento en el ChIP del grupo control, con relación a la diana *ZmCOMT*. Las inmunoprecipitaciones se efectuaron empleando el anticuerpo purificado α *ZmMYB11* y α *ZmZIM91* y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73 de 9 días. A las plantas control se les aplico DMSO y a las tratadas MeJA y se recogieron las muestras después de 1 hora. Ambos grupos Los datos corresponde a dos replicas biológicas con tres replicas técnicas. Las barras representan el erro estándar.

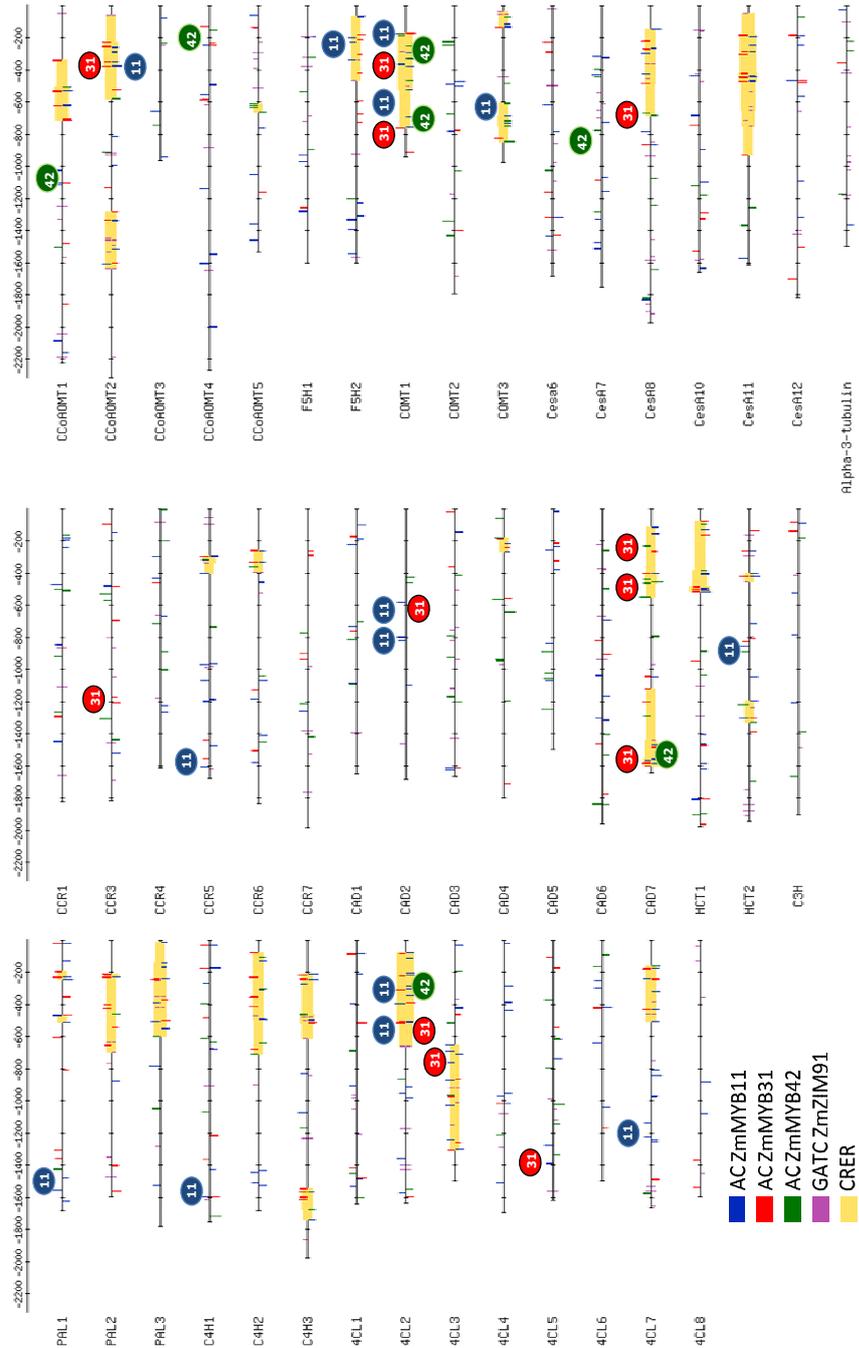


Figura 70. Enriquecimiento del modulo AC-GATA/C en la región 5' de genes de la ruta de la síntesis de lignina.

Con líneas azul, rojo, verde y morado, se representan los putativos sitios de unión identificados en los diferentes promotores de la ruta de la lignina de ZmMYB11, ZmMYB31, ZmMYB42 y ZmZIM91, respectivamente. En color amarillo se representan las CRER (Regiones enriquecidas en elementos reguladores en cis), los cuales son considerados como probables módulos reguladores en cis. El análisis se efectuó empleando el programa matrix-scan (Turatsinze JV, 2008). Los círculos azul, rojo y verde, representan los sitios de unión a ADN identificados por ChIP qPCR de ZmMYB11, ZmMYB31 y ZmMYB42, respectivamente.

4.4 Discusión de resultados

La regulación de la producción de pared celular secundaria es fundamental para la planta, ya que a su vez, esta se encuentra involucrada en procesos de desarrollo y en la respuesta a estreses de origen ambiental, como el daño mecánico. Diferentes estudios genéticos y moleculares han mostrado una relación entre la herida, el Ácido Jasmónico y la inducción de genes de la ruta de la síntesis de lignina, sin embargo los mecanismos que intervienen en esta regulación permanecen en gran medida desconocidos. En este trabajo se demostró que los factores de transcripción *ZmMYB11* y *ZmZIM91* podían interactuar entre ellos y que además se unían *in vivo* al promotor de *ZmCOMT* para reprimir su expresión. También se determinó que las proteínas *ZmMYB11* y *ZmZIM92* se degradan bajo tratamiento con MeJA. La degradación de estos dos represores transcripcionales y el aumento de los niveles de *ZmCOMT*, permite sugerir un probable mecanismo a través del cual, la herida al generar un aumento de la concentración de MeJA, induce la expresión de genes de la vía de la síntesis de lignina.

En los niveles de expresión en respuesta a MeJA de *ZmCOMT* se observa una fuerte inducción, mientras que en *ZmMYB11* no se presenta un incremento en la transcripción tan elevado y en *ZmZIM91* no se detectan cambios significativos. Entre *ZmMYB11* y *ZmCOMT* se observa un probable patrón de co-regulación, lo cual es contrario a la anti-correlación en los niveles de expresión que se podría esperar entre un factor de transcripción que actúan como represores y sus dianas. Sin embargo, dado que los principales cambios asociados con la aplicación de MeJA ocurridos en *ZmMYB11* y *ZmZIM91* ocurren a nivel de proteína, es esperable que no estén asociados directamente los patrones de expresión de estos factores de transcripción con sus dianas en presencia de la hormona. Es de resaltar que al no estar alterados negativamente los niveles de expresión de *ZmMYB11* y *ZmZIM91* en respuesta a la exposición a MeJA se refuerza la hipótesis de que esta hormona modula la cantidad de dichas proteínas mediante su degradación y no generando una represión a nivel transcripcional de las mismos.

Es necesario considerar también que los resultados preliminares de la secuenciación masiva de *ZmMYB11* mostraron que esta proteína se unía a la secuencia que codifica para sí misma, por lo que probablemente que se auto regule, explicando porque sus niveles de transcripción muestran un comportamiento similar al de su diana. Asimismo, se analizo el papel que podrían tener los *R2R3-MYB* *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42* en la regulación de *ZmMYB91* ya que se identificaron cajas AC en la región 5' de dicho gen, encontrando que era una diana de *ZmMYB31* (datos no mostrados). Estos resultados permiten plantear la posibilidad de que exista un mecanismo de retroalimentación negativa del modulo regulatorio AC-GATA/C.

Por otra parte, el hecho de que *ZmMYB11* con el motivo EAR mutado no pueda interactuar con *ZmZIM91* indica que es a través de este motivo que se da la interacción entre ambas proteínas. Lo anterior explicaría que tanto *ZmMYB11*, como *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, puedan interactúan con *ZmZIM91*, ya que este motivo esta conservado entre los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro. De igual modo, *ZmMYB11* con el motivo EAR mutado no presentó degradación en presencia de MeJA mostrando que dicho dominio tienen un papel en su respuesta a MeJA. Estos resultados permiten plantear la hipótesis de que probablemente sea a través de la interacción con *ZmZIM91* que se dé la degradación de *ZmMYB11*, a través de un mecanismo que puede estar relacionado directa o indirectamente con COI1. Sin embargo, los mecanismos que median en la degradación de *ZmMYB11* y *ZmZIM91*, permanecen aún desconocidos, por lo que sería de gran interés realizar estudios al respecto en el futuro.

Es de anotar que la mutación del motivo EAR no eliminó la capacidad de *ZmMYB11* de reprimir la expresión del gen *ZmCOMT*, pese a que este motivo ha sido descrito ampliamente en la bibliografía como un dominio represor. Sin embargo resultados similares fueron obtenidos en una investigación sobre *ZmMYB31*, puesto que al mutar el motivo EAR esta proteína no perdió la capacidad de reprimir a *ZmCOMT* (Xu et al 2010) y en la caracterización efectuada de *AtMYB4* la delección del motivo EAR disminuyó su capacidad para reprimir, pero no la eliminó por completo (Jin et al 2000). Esto probablemente puede deberse a que los *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro al unirse

físicamente a las cajas AC, impiden que otros genes MYB que actúan como activadores transcripcionales se unan, teniendo un efecto negativo en la expresión.

La presencia conjunta de cajas AC y GATA/TC en regiones delimitadas en el promotor de *COMT* de varias especies de plantas muestra que probablemente es un mecanismo conservado de regulación en especial en las gramíneas. Asimismo, la presencia de regiones enriquecidas en varios genes de la ruta de la síntesis de lignina sugiere que podría ser un sistema de regulación importante de la vía. Cabe anotar que de las 11 dianas identificadas para *ZmMYB11* en la ruta de la síntesis de lignina, 7 se encuentran enriquecidas en el modulo regulador AC-GATA/TC de acuerdo a los análisis *in silico*. Dichas dianas son adyacentes a los genes *ZmPAL1*, *Zm4CL2*, *Zm4CL7*, *ZmHCT2*, *ZmCCoAOMT* y *ZmCOMT3*, además de *ZmCOMT1*.

De igual modo, gran parte de las diana de *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, están enriquecidas en el modulo regulatorio AC-GATA/TC, esto podría indicar que existe un modulo regulador no solo entre *ZmMYB11* y *ZmZIM91*, sino también entre *ZmZIM91* y otros miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro. Además, los resultados obtenidos de complementación bimolecular muestran que *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, también interactúan con *ZmZIM91*. Por tanto, sería de especial interés analizar *in vivo* si *ZmZIM91* se une a las mismas zonas que *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, para establecer la relevancia biológica que tiene la interacción de este gen con los tres *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro en la regulación de la ruta de la síntesis de lignina.

En síntesis los resultados moleculares obtenidos indican que la interacción entre *ZmMYB11* y *ZmZIM91* y de estos con el modulo regulatorio AC-GATA/TC juega un papel importante en la regulación por herida del gen *ZmCOMT* y probablemente de algunos otros genes de la ruta de la síntesis de lignina. Con base en estos datos se propone un modelo de regulación en el que en ausencia de MeJA, *ZmMYB11* y *ZmZIM91* reprimen la expresión de *ZmCOMT* y bajo tratamiento con MeJA estas proteínas se degradan y aumentan los niveles de expresión de *ZmCOMT* (Figura 72).

Los resultados obtenidos en la caracterización del módulo AC-GATA/C indican que *ZmMYB11*, junto con *ZmZIM91*, tiene un papel relevante en respuesta de la planta a la herida y el aumento en las concentraciones de MeJA. Por tanto, se propone que *ZmMYB11* y *ZmZIM91* estarían involucrados el control de la lignificación mediada por Ácido Jasmónico.

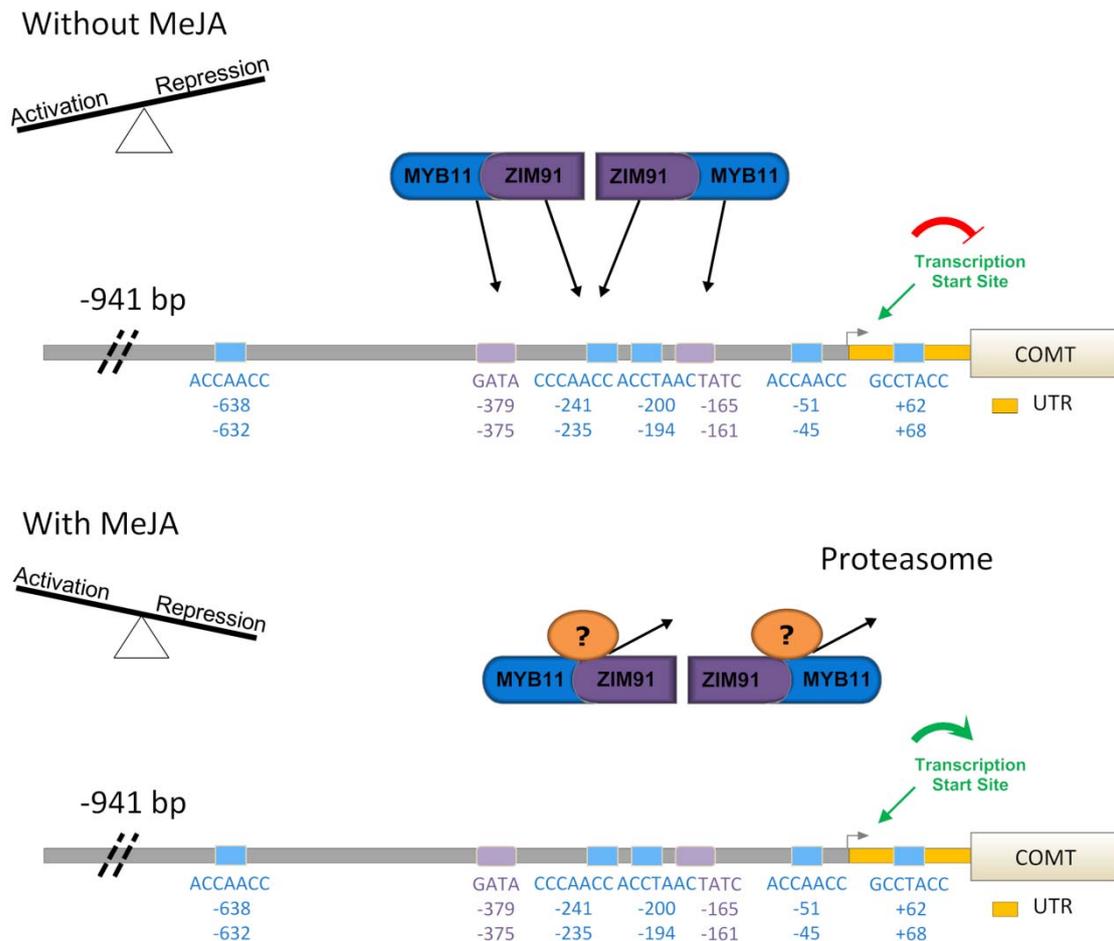


Figura 72. Modelo propuesto de la regulación de *ZmCOMT* por MeJA.

En la figura de la parte superior, se muestra que en ausencia de MeJA, *ZmZIM91* y *ZmMYB11* se unen al promotor de *ZmCOMT* a través de los motivos GATA/TC y AC respectivamente, que conforman el CRM para reprimirlo. En la figura de la parte inferior, se enseña el modelo cuando los niveles de MeJA incrementan, donde *ZmZIM91* y *ZmMYB11* son degradados a través del proteasoma 26S y por tanto la expresión de *ZmCOMT* es activada.

5. Conclusiones generales

- La serie de deleciones efectuadas a la región 5' de los genes *BRL3* y *BRL1*, permitieron determinar las regiones reguladoras involucradas en la expresión específica de estos genes en los tejidos vasculares y en el nicho de células madre de *Arabidopsis*. Específicamente se han identificado en este estudio elementos reguladores en cis que son necesarios para dirigir la expresión a tipos celulares específicos en el meristemo apical del tallo y el centro quiescente (QC) en el meristemo de la raíz entre -1719 bp y -1098 bp, el área donde emergen las raíces laterales entre -1098 bp y -755 bp, dos filas de células del protofloema en el meristemo de la raíz entre -755 bp y -498 bp y a los cotiledones en las venas y la punta entre -498 bp y -384 bp. Estas dos últimas regiones se encuentran localizadas parcialmente en la región 5' flanqueante no traducida (5' UTR), lo cual apunta a la presencia elementos reguladores relevantes en dicha zona.
- El patrón de expresión dirigido por ProBRL3 es modulado por la concentración de BL. La línea -1719::GUS al ser expuesta a bajas concentraciones de BL (0.004 nM) de forma continua presenta un incremento de la actividad del gen reportero en las dos filas de células del protofloema y la estela y por el contrario, a concentraciones mayores de BL (4 nM) aplicadas de forma continua o por 48 horas muestra una disminución de la actividad en las dos filas de células del protofloema y un aumento de ésta en la estela. La aplicación exógena de BL en plantas transgénicas con las deleciones -1098 bp y -755 bp genero una reducción de la expresión en las dos filas de células del protofloema y ningún nuevo dominio de expresión.
- Los resultados de los análisis genéticos, así como los estudios *in vivo* de interacción proteína-DNA y de transactivación en protoplastos de *Arabidopsis*, demuestran que el gen regulado por Brassinosteroides (BRs), BES1 regula la expresión de BRL3 mediante su unión a la caja BRRE existente en -1441 bp con relación al sitio de inicio de traducción. Mediante la inducción ubicua de Bes1-D o la aplicación exógena de BL a 4 nM, se reprime la expresión de BRL3 en el protofloema y se promueve en la estela, por el contrario la expresión constitutiva de BES1 (*bes1-D*) o

el tratamiento con BL 0.004 nM continuo incrementan la expresión de BRL3 en el protofloema y hacia el QC. Esto desvela un nuevo mecanismo de regulación a dos niveles: Por una parte, la cantidad de mRNA es reprimida para modular la señal mediada por el receptor BRL3 en su dominio de acción y por otra, es promovida en otros dominios de expresión por los BRs vía BES1.

- Los resultados de la comparación de la regulación de la transcripción BRL1 y BRL3 apunta a funciones separadas de los dos receptores en los tejidos vasculares y en su respuesta mediada por BRs en la planta.
- La caracterización de *ZmMYB11* permitió establecer que este factor de transcripción al igual que *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, actúa como un regulador negativo de *ZmCOMT*.
- El cistoma construido para *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42* muestra que tienen un amplio perfil de unión a ADN en la ruta de la síntesis de lignina presentando dianas tanto comunes como específicas, lo cual sugiere que cumplen papeles redundantes en la regulación de la vía, pero que también es probable que cada uno de ellos haga parte de un mecanismo de modulación de la producción de los diferentes monolignoles.
- Los resultados de interacción proteína-ADN *in vivo* de *ZmMYB11*, *ZmMYB31* y *ZmMYB42*, indican que poseen una mayor afinidad por las secuencias AC/ACA/TACC/T, AC/ACA/TACC/T y AC/GCA/CACC/G, respectivamente, las cuales son similares a las típicas cajas ACII.
- La caracterización de la respuesta a MeJA de la proteína *ZmMYB11* permitió establecer que su cantidad se reduce significativamente después de una hora de exposición a la hormona.
- Los resultados de la caracterización *in vivo* de la capacidad de unión al promotor de *ZmCOMT* de *ZmMYB11* y *ZmZIM91* que es un miembro de la familia TIFY que ha

sido involucrada en respuestas a diversas hormonas como JA y ABA, permitieron establecer que ambos se unen a la misma zona, dentro de las mismas células y al mismo tiempo.

- ZmMYB11 y ZmZIM91 pueden formar un heterodímero que interactúa con el modulo regulatorio en cis AC-GATA/C de *ZmCOMT* con el fin de reprimir su expresión pero en presencia de MeJA reducen su capacidad de unión con el promotor de esta diana.

Bibliografía

- Aasland R, Stewart AF, Gibson T. 1996. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends in biochemical sciences* 21: 87-8
- Agostini I, Navarro JM, Bouhamdan M, Willetts K, Rey F, et al. 1999. The HIV-1 Vpr co-activator induces a conformational change in TFIIB. *FEBS letters* 450: 235-9
- Altmann T. 1998. Recent advances in brassinosteroid molecular genetics. *Curr Opin Plant Biol* 1: 378-83
- Aparicio O, Geisberg JV, Struhl K. 2004. Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]* Chapter 17: Unit 17 7
- Appenzeller L, Doblin M, Barreiro R, Wang HY, Niu XM, et al. 2004. Cellulose synthesis in maize: isolation and expression analysis of the cellulose synthase (CesA) gene family. *Cellulose* 11: 287-99
- Arda HE, Walhout AJ. 2010. Gene-centered regulatory networks. *Briefings in functional genomics* 9: 4-12
- Bailey TL, Elkan C. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2: 28-36
- Bansal G, Xie Z, Rao S, Nocka KH, Druey KM. 2008. Suppression of immunoglobulin E-mediated allergic responses by regulator of G protein signaling 13. *Nature immunology* 9: 73-80
- Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69: 3613-34
- Bauby H, Divol F, Truernit E, Grandjean O, Palauqui JC. 2007. Protophloem differentiation in early Arabidopsis thaliana development. *Plant Cell Physiol* 48: 97-109
- Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci*: 17:125-97
- Bhargava A, Mansfield SD, Hall HC, Douglas CJ, Ellis BE. 2010. MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the Arabidopsis inflorescence stem. *Plant Physiol* 154: 1428-38
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J. 2009a. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of experimental botany* 60: 509-21
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J. 2009b. Role of lignification in plant defense. *Plant Signal Behav* 4: 158-9
- Bien-Willner GA, Stankiewicz P, Lupski JR. 2007. SOX9cre1, a cis-acting regulatory element located 1.1 Mb upstream of SOX9, mediates its enhancement through the SHH pathway. *Human molecular genetics* 16: 1143-56
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology* 54: 519-46
- Bolduc N, Hake S. 2009. The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. *Plant Cell* 21: 1647-58
- Bolouri H, Davidson EH. 2002. Modeling DNA sequence-based cis-regulatory gene networks. *Developmental biology* 246: 2-13
- Bonawitz ND, Chapple C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual review of genetics* 44: 337-63
- Bouquin T, Mattsson O, Naested H, Foster R, Mundy J. 2003. The Arabidopsis *lue1* mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *Journal of cell science* 116: 791-801
- Bouziri A, Hamdi A, Borgi A, Hadj SB, Fitouri Z, et al. 2011. Datura stramonium L. poisoning in a geophagous child: a case report. *International journal of emergency medicine* 4: 31

- Brux A, Liu TY, Krebs M, Stierhof YD, Lohmann JU, et al. 2008. Reduced V-ATPase activity in the trans-Golgi network causes oxylipin-dependent hypocotyl growth inhibition in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 1088-100
- Burton RA, Shirley NJ, King BJ, Harvey AJ, Fincher GB. 2004. The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiol* 134: 224-36
- Campbell MM, Sederoff RR. 1996. Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiol* 110: 3-13
- Cano-Delgado A, Lee JY, Demura T. 2010. Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues. *Annual review of cell and developmental biology* 26: 605-37
- Cano-Delgado A, Penfield S, Smith C, Catley M, Bevan M. 2003. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 34: 351-62
- Cano-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-Garcia S, et al. 2004. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* 131: 5341-51
- Capellades M, Torres MA, Bastisch I, Stiefel V, Vignols F, et al. 1996. The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissues. *Plant Mol Biol* 31: 307-22
- Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3: 1-30
- Clay NK, Nelson T. 2002. VH1, a provascular cell-specific receptor kinase that influences leaf cell patterns in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2707-22
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16: 735-43
- Clouse SD. 1996. Plant hormones: brassinosteroids in the spotlight. *Curr Biol* 6: 658-61
- Clouse SD. 2011. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23: 1219-30
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC. 1996. A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111: 671-8
- Clouse SD, Sasse JM. 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 427-51
- Collas P. 2009. The state-of-the-art of chromatin immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 567: 1-25
- Congdon N, Wang Y, Song Y, Choi K, Zhang M, et al. 2008. Visual disability, visual function, and myopia among rural Chinese secondary school children: the Xichang Pediatric Refractive Error Study (X-PRES)--report 1. *Investigative ophthalmology & visual science* 49: 2888-94
- Cooper SJ, Trinklein ND, Anton ED, Nguyen L, Myers RM. 2006. Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome research* 16: 1-10
- Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, et al. 2005. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308: 1149-54
- Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee MO, et al. 2002. Arabidopsis brassinosteroid-insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3beta-like kinase. *Plant Physiol* 130: 1506-15
- Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nurnberg P, et al. 2009. Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. *American journal of human genetics* 84: 483-92

- Davidson EH, ebrary Inc. 2006. The regulatory genome gene regulatory networks in development and evolution. pp. xi, 289 p. ill. (chiefly col.). Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press,
- Davidson EH, Levine MS. 2008. Properties of developmental gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20063-6
- Deal RB, Henikoff S. 2011. The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in Arabidopsis thaliana. *Nature protocols* 6: 56-68
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, et al. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* 13: 4777-88
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, et al. 2006. Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol* 140: 499-511
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, et al. 2008. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322: 1380-4
- Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C, et al. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* 58: 497-513
- Divi UK, Krishna P. 2009. Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New biotechnology* 26: 131-6
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science* 15: 573-81
- Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, Turner JG. 2002. The Arabidopsis mutant cev1 links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 14: 1557-66
- Esau K, Gill RH. 1969. Tobacco mosaic virus in dividing mesophyll cells of Nicotiana. *Virology* 38: 464-72
- Feller A, Machemer K, Braun EL, Grotewold E. 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J* 66: 94-116
- Fornale S, Shi X, Chai C, Encina A, Irar S, et al. 2010a. ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J* 64: 633-44
- Fornale S, Shi Xinhui, Chai Chenglin, Encina Antonio, Irar Sami, et al. 2010b. ZmMYB31 directly represses the maize COMT gene and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *submitted*
- Fornale S, Sonbol FM, Maes T, Capellades M, Puigdomenech P, et al. 2006. Down-regulation of the maize and Arabidopsis thaliana caffeic acid O-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors. *Plant Mol Biol* 62: 809-23
- Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM, Chapple C. 2002a. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis. *Plant J* 30: 47-59
- Franke R, Humphreys JM, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, et al. 2002b. The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* 30: 33-45
- Franken P, Schrell S, Peterson PA, Saedler H, Wienand U. 1994. Molecular analysis of protein domain function encoded by the myb-homologous maize genes C1, Zm 1 and Zm 38. *Plant J* 6: 21-30
- Friedrichsen DM, Joazeiro CA, Li J, Hunter T, Chory J. 2000. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiol* 123: 1247-56
- Fujioka S, Yokota T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual review of plant biology* 54: 137-64
- Fukuda H. 1997. Tracheary Element Differentiation. *Plant Cell* 9: 1147-56

- Fukuda H. 2007. Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 379–91
- Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, et al. 2007. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Developmental cell* 13: 177-89
- Genovesi V, Fornale S, Fry SC, Ruel K, Ferrer P, et al. 2008. ZmXTH1, a new xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in maize, affects cell wall structure and composition in Arabidopsis thaliana. *Journal of experimental botany* 59: 875-89
- Gill G. 2001. Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays in biochemistry* 37: 33-43
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S. 2002. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130: 1319-34
- Gonzalez-Garcia MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-Garcia S, et al. 2011. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* 138: 849-59
- Gray J, Caparros-Ruiz D, Grotewold E. 2012. Grass phenylpropanoids: regulate before using! *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 184: 112-20
- Groover A, Jones AM. 1999. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol* 119: 375-84
- Groover AT. 2005. What genes make a tree a tree? *Trends in plant science* 10: 210-4
- Grotewold E, Drummond BJ, Bowen B, Peterson T. 1994. The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76: 543-53
- Guillaumie S, San-Clemente H, Deswarte C, Martinez Y, Lapierre C, et al. 2007. MAIZEWALL. Database and developmental gene expression profiling of cell wall biosynthesis and assembly in maize. *Plant Physiol* 143: 339-63
- Gutierrez J, Lopez Nunez-Flores MJ, Gomez-Ros LV, Novo Uzal E, Esteban Carrasco A, et al. 2009. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Planta* 230: 767-78
- Halpin C, Holt K, Chojecki J, Oliver D, Chabbert B, et al. 1998. Brown-midrib maize (bm1)--a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J* 14: 545-53
- Handakumbura PP, Hazen SP. 2012. Transcriptional Regulation of Grass Secondary Cell Wall Biosynthesis: Playing Catch-Up with Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science* 3: 74
- Harding SA, Leshkevich J, Chiang VL, Tsai CJ. 2002. Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate:coenzyme a ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. *Plant Physiol* 128: 428-38
- Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M. 2007. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant methods* 3: 11
- Hartmann U, Sagasser M, Mehrtens F, Stracke R, Weisshaar B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol* 57: 155-71
- Hatton D, Sablowski R, Yung MH, Smith C, Schuch W, Bevan M. 1995. Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco. *Plant J* 7: 859-76
- Hayashi S, Ishii T, Matsunaga T, Tominaga R, Kuromori T, et al. 2008. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. *Plant Cell Physiol* 49: 1522-35

- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, et al. 2005. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307: 1634-8
- Hemm MR, Herrmann KM, Chapple C. 2001. AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. *Trends in plant science* 6: 135-6
- Hobbie L, Estelle M. 1994. Genetic approaches to auxin action. *Plant, cell & environment* 17: 525-40
- Hoffman BG, Jones SJ. 2009. Genome-wide identification of DNA-protein interactions using chromatin immunoprecipitation coupled with flow cell sequencing. *The Journal of endocrinology* 201: 1-13
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M. 2003. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *The Journal of biological chemistry* 278: 95-103
- Hossain Z, McGarvey B, Amyot L, Gruber M, Jung J, Hannoufa A. 2012. DIMINUTO 1 affects the lignin profile and secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Planta* 235: 485-98
- Hothorn M, Belkhadir Y, Dreux M, Dabi T, Noel JP, et al. 2011. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* 474: 467-71
- Humphreys JM, Chapple C. 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol* 5: 224-9
- Humphreys JM, Hemm MR, Chapple C. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10045-50
- Hunziker A, Tuboly C, Horvath P, Krishna S, Semsey S. 2010. Genetic flexibility of regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 12998-3003
- Ibanes M, Fabregas N, Chory J, Cano-Delgado AI. 2009. Brassinosteroid signaling and auxin transport are required to establish the periodic pattern of Arabidopsis shoot vascular bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13630-5
- Jack J, Dorsett D, Delotto Y, Liu S. 1991. Expression of the cut locus in the Drosophila wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer. *Development* 113: 735-47
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* 6: 3901-7
- Jeziorska DM, Jordan KW, Vance KW. 2009. A systems biology approach to understanding cis-regulatory module function. *Seminars in cell & developmental biology* 20: 856-62
- Jiang C, Pugh BF. 2009. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature reviews. Genetics* 10: 161-72
- Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrtens F, et al. 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. *Embo J* 19: 6150-61
- Johnson NL, Stephenson HF. 1980. Influence of aperture size on the photometry of retroreflectors. *Applied optics* 19: 1247-52
- Jones L, Ennos AR, Turner SR. 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *Plant J* 26: 205-16
- Joseleau JP, Ruel K. 1997. Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes. An investigation by Fourier transform infrared cross-polarization-magic angle spinning ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and immunocytochemical transmission electron microscopy. *Plant Physiol* 114: 1123-33
- Jouanin L, Goujon T, de Nadai V, Martin MT, Mila I, et al. 2000. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiol* 123: 1363-74
- Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT. 2008. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Current opinion in cell biology* 20: 253-9

- Kadonaga JT. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 116: 247-57
- Kagale S, Rozwadowski K. 2011. EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 6: 141-6
- Kaneda M, Rensing KH, Wong JC, Banno B, Mansfield SD, Samuels AL. 2008. Tracking monolignols during wood development in lodgepole pine. *Plant Physiol* 147: 1750-60
- Karimi M, Inze D, Depicker A. 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science* 7: 193-5
- Kaufmann K, Wellmer F, Muino JM, Ferrier T, Wuest SE, et al. 2010. Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science* 328: 85-9
- Kauschmann A, Jessop A, Koncz C, Szekeres M, Willmitzer L, Altmann T. 1996. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J* 9: 701-13.
- Kim TM, Park PJ. 2011. Advances in analysis of transcriptional regulatory networks. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 3: 21-35
- Kim TW, Wang ZY. 2010. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annual review of plant biology* 61: 681-704
- Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, et al. 2005. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433: 167-71
- Kirchhamer CV, Yuh CH, Davidson EH. 1996. Modular cis-regulatory organization of developmentally expressed genes: two genes transcribed territorially in the sea urchin embryo, and additional examples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9322-8
- Klopocki E, Ott CE, Benatar N, Ullmann R, Mundlos S, Lehmann K. 2008. A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *Journal of medical genetics* 45: 370-5
- Ko JH, Kim WC, Han KH. 2009. Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 60: 649-65
- Ko JH, Yang SH, Park AH, Lerouxel O, Han KH. 2007. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 50: 1035-48
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, et al. 1998. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16: 263-76
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, et al. 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* 19: 1855-60
- Lange BM, Lapierre C, Sandermann H, Jr. 1995. Elicitor-Induced Spruce Stress Lignin (Structural Similarity to Early Developmental Lignins). *Plant Physiol* 108: 1277-87
- Lau S, Jurgens G, De Smet I. 2008. The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20: 1738-46
- Lauvergeat V, Lacombe C, Lacombe E, Lasserre E, Roby D, Grima-Pettenati J. 2001. Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from Arabidopsis thaliana are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* 57: 1187-95
- Lee KJ, Marcus SE, Knox JP. 2011. Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Molecular plant* 4: 212-9
- Lee MM, Schiefelbein J. 1999. WEREWOLF, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* 99: 473-83
- Lee TI, Young RA. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics* 34: 77-137

- Levine M, Davidson EH. 2005. Gene regulatory networks for development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4936-42
- Li E, Wang S, Liu Y, Chen JG, Douglas CJ. 2011. OVATE FAMILY PROTEIN4 (OFP4) interaction with KNAT7 regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 67: 328-41
- Li J, Chory J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-38
- Li J, Chory J. 1999. Brassinosteroid actions in plants. *Journal of experimental botany* 50: 332-40
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC. 2002. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213-22
- Li L, Cheng XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA, Chiang VL. 2001. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* 13: 1567-86
- Li L, Popko JL, Umezawa T, Chiang VL. 2000. 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *The Journal of biological chemistry* 275: 6537-45
- Li L, Yu X, Thompson A, Guo M, Yoshida S, et al. 2009. *Arabidopsis* MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J* 58: 275-86
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, et al. 2010. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature genetics* 42: 1060-7
- Lin X, Tirichine L, Bowler C. 2012. Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species. *Plant methods* 8: 48
- Lipsick JS. 1996. One billion years of Myb. *Oncogene* 13: 223-35
- Liu S, Liu Z, Xie Z, Pang J, Yu J, et al. 2008. Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by interfering with Sp1/NF-kappaB-dependent DNA methyltransferase activity in acute myeloid leukemia. *Blood* 111: 2364-73
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-8
- Lois R, Dietrich A, Hahlbrock K, Schulz W. 1989. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J* 8: 1641-8
- Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J, Axel R. 2006. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126: 403-13
- Louwers M, Bader R, Haring M, van Driel R, de Laat W, Stam M. 2009. Tissue- and expression level-specific chromatin looping at maize b1 epialleles. *Plant Cell* 21: 832-42
- Madan Babu M, Teichmann SA. 2003. Functional determinants of transcription factors in *Escherichia coli*: protein families and binding sites. *Trends in genetics : TIG* 19: 75-9
- Mandava NB. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 23-52
- Martin C, Paz-Ares J. 1997. MYB transcription factors in plants. *Trends in genetics : TIG* 13: 67-73
- Mathur J, Molnar G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, et al. 1998. Transcription of the *Arabidopsis* CPD gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J* 14: 593-602
- Meier C, Bouquin T, Nielsen ME, Raventos D, Mattsson O, et al. 2001. Gibberellin response mutants identified by luciferase imaging. *Plant J* 25: 509-19
- Mejia-Guerra MK, Pomeranz M, Morohashi K, Grotewold E. 2012. From plant gene regulatory grids to network dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 1819: 454-65

- Mele G, Ori N, Sato Y, Hake S. 2003. The knotted1-like homeobox gene BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes Dev* 17: 2088-93
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W. 2001. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol Biol* 47: 239-74
- Mitchell PJ, Tjian R. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-8
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, et al. 2007. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 270-80
- Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. 2005. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of Arabidopsis regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* 17: 2993-3006
- Mora-Garcia S, Vert G, Yin Y, Cano-Delgado A, Cheong H, Chory J. 2004. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes Dev* 18: 448-60
- Morohashi K, Zhao M, Yang M, Read B, Lloyd A, et al. 2007. Participation of the Arabidopsis bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events. *Plant Physiol* 145: 736-46
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-97
- Mussig C. 2005. Brassinosteroid-promoted growth. *Plant biology* 7: 110-7
- Mussig C, Fischer S, Altmann T. 2002. Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol* 129: 1241-51
- Nagaki K, Talbert PB, Zhong CX, Dawe RK, Henikoff S, Jiang J. 2003. Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of Arabidopsis thaliana centromeres. *Genetics* 163: 1221-5
- Nam KH, Li J. 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203-12
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J. 2006. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126: 467-75
- Nemhauser JL, Mockler TC, Chory J. 2004. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS biology* 2: E258
- Neutelings G. 2011. Lignin variability in plant cell walls: contribution of new models. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 181: 379-86
- Ng KH, Yu H, Ito T. 2009. AGAMOUS controls GIANT KILLER, a multifunctional chromatin modifier in reproductive organ patterning and differentiation. *PLoS biology* 7: e1000251
- Nirmalan PK, Kenneth J, Thomas R. 2006. Postcataract endophthalmitis in South India. *Ophthalmology* 113: 2375-6; author reply 76-7
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Tax FE, et al. 2000. Biosynthetic pathways of brassinolide in Arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 201-9
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, et al. 1999. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of Arabidopsis accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol* 121: 743-52
- Novina CD, Roy AL. 1996. Core promoters and transcriptional control. *Trends in genetics : TIG* 12: 351-5
- Ohashi-Ito K, Fukuda H. 2010. Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Curr Opin Plant Biol* 13: 670-6
- Oliveri P, Tu Q, Davidson EH. 2008. Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5955-62
- Palmer MB, Majumder P, Green MR, Wade PA, Boss JM. 2007. A 3' enhancer controls snail expression in melanoma cells. *Cancer research* 67: 6113-20

- Pauwels L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, et al. 2008. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1380-5
- Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H. 1987. The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J* 6: 3553-8
- Penning BW, Hunter CT, 3rd, Tayengwa R, Eveland AL, Dugard CK, et al. 2009. Genetic resources for maize cell wall biology. *Plant Physiol* 151: 1703-28
- Pichon M, Courbou I, Beckert M, Boudet AM, Grima-Pettenati J. 1998. Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. *Plant Mol Biol* 38: 671-6
- Pincon G, Maury S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, et al. 2001. Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* 57: 1167-76
- Piquemal J, Chamayou S, Nadaud I, Beckert M, Barriere Y, et al. 2002. Down-regulation of caffeic acid o-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. *Plant Physiol* 130: 1675-85
- Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, Li SF, Parish RW. 2004. AtMYB32 is required for normal pollen development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 40: 979-95
- Puigdomènech P, Caparrós-Ruiz D. 2011. La energía de los vegetales. Contribución de las plantas y los microorganismos a la producción de energía. *Fundación Gas Natural* 21
- Puigdomenech P, Perez P, Murigneux A, Martinant J, Tixier M, et al. 2001. Identifying genes associated with a qtl corn digestibility locus. *Patent WO 0155395-A 1,3*
- Rabinowicz PD, Braun EL, Wolfe AD, Bowen B, Grotewold E. 1999. Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* 153: 427-44
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133: 1051-71
- Ralph J. 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* : 3:29–60
- Ralph J, Brunow G, Boerjan W. 2007. Lignins. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 707-20
- Richard VS, Kenneth J, Ramaprabha P, Kirupakaran H, Chandy GM. 2001. Impact of introduction of sharps containers and of education programmes on the pattern of needle stick injuries in a tertiary care centre in India. *The Journal of hospital infection* 47: 163-5
- Rogers AR, Driver JW, Constantinou PE, Kenneth Jamison D, Diehl MR. 2009. Negative interference dominates collective transport of kinesin motors in the absence of load. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 11: 4882-9
- Rogers LA, Campbell MM. 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytol*: 164:17-30
- Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, et al. 2004. Molecular phenotyping of the pal1 and pal2 mutants of Arabidopsis thaliana reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* 16: 2749-71
- Romero I, Fuertes A, Benito MJ, Malpica JM, Leyva A, Paz-Ares J. 1998. More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 14: 273-84
- Rosler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J. 1997. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol* 113: 175-9
- Roudier F, Fernandez AG, Fujita M, Himmelspach R, Borner GH, et al. 2005. COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell* 17: 1749-63

- Rubin EM. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454: 841-5
- Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, et al. 2004. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* 16: 3216-29
- SABiosciences., QUIAGEN. 2011. EpiTect ChIP qPCR Array Handbook. *Online*
- Sablowski RW, Moyano E, Culianez-Macia FA, Schuch W, Martin C, Bevan M. 1994. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J* 13: 128-37
- Sainz MB, Grotewold E, Chandler VL. 1997. Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. *Plant Cell* 9: 611-25
- Salas Fernandez MG, Becraft PW, Yin Y, Lubberstedt T. 2009. From dwarves to giants? Plant height manipulation for biomass yield. *Trends in plant science* 14: 454-61
- Samuels AL, Rensing KH, Douglas CJ, Mansfield SD, Dharmawardhana DP, Ellis BE. 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* 216: 72-82
- Sanchez-Rodriguez C, Rubio-Somoza I, Sibout R, Persson S. 2010. Phytohormones and the cell wall in Arabidopsis during seedling growth. *Trends in plant science* 15: 291-301
- Sarkanen K, Ludwig C. 1971a. Lignins: Occurrence, Formation, Structure, and Reactions. . *New York: Wiley-Intersci*: 916
- Sarkanen KV, Ludwig CH. 1971b. Lignins: Occurrence, Formation, Structure, and Reactions. *New York: Wiley-Intersci*: 916 pp
- Schagat T, Paguio A, Kopish K, PROMEGA. 2007. Normalizing genetic reporter assays: approaches and considerations for increasing consistency and statistical significance. *Cell notes*
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, et al. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-5
- Schoch G, Goepfert S, Morant M, Hehn A, Meyer D, et al. 2001. CYP98A3 from Arabidopsis thaliana is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *The Journal of biological chemistry* 276: 36566-74
- Schrader J, Nilsson J, Mellerowicz E, Berglund A, Nilsson P, et al. 2004. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell* 16: 2278-92
- Schuetz M, Smith R, Ellis B. 2013. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of experimental botany* 64: 11-31
- Schumacher K, Chory J. 2000. Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Curr Opin Plant Biol* 3: 79-84
- Sehr EM, Agusti J, Lehner R, Farmer EE, Schwarz M, Greb T. 2010. Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *Plant J* 63: 811-22
- Sekhon RS, Lin H, Childs KL, Hansey CN, Buell CR, et al. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant J* 66: 553-63
- She J, Han Z, Kim TW, Wang J, Cheng W, et al. 2011. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* 474: 472-6
- She J, Han Z, Zhou B, Chai J. 2013. Structural basis for differential recognition of brassinolide by its receptors. *Protein & cell* 4: 475-82
- Sheen J. 2002. A transient expression assay using Arabidopsis mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>
- Shen H, He X, Poovaiah CR, Wuddineh WA, Ma J, et al. 2012. Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks. *The New phytologist* 193: 121-36

- Shiu SH, Bleecker AB. 2001. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001: re22
- Shiu SH, Bleecker AB. 2003. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 132: 530-43
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, et al. 2005. CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 2059-76
- Sieburth L. 1993. GUS Staining. Protocol adapted from Jefferson, R.A., et al., 1987. EMBO 6:3901-3907. and from Rodrigues-Pousada et al. 1993. *The Plant Cell* 5:897-911.
- SIGMA-ALDRICH. Online. User Guide. Imprint Ultra Chromatin Immunoprecipitation Kit. *Online Catalog No. CHP2*
- Singh LN, Hannenhalli S. 2010. Correlated changes between regulatory cis elements and condition-specific expression in paralogous gene families. *Nucleic Acids Res* 38: 738-49
- Smale ST, Kadonaga JT. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry* 72: 449-79
- Sonbol FM, Fornale S, Capellades M, Encina A, Tourino S, et al. 2009. The maize ZmMYB42 represses the phenylpropanoid pathway and affects the cell wall structure, composition and degradability in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 70: 283-96
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435: 637-45
- Spitz F, Furlong EE. 2012. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature reviews. Genetics* 13: 613-26
- Stephenson FH. 2010. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology. *Academic Press is an imprint of Elsevier*
- Stracke R, Ishihara H, Hupé G, Barsch A, Mehrtens F, et al. 2007. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the Arabidopsis thaliana seedling. *Plant J* 50: 660-77
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. *Curr Opin Plant Biol* 4: 447-56
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K, et al. 2010. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Developmental cell* 19: 765-77
- Swami V, Frederick DA, Aavik T, Alcalay L, Allik J, et al. 2010. The attractive female body weight and female body dissatisfaction in 26 countries across 10 world regions: results of the international body project I. *Personality & social psychology bulletin* 36: 309-25
- Tanaka K, Murata K, Yamazaki M, Onosato K, Miyao A, Hirochika H. 2003. Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes required for cellulose synthesis in the secondary wall. *Plant Physiol* 133: 73-83
- Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, Vickers K, Turner SR. 2003. Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1450-5
- Thomas-Chollier M, Sand O, Turatsinze JV, Janky R, Defrance M, et al. 2008. RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 36: W119-27
- Thomas MC, Chiang CM. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41: 105-78
- Toquin V, Grausem B, Geoffroy P, Legrand M. 2003. Structure of the tobacco caffeic acid O-methyltransferase (COMT) II gene: identification of promoter sequences involved in gene inducibility by various stimuli. *Plant Mol Biol* 52: 495-509
- Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, et al. 2008. High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of Phloem development and structure in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 1494-503

- Tumpel S, Cambronero F, Sims C, Krumlauf R, Wiedemann LM. 2008. A regulatory module embedded in the coding region of *Hoxa2* controls expression in rhombomere 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20077-82
- Turatsinze JV, Thomas-Chollier M, Defrance M, van Helden J. 2008. Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nature protocols* 3: 1578-88
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276: 1865-8
- Ursache R, Nieminen K, Helariutta Y. 2013. Genetic and hormonal regulation of cambial development. *Physiologia plantarum* 147: 36-45
- van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries SC. 2001. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 125: 1880-90
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*: 18:259-88
- Vandepoele K, Casneuf T, Van de Peer Y. 2006. Identification of novel regulatory modules in dicotyledonous plants using expression data and comparative genomics. *Genome biology* 7: R103
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153: 895-905
- Velez-Bermudez IC. 2013. Caracterización Funcional del factor de transcripción ZmZIM91 de maíz. *Tesis Doctoral. U. B.*
- Vergara CE, Carpita NC. 2001. b-D-Glucan synthases and the CesA gene family: lessons to be learned from the mixed-linkage (1/3),(1/4)-b-Dglucan synthase. *Plant Mol Biol* 47: 145-60
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J. 2005. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual review of cell and developmental biology* 21: 177-201
- Vignols F, Rigau J, Torres MA, Capellades M, Puigdomenech P. 1995. The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell* 7: 407-16
- Vogel J. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 11: 301-7
- Wang H, Zhao Q, Chen F, Wang M, Dixon RA. 2011. NAC domain function and transcriptional control of a secondary cell wall master switch. *Plant J* 68: 1104-14
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, et al. 2002. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell* 2: 505-13
- Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. 2001. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410: 380-3
- Whetten R, Sederoff R. 1995. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-13
- Wu X, Wu J, Luo Y, Bragg J, Anderson O, et al. 2013. Phylogenetic, Molecular, and Biochemical Characterization of Caffeic Acid o-Methyltransferase Gene Family in *Brachypodium distachyon*. *International journal of plant genomics* 2013: 423189
- Xie L, Yang C, Wang X. 2011. Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 62: 4495-506
- Xie Z, Grotewold E. 2008. Serial ChIP as a tool to investigate the co-localization or exclusion of proteins on plant genes. *Plant methods* 4: 25
- Xie Z, Hu X, Chen X, Sun J, Shi Q, Jing X. 2008. Synthesis and characterization of novel biodegradable poly(carbonate ester)s with photolabile protecting groups. *Biomacromolecules* 9: 376-80

- Xie Z, Li D, Wang L, Sack FD, Grotewold E. 2010. Role of the stomatal development regulators FLP/MYB88 in abiotic stress responses. *Plant J* 64: 731-9
- Xinhui S. 2011. Regulatory Functions of ZmMYB31 and ZmMYB42 in Maize Phenylpropanoid Pathway. *The University of Toledo*
- Xu H, Handoko L, Wei X, Ye C, Sheng J, et al. 2010. A signal-noise model for significance analysis of ChIP-seq with negative control. *Bioinformatics* 26: 1199-204
- Xu N, Tsai CL, Lee JT. 2006. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science* 311: 1149-52
- Xu SL, Rahman A, Baskin TI, Kieber JJ. 2008. Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 3065-79
- Yamamoto R, Demura T, Fukuda H. 1997. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured Zinnia cells. *Plant Cell Physiol* 38: 980-3
- Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, et al. 2006. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* 60: 107-24
- Ye H, Li L, Yin Y. 2011. Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways. *Journal of integrative plant biology* 53: 455-68
- Ye ZH. 2002. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annual review of plant biology* 53: 183-202
- Ye ZH, Freshour G, Hahn MG, Burk DH, Zhong R. 2002. Vascular development in Arabidopsis. *International review of cytology* 220: 225-56
- Ye ZH, Kneusel RE, Matern U, Varner JE. 1994. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in Zinnia. *Plant Cell* 6: 1427-39
- Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. 2005. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 120: 249-59
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, et al. 2002. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109: 181-91
- Yochum GS, Cleland R, Goodman RH. 2008. A genome-wide screen for beta-catenin binding sites identifies a downstream enhancer element that controls c-Myc gene expression. *Molecular and cellular biology* 28: 7368-79
- Yu X, Li L, Li L, Guo M, Chory J, Yin Y. 2008. Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7618-23
- Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, et al. 2011. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 65: 634-46
- Zhang J, Elo A, Helariutta Y. 2011. Arabidopsis as a model for wood formation. *Current opinion in biotechnology* 22: 293-9
- Zhao J, Zhang W, Zhao Y, Gong X, Guo L, et al. 2007. SAD2, an importin -like protein, is required for UV-B response in Arabidopsis by mediating MYB4 nuclear trafficking. *Plant Cell* 19: 3805-18
- Zhao Q, Dixon RA. 2011. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends in plant science* 16: 227-33
- Zhong R, Demura T, Ye ZH. 2006. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 3158-70
- Zhong R, Iii WH, Negrel J, Ye ZH. 1998. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell* 10: 2033-46
- Zhong R, Kays SJ, Schroeder BP, Ye ZH. 2002. Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. *Plant Cell* 14: 165-79

- Zhong R, Lee C, Ye ZH. 2010. Evolutionary conservation of the transcriptional network regulating secondary cell wall biosynthesis. *Trends in plant science* 15: 625-32
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH. 2008. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2763-82
- Zhong R, Richardson EA, Ye ZH. 2007. Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Planta* 225: 1603-11
- Zhong R, Ye ZH. 2007. Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 10: 564-72
- Zhong R, Ye ZH. 2009. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal Behav* 4: 1028-34
- Zhong R, Ye ZH. 2012. MYB46 and MYB83 bind to the SMRE sites and directly activate a suite of transcription factors and secondary wall biosynthetic genes. *Plant Cell Physiol* 53: 368-80
- Zhou A, Wang H, Walker JC, Li J. 2004. BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant J* 40: 399-409
- Zhu SQ, Qi L, Rui YF, Li RX, He XP, Xie ZP. 2008. Astragaloside IV inhibits spontaneous synaptic transmission and synchronized Ca²⁺ oscillations on hippocampal neurons. *Acta pharmacologica Sinica* 29: 57-64
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, et al. 1994. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12: 11-24

ANEXOS

Anexo 1. Spatial regulation of the BRI1 Receptor Like Kinase 3 (BRL3) by BES1, a major component in the brassinosteroid signalling pathway.

SPATIAL REGULATION OF THE BRI1 RECEPTOR LIKE KINASE 3 (BRL3) BY BES1, A MAJOR COMPONENT IN THE BRASSINOSTEROID SIGNALLING PATHWAY*

Reinhard Lehner^{1,2} Jorge Salazar-Henao^{1,2} Josep Vilarrasa¹ and Ana Caño-Delgado^{1, *}

¹Dept. Molecular Genetics, CRAG, Campus UAB Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

²These authors contributed equally

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: ana.cano@cragenomica.es

*For submitted.

ABSTRACT

Brassinosteroids (BRs) are plant hormones, perceived by the plasma membrane receptor BRI1 and exhibiting essential roles in plant growth and development. Two BR receptor like kinases *AtBRL3* and *AtBRL1*, have been identified as BRI1 homologous, capable to bind BL, the most active BR, with high affinity and expressed in the plant vascular tissue. In addition several studies reported a repression of BRI1 and BRL3 after BR treatment. In the case of *AtBRL3*, this study also demonstrated a BR regulated expression pattern in the plant vascular tissue, whereas for *AtBRL1*, BRs did not exhibit a regulatory role. Moreover, the BR regulated expression of *AtBRL3* in the root vascular tissue has been shown to be dose dependent, promoting its expression at low BR levels and repressing and/or altering its spatial distribution with increasing concentrations of BRs. Analysing the 5' flanking region of *AtBRL3* revealed one BRRE and one E-box, both putative BES1 and BZR1 binding sites. Additional investigations uncovered BES1 as the important factor in the *AtBRL3* regulation, exhibiting its function by directly binding to the BRRE in the 5' flanking region of *AtBRL3*.

INTRODUCTION

Brassinosteroids (BRs) are polyhydroxylated plant steroid hormones that were first identified by their ability to elongate plant stems when applied exogenously (Grove et al 1979, Mandava 1988). Afterwards, mutants affected in BR synthesis or signal transduction also revealed an essential role for BRs in cell elongation and differentiation (Fukuda 1997, Yamamoto et al 1997). So far BRs have been reported to be involved in the regulation of multiple developmental and physiological processes, like plant vegetative and reproductive growth and development, cell elongation and division, vascular differentiation, senescence, flowering time, male fertility, pollen development, seed size, photomorphogenesis and organ differentiation as well as modulators of numerous environmental signals (Clouse 1996, Clouse 2011, Gonzalez-Garcia et al 2011, Hacham et al 2011, Hao et al 2013, Li & Chory 1999, Mandava 1988, Ye et al 2010). In a genetic screen performed in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), a BR insensitive loss-of-function mutant (Clouse et al 1996), carrying a mutation in the BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) gene has been identified. This mutant exhibited severe dwarfism with dark green and epinastic leaves and a reduction in apical dominance and fertility (Azpiroz et al 1998, Clouse 1996, Choe et al 2001, Choe et al 1999, Kauschmann et al 1996, Li et al 1996, Noguchi et al 1999, Szekeres et al 1996). This BRI1 gene encodes for a membrane-localized leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) consisting of an extracellular domain, a single trans-membrane domain, a juxtamembrane domain, a cytoplasmic serine/threonine kinase domain and a C-terminal regulatory region (Li & Chory 1997). So far more than 200 LRR-RLKs have been identified in the Arabidopsis genome (Shiu & Bleecker 2001, Yin et al 2002b), but only few of them have been assigned to a function. Moreover, most of these receptors do not have a known ligand. Unlike, genetic and biochemical evidence has demonstrated that BRI1 is an essential component of a receptor complex that binds brassinolide (BL), the most active BR compound, with high affinity (Wang et al 2001).

Recent structural studies of free BRI1 and its complex with brassinolide confirmed the role of BRI1 as a plasma membrane receptor for BRs and provided important insights into steroid hormone recognition in plants (Hothorn et al 2011, She et al 2011). Upon direct binding of BL to the extracellular domain (Kinoshita et al 2005), BRI1 forms a heterodimer with its co-receptor BRI1 ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1/SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 3 (BAK1/SERK3), another LRR-RLK (Li et al 2002, Nam & Li 2002,

Russinova et al 2004). Subsequently, the BR signal is modulated intracellular in a phosphorylation and dephosphorylation manner, ending in the de-phosphorylation of the BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) and BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) genes (Gampala et al 2007, Li et al 2002, Mora-Garcia et al 2004, Wang et al 2002, Yin et al 2002a). BES1 and BZR1 are two members of a plant-specific family of basic-helix-loop-helix transcription factors that act as homo- or heterodimers (He et al 2005, Li et al 2009, Yin et al 2002a, Yu et al 2008). De-phosphorylated BES1/BZR1 proteins accumulate in the nucleus, where they presumably regulate the transcription of BR-regulated genes (Wang et al 2002, Yin et al 2002a).

Detailed analysis of promoter elements indicated, that both BES1 and BZR1 are able to bind BR response elements (BRRE) as well as E-boxes. (Sun et al 2010, Yu et al 2011). Binding of BES1 to BRRE elements was shown to be much stronger than to E-boxes, since efficient BES1 binding to the latter needs a heterodimer partner (Yin et al 2005). While BRRE elements are mostly enriched in BR repressed genes, E-box elements are mostly enriched in BR induced genes (Sun et al 2010, Yu et al 2011). In addition it was previously thought that BZR1 acts as a transcriptional repressor (He et al 2005) while BES1 acts as a transcriptional activator (Yin et al 2005), however, recent global analysis clearly showed that both, BZR1 and BES1, can function as either activators or repressors. The way how BES1 and BZR1 regulate their downstream targets is most likely determined by additional promoter sequence elements and/or BES1 and BZR1 interacting proteins (Sun et al 2010, Ye et al 2011, Yu et al 2011).

Later, *AtBRL1*, *AtBRL2* and *AtBRL3*, three BR receptor like kinases, have been identified as BRI1 homologues in a sequence homology search in the Arabidopsis genome (Cano-Delgado et al 2004). Unlike *AtBRL2*, previously described as VASCULAR HIGHWAY 1 (VH1) (Clay & Nelson 2002), *AtBRL1* and *AtBRL3* encode membrane localized receptors that were able to bind BL with high affinity. In addition *AtBRL1* and *AtBRL3* were also able to complement the phenotypic defects in the *bri1* mutant when expressed under the BRI1 promoter demonstrating that both, *AtBRL1* and *AtBRL3*, are functional BR receptors (Cano-Delgado et al 2004, Zhou et al 2004). Moreover, recent structural studies performed, explored the mechanism of BR perception by the *AtBRL1* receptor (She et al 2013). On the contrary to BRI1, which is ubiquitously expressed, *AtBRL1* and *AtBRL3*, exhibit specific expression in the vasculature. Analysis of transgenic plants expressing a 1.72 kb promoter fragment of

AtBRL1 fused to the GUS reporter gene showed *AtBRL1* expression in the columella cells of the root tip and in the vascular initials in the meristematic zone, where the expression continues from the root to the hypocotyls and cotyledons following the midvein. In the case of *AtBRL3* a 750 bp promoter fragment fused to the GUS reporter gene has been used, identifying *AtBRL3* expression in the two protophloem cell files at the root elongation zone and in the secondary veins at the tip of cotyledons of Arabidopsis seedlings (Cano-Delgado et al 2004). This unique expression pattern of *AtBRL1* and *AtBRL3* in the vasculature suggests a role in provascular plant organogenesis via BR signaling. In contrast to the very well characterized role of BRI1 in vascular development, the precise role of *AtBRL1* and *AtBRL3* still remains to be identified. For the BRI1 gene several studies indicated a repression after BR treatment (Goda et al 2002, Mussig et al 2002, Sun et al 2010, Vert et al 2005, Yu et al 2011). Similar results have been obtained for *AtBRL3*.

In this study, we identified cis-acting elements in the 5' untranslated region of *AtBRL1* (*ProBRL1*) and *AtBRL3* (*ProBRL3*), determining their strength and vascular-specific expression patterns. In the case of *ProBRL3* we were able to demonstrate a dose-dependent BR spatial expression pattern, while *ProBRL1* expression seemed to be BR independent. In general *ProBRL3* expression was repressed after applying BL exogenously; only at very low BL levels an increase has been detected. This repressed *ProBRL3* expression was mainly due to the binding of BES1 to a cis-acting BRRE element.

RESULTS

Promoter analysis of the vascular genes *AtBRL3* and *AtBRL1*

Previous GUS reporter gene assays in transgenic Arabidopsis lines using a 750 bp *AtBRL3* promoter fragment and a 1.72 kb *AtBRL1* promoter fragment, respectively, demonstrated an expression for both genes in the plant vascular tissue (Cano-Delgado et al 2004). In addition both are described as functional BR receptors, and since an equilibrated BR signalling has been demonstrated to be necessary to maintain proper root meristem length and root growth in general (Gonzalez-Garcia et al 2011) it can be assumed that BRs are also able to regulate *AtBRL3* and *AtBRL1* expression in the vascular tissue and especially in the root vascular of plants.

To investigate if BRs exhibit a regulatory function regarding the expression pattern of *AtBRL3* and *AtBRL1*, their genomic regions upstream of their translational start codons have been

especially analysed *in silico* for E-boxes and BR response elements (BRRE), since both are known to bind BES1 and BZR1 *in vivo*. Not surprisingly E-boxes and BRRE binding sites have been identified in the 5' flanking regions of *AtBRL3* and *AtBRL1* analysed. Whereas in the *ProBRL3* genomic region (Figure 1A) one BRRE binding site (-1441 bp) and one E-box (-892 bp) have been detected, the *ProBRL1* genomic region (Figure S1A) contained six E-boxes (-1230, -1184, -1167, 779, 717 and 443 bp) but lacked BRREs. To gain more insights into the functional role of these cis BR responding elements, six truncated *ProBRL3* (-1719 bp, -1098 bp, -755 bp, -498 bp, -384 bp and -218 bp) and five truncated *ProBRL1* (-1641 bp, -978 bp, -790 bp, -479 bp and -334 bp) transgenic lines fused to the histochemical GUS reporter gene have been generated (Figure 1A and S1A).

Expression analysis of *ProBRL3::GUS*

To analyse *ProBRL3::GUS* expression, 6 day old seedlings of *two representative and independent T3 homozygous lines* have been used for each construct generated. The longest deletion construct used (*ProBRL3-1719::GUS*), showed GUS expression in the vascular tissues and the tip of the cotyledons, in the SAM, in regions where lateral roots emerge, in the differentiation zone and in the two protophloem cell files and the quiescent centre within the meristematic zone (Figure 1B. A-D). Removal of a 621 bp region (*ProBRL3-1098::GUS*) eliminated expression in the SAM and in the quiescent centre, but in the vascular tissues and tip of the cotyledons, in regions where lateral roots emerge, in the differentiation zone and in the two protophloem cell files expression was still visible (Figure 1B. E-H). A similar expression pattern has been detected in the construct *ProBRL3-755::GUS*, even though its signal was quite weaker, especially in the two protophloem cell files and in the differentiation zone. On the other hand GUS expression was lost in regions where lateral roots emerge (Figure 1B. I-L). In the deletion constructs *ProBRL3-498::GUS* and *ProBRL3-384::GUS*, expression was only detected in the vascular tissues and tip of the cotyledon or in the tip of the cotyledon, respectively (Figure 1B. M-P and Q-T). Analysing the shortest construct generated (*ProBRL3-218::GUS*), revealed a complete loss of the GUS reporter gene (Figure 1B. U-X).

These results indicate the necessity of a minimal promoter length of around -755 bp for proper *AtBRL3* expression in the vascular, although the expression pattern differs slightly to the one detected in *ProBRL3-1719::GUS* transgenics. Thus, it can be assumed that elements within the 5' flanking region between -1719 and -1098 bp are controlling *AtBRL3* expression in the

SAM and in the quiescent centre. The loss of *AtBRL3* expression in emerging lateral roots in *ProBRL3-755::GUS* transgenics suggests additional relevant elements within the region -1098 and -755 bp. The three shortest deletion constructs generated are located in different distances to the translational starting codon within the 5'UTR, a region generally affecting mRNA stability and translation by binding of proteins to regulatory elements. Thus, a strong loss of *ProBRL3::GUS* expression was expected in these transgenic lines. Indeed *ProBRL3::GUS* expression was strongly negatively affected in such lines, starting from a complete loss in roots (*ProBRL3-498::GUS*), followed by a loss in the leaf vascular tissue (*ProBRL3-384::GUS*) and finally a complete abolishment (*ProBRL3-218::GUS*).

Expression analysis of *ProBRL1::GUS*

Likewise *ProBRL3::GUS*, the expression pattern of *ProBRL1::GUS* was investigated in 6 day old seedlings of two representative and independent T3 homozygous lines for each construct generated. The longest truncated construct analysed (*ProBRL1-1641::GUS*) showed GUS expression in the vascular tissue and the tip of the cotyledons, in the SAM, in the tip of lateral roots and in the differentiation zone but surprisingly no GUS expression was detected in the root meristem (Figure S1B. A-D). Removal of 663 bp (*ProBRL1-978::GUS*) or 851 bp (*ProBRL1-790::GUS*), resulted in a complete loss of GUS expression in the SAM as well as in the root tip of lateral roots, whereas in the vascular tissue and tip of the cotyledons and in the differentiation zone GUS expression was still present (Figure S1B. E-H and I-L). In transgenics *ProBRL1-479::GUS* and *ProBRL1-334::GUS* the expression of the GUS reporter gene was completely abolished (Figure S1B. M-T), suggesting that within the region -790 and -479 bp regulatory elements should be present regulating proper *AtBRL1* expression. Furthermore the two shortest truncations generated are missing parts of the 5' UTR, pointing out an additional reason explaining the complete loss of *AtBRL1* expression.

BRs affecting the vascular expression pattern of *AtBRL3* but not *AtBRL1*

In recent studies *AtBRL3* was shown both, a repressed BR BZR1 putative target (Sun et al 2010) and a down-regulated BR putative target of BES1 (Yu et al 2011). To investigate the effects of BRs onto the expression pattern of *AtBRL3*, 6 day old seedlings of the previously described transgenic lines have been treated with 4 nM BL for 48 hrs. Histochemical GUS expression analysis of the BL treated *ProBRL3-1719::GUS* line, showed similar expression in the vein and tip of the cotyledons, in the SAM, in lateral roots, in the differentiation zone and in the quiescent centre (Figure 2 A-D), compared to their untreated counterparts (Figure 1B.

A-D). Though, a striking difference in the expression pattern in the stele of BL treated lines has been observed. The GUS reporter gene mirroring *AtBRL3* expression showed a highly diffused pattern in the stele, making it hardly possible to detect specific expression in the two protophloem cell files (Figure 2 D), indicating a regulatory role for BRs in the expression of *AtBRL3*.

In the other truncated lines (*ProBRL3-1098::GUS*, *ProBRL3-755::GUS*, *ProBRL3-498::GUS*, *ProBRL3-384::GUS* and *ProBRL3-218::GUS*) treated with BL, the expression pattern of the GUS reporter did not change compared to their untreated counterparts (Figure 2 E-X). However, GUS expression in the two protophloem cell files of BL treated *ProBRL3-1098::GUS* and *ProBRL3-755::GUS* transgenics were significantly down-regulated (Figure 2 H and L), supporting recently reported studies in which *AtBRL3* has been identified as a repressed *BES1* and *BZR1* target (Sun et al 2010, Yu et al 2011). In addition, only transgenics carrying a 5' promoter fragment larger than -1098 bp showed an alteration in the *AtBRL3* expression pattern after BL treatment. Interestingly, the region between -1719 and -1098 bp contains a BRRE at position -1441 bp (Figure 1 A), capable of binding *BES1* and *BZR1*. Thus, it can be assumed that the modified spatial expression of *AtBRL3* in response to BRs, was due to the BRRE itself or to other yet unknown cis acting elements within this region exhibiting important function in the regulation of *AtBRL3*. Since *AtBRL1* likewise *AtBRL3* was shown to be a functional BR receptor able to bind BL and specifically expressed in the vascular (Cano-Delgado et al 2004), it could be assumed that *AtBRL1* expression might be regulated by BRs as well. Surprisingly, BL treated transgenics of each *ProBRL1::GUS* construct generated, did not show any difference in the expression pattern (Figure S2) compared to their untreated counterparts (Figure S1B). Thus, *AtBRL1* in contrast to *AtBRL3* does not seem to be regulated by BRs. However, this finding coincides with experiment data in which *AtBRL1* was detected as a non BR regulated *BZR1* putative target (Sun et al 2010).

BRs regulate *AtBRL3* dose dependent in the meristem

To understand how BRs affect the expression pattern of *AtBRL3* within the meristem in more detail, GUS stained *ProBRL3::GUS* deletion constructs have subsequently been stained with mPS-PI according to (Truernit et al 2008). Investigating *ProBRL3-1719::GUS* in the meristem using the mPS-PI staining technique revealed specific expression of the GUS reporter in the protophloem cell layer at the transition zone where undifferentiated protophloem start to differentiate as well as in the quiescent centre (Figure 3A. A-C). An

identical expression pattern of *AtBRL3* in the protophloem cell layer was seen in the transgenics *ProBRL3-1098::GUS* and *ProBRL3-755::GUS* (Figure 3A. F and H), whereas in the latter the signal was quite weak. Unsurprisingly, GUS staining was not detectable in the quiescent centre.

Treating the transgenic line *ProBRL3-1719::GUS* with 4 nM BL for 48 hrs shifted the GUS reporter gene from the protophloem cell layer into the stele and towards the quiescent centre, where the GUS reporter was still expressed (Figure 3A. D and E). Due to a highly diffused expression pattern of *ProAtBRL3::GUS* in the stele, its expression at the transition zone, where protophloem starts to differentiate, was hardly detectable. Re-screening transgenic lines *ProBRL3-1098::GUS* and *ProBRL3-755::GUS* after BL treatment using the mPS-PI staining technique confirmed the previous unaltered but repressed expression pattern of the GUS reporter in the two protophloem cell layers of the meristem (Figure 3A. G and I). These results reconfirmed the importance of the region between -1719 and -1098 bp for *AtBRL3* expression in the meristem and the assumption that BRs might regulate its expression via the BRRE at position -1441 bp.

Thus, BRs seem to be relevant in regulating the expression pattern of *AtBRL3* in the meristem, presumably through BES1 and/or BZR1 binding to either the BRRE (-1441 bp) and/or an E-box (-892 bp) present in the 5' flanking region of *AtBRL3*. Knowing the importance for BRs in promoting cell elongation and differentiation (Iwasaki & Shibaoka 1991, Yamamoto et al 1997) and the recently demonstrated dose dependent effects of BRs onto the root meristem size and root length in general (Gonzalez-Garcia et al 2011) raised the question: is the *AtBRL3* expression pattern in the vascular of the root meristem BR dose dependent as well?

To prove this hypothesis, *ProBRL3-1719::GUS* transgenics have been continuously treated with different concentrations of BL. Using a very low concentration of BL (0.004 nM) exhibit an striking increase in the expression of the GUS reporter in both, the protophloem cell layer and the quiescent centre. In addition *ProAtBRL3::GUS* did not show only expression at the transition zone, its expression continued also along the protophloem cell layer towards the quiescent centre. A partly shift of *ProAtBRL3::GUS* into the stele has also been observed (Figure 3B. J-L). On the other hand using concentrations higher than 0.004 nM BL repressed *ProAtBRL3::GUS* dose dependently in the two protophloem cell layers and promoted a shift into the stele and towards the quiescent centre (Figure 3B. M-Q). Summarizing these results

indicate a BR dose dependent regulation of *AtBRL3* in the meristem, elevating its level at low concentrations and successively repressing it by increasing the BL concentration. Moreover the reduced specificity in the protophloem cell layer underlies the same parameters when increased levels of BL have been used.

***AtBRL3* is regulated by BRs via BES1**

The 5' flanking region of *AtBRL3* contains one BRRE element at position -1441 bp and one E-box at position -892 bp (Figure 1A). Both cis acting elements can be bound by BES1 and BZR1, transcription factors regulating the transcription of BR regulated genes. This brought up the hypothesis that *AtBRL3* might be regulated by BRs via BES1 or BZR1. Since low levels of BRs seem to promote *AtBRL3* expression and BES1 has been previously described as an transcriptional activator (Yin et al 2005), it is reasonable that BES1 might be the critical factor elucidating this effect. Understanding the functional role of BES1 in the BR regulated *AtBRL3* expression, *ProBRL3-1719::GUS* and *ProBRL3-1098::GUS* have been crossed to *bes1-D* (a BES1 mutant with enhanced BES1 signalling) and to an inducible BES1 line (*35S::BES1-D:GR*). Likewise applying low levels of BL (0.004 nM for 6 days) to *ProBRL3-1719::GUS* transgenics, crossed to *bes1-D* revealed a similar expression pattern for *ProAtBRL3::GUS* in the meristem: increased and continued expression in the protophloem cell layer, in the quiescent centre and a partly shift to the stele (Figure 4A. C and D). In contrast, *ProBRL3-1719::GUS* transgenics crossed to the inducible line overexpressing BES1, resembled the *ProBRL3::GUS* expression of transgenics treated with high levels of BL: a shift of *AtBRL3* into the stele (Figure 4A. B and E). Investigating *ProBRL3-1098::GUS* crossed to *bes1-D* exhibited a slightly expansion of *AtBRL3* expression in the two protophloem cell files, contrary to the inhibition observed after treatment with high levels of BL. These results strongly indicate a dose dependent BR regulated *AtBRL3* expression pattern in the root meristem mainly based on BES1 protein levels. Presumably BES1 acts through binding the BRRE at position -1441 bp.

BES1 regulates *AtBRL3* via binding to the BRRE

The BRRE at the position -1441 bp present in the 5' flanking region of *AtBRL3* seemed to be an important regulatory element in response to BL. In addition an identified E-box at position -892 bp might play an additional role in *AtBRL3* regulation. However, since BES1 is known to bind both BRRE and E-box and previous results already demonstrated a genetic interaction

of *AtBRL3* and BES1, it might be obvious that BES1 regulates *AtBRL3* via binding to one or the other or to both elements.

To verify this hypothesis, a chromatin immunoprecipitation and a transient expression experiment in Arabidopsis protoplasts have been made. The former showed an enrichment of BES1 in the area of BRRE (-1441 bp), whereas in the region between -1098 bp and -755 bp, containing the E-box (-892 bp), an enrichment of BES1 was not observed (Figure 4B). This indicates that BES1 primarily regulates *AtBRL3* through binding the BRRE at position -1441.

To perform the latter experiment, three truncated *AtBRL3* 5' flanking regions (*ProBRL3-1719*, *ProBRL3-1098* and *ProBRL3-384*) have been fused to the Firefly luciferase reporter gene and used for co-transfection of Arabidopsis protoplasts together with overexpressed BES1 protein (35S::bes1-D:GFP) or GFP alone (35S::GFP) as a control. Co-transfected protoplasts using *ProBRL3-1719::LUC* and 35S::bes1-D:GFP showed a strong reduction in the luciferase activity compared to the co-transfected combination using the control. Quantifying the activity of the luciferase reporter using *ProBRL3-1098::LUC* instead of *ProBRL3-1719::LUC* revealed also a reduction, although the reduction was low. This slightly reduction was probably due to the E-box present at position -892 bp. Otherwise, the *ProBRL3-384::LUC* construct did not show much luciferase activity, neither in co-transfection with overexpressed BES1 nor in the one with the control (Figure 4C). However, investigating this deletion construct using the GUS reporter revealed also a low expression for *AtBRL3*. In summary these results demonstrate a BR regulated expression pattern of *AtBRL3* in the root meristem which is based on sufficient binding of BES1 to the BRRE at position -1441 bp.

DISCUSSION

AtBRL3 and *AtBRL1* have been described as BRI1 homologues (serine/threonine kinase receptors), capable to bind BRs with high affinity and a specific expression in the plant vasculature. Using a -750 bp promoter fragment of *AtBRL3* for instance, revealed expression in the two protophloem cell layers whereas using a 1.72 kb promoter fragment of *AtBRL1* showed expression in the columella cells of the root tip and in the vascular initials within the meristematic zone (Cano-Delgado et al 2004). Because of the recent demonstrated expression in the vascular and close homology to BRI1 it could be assumed that both receptors might have a functional role in the vascular development regulated by BRs. Though, a profound knowledge how and under which circumstances *AtBRL3* and *AtBRL1* are expressed and the

mechanism how their expression pattern in the vascular is regulated waited to be explored. For this purpose the identification of regulatory elements and possible factors driving the expression of *AtBRL3* and *AtBRL1* is fundamental. In this study, a detailed expression analysis for *AtBRL3* and *AtBRL1* was conducted and its 5' regulatory elements essential for proper gene expression have been determined. In addition the expression of *AtBRL3* in the root vasculature underlies a dose dependent BR regulatory mechanism.

Tissue specific expression of *AtBRL3* and *AtBRL1*

This study demonstrated a highly specific expression pattern for *AtBRL3* and *AtBRL1* throughout the plant vascular tissue. *AtBRL3* for instance, showed expression in the vascular tissues and the tip of the cotyledons, in the SAM, in regions where lateral roots emerge, in the differentiation zone and in the two protophloem cell files and the quiescent centre within the meristematic zone. Moreover the region from -1719 to -1098 bp as well as the region from -1098 to -755 bp 5' of the translational start codon has been demonstrated to contain essential regulatory elements to drive *AtBRL3* in different vascular tissues. The minimal promoter length for *AtBRL3* has been confirmed to be 755 bp. In transgenics carrying shorter promoter constructs than -755 bp, expression in the root was completely abolished and in deletions generated close to the translational start codon the expression was completely lost, indicating fundamental regions within the 5' UTR.

In a similar experimental procedure the expression pattern of *AtBRL1* has been investigated, demonstrating expression in the vascular tissue and the tip of the cotyledons, in the SAM, in the tip of lateral roots and in the differentiation zone of the root. Likewise, regions 5' of the translational start codon necessary for *AtBRL1* expression in different vascular tissues have been determined between -1641 and -978 bp and between -790 and -479 bp.

BR regulated expression of *AtBRL3* in the root vascular is dose dependent

Characterising *AtBRL3* transgenics in response to 4 nM BL for 48 hrs revealed a shifted expression pattern in the root meristem of *ProBRL3-1719::GUS* lines. Whereas native *AtBRL3* was expressed at the transition zone of undifferentiated to differentiated protophloem in the protophloem cell layer and the quiescent centre, BL treatment drove the expression from the protophloem cell layer into the stele and towards the quiescent centre. It is worth mentioning that BRs are reported as regulators for vascular differentiation, in particular promoting xylem and repressing the formation of phloem (Fukuda 1997). This might explain

the hardly possible detection in the protophloem cell layer, since BRs repress the formation of phloem. The same treatment in *ProBRL3-1098::GUS* and *ProBRL3-755::GUS* lines caused a significant reduction of *AtBRL3* in the protophloem cell layer as well. Interestingly, the 5' region between -1719 and -1098 bp contains a BRRE and the 5' region between -1098 and -755 bp an E-box, elements that can be bound by BES1 and/or BZR1.

Not only BRs are regulating the *AtBRL3* expression pattern, moreover this regulated action is dose dependent. Likewise the root meristem needs an equilibrated BR signalling to maintain its length (Gonzalez-Garcia et al 2011), the expression pattern of *AtBRL3* differs significantly when subjected to different levels of BL. For instance, very low levels of BL (0.004 nM for 6 days) increased the expression in the protophloem cell layer at the transition zone and an expansion towards the quiescent centre. This concentration used was also recently demonstrated to increase the root epidermal cell number in the meristem and by this the size of the meristem (Gonzalez-Garcia et al 2011). In addition BRs are known to promote cell differentiation (Iwasaki & Shibaoka 1991, Yamamoto et al 1997). Thus, it can be assumed that low levels of BRs not only increase the epidermal cell number and size of the meristem but also promote the differentiation of phloem. This observation is antagonistic to the reported function for BRs in repressing phloem differentiation (Fukuda 1997). However, in the lines *ProBRL3 -1719::GUS*, *-1098::GUS* and *-755::GUS*, treatment with elevated levels of BL (≥ 0.04 nM BL) reduced the GUS expression in the protophloem cell layer, due to both a presumably repressed number of differentiated phloem cells and/or to a direct repression caused by BRs.

For the sake of completeness it is noteworthy that similar experiments in *AtBRL1* transgenics did not change the expression pattern in the lines analysed. This indicates that *AtBRL1* expression is not BR regulated. Moreover an additionally study already reported that *AtBRL1* was detected as a non BR regulated BZR1 putative target (Sun et al 2010). However it cannot be completely ruled out that BRs do not have any functional role in the regulation of *AtBRL1*.

BRs regulate *AtBRL3* expression through binding of BES1 to a BRRE

Crossing *ProBRL3-1719::GUS* with two lines of BES1 exhibiting different expression levels, resembled the previous obtained results. Analysing crosses with *bes1-D*, a dominant negative mutant with enhanced BES1 signalling, showed an increased and extended *AtBRL3* expression in the protophloem cell layer. This expression pattern was similar to the one

obtained from treating *ProBRL3-1719::GUS* lines with 0.004 nM BL. In contrast analysing lines crossed to an inducible BES1 line, overexpressing the BES1 protein, mirrored the expression pattern of *AtBRL3*, obtained after treatment with elevated BL levels. The expression was shifted into the stele and reduced in the protophloem cell layer. These results not only confirmed the fact that *AtBRL3* expression is BR dose dependent but also that the essential protein is BES1, and that the protein level of BES1 is the important parameter regulating the expression pattern of *AtBRL3* in the root meristem.

The mechanism of *AtBRL3* regulation is probably contrary to the very well studied mechanism of auxin inducible genes, which are regulated by interaction of two classes of transcription factors, the ARFs (auxin-response factors) and its repressors of the AUX/IAA family (Lau et al 2008). In genes responding to auxin ARFs bind to auxin response elements exhibiting the sequence (G/T)GTC(T/C)(T/C) (Ulmasov et al 1997). As long as the auxin concentration is below a certain threshold, members of the AUX/IAA family associate with ARFs to keep genes in a repressed state. As soon as auxin levels increases, the AUX/IAA factors dissociate and the ARFs are able to activate their target genes (Gutierrez et al 2009, Lau et al 2008). In the case of *AtBRL3*, BES1 seems to act as an activator of *AtBRL3* at low protein levels by interacting with maybe yet other unidentified proteins, whereas at elevated levels BES1 either dissociates from its interactors or they are saturated. Anyway, BES1 can bind to the BRRE as a homodimer with the purpose of suppressing the expression of *AtBRL3* in the two protophloem cell files. Moreover high BR levels could also probably increase the concentration of the BES1 protein in the stele, thereby changing the spatial distribution of *AtBRL3*.

In vivo experiments, like CHIP and a luciferase reporter gene assay confirmed the direct interaction of BES1 and the BRRE present in *AtBRL3*. In the former a specific enriched accumulation of BES1 at the region where the BRRE is present has been observed, whereas the region where an E-box was present, no enrichment has been detected. In addition it has been already reported that the binding affinity of BES1 to a BRRE is quite stronger than to E-boxes, since in the former BES1 does not need a partner to form a heterodimer like in the latter (Yin et al 2005). In the luciferase reporter gene assay BES1 was significantly reducing the expression of the luciferase reporter in protoplasts co-transfected with *ProBRL3-1719::LUC* and 35S::*bes1-D::GFP* in contrast to co-transfections of *ProBRL3-1719::LUC* and 35S::*GFP* alone. In addition BES1 also reduced the luciferase activity in *ProBRL3-*

1098::LUC, although the reduction was pretty low. In summary this study clearly demonstrated an expression mechanism for *AtBRL3* in the root meristem which is BES1 dose dependent and mediated by the binding of BES1 to the BRRE present in the promoter of *AtBRL3*.

Proposing a model how BES1 regulates BRL3

As demonstrated and discussed previously the BES1 protein level is fundamental for a proper *AtBRL3* expression pattern in the root meristem. According to the literature BR signalling inhibits the biosynthesis of BRs, through repressing the expression of DWF4, CPD and other genes involved in BR biosynthesis. This repression is partly regulated by BES1 and BZR1 (Clouse 2011, Choe et al 2002, Mathur et al 1998, Mora-Garcia et al 2004, Noguchi et al 1999, Sun et al 2010, Ye et al 2011, Yu et al 2011). In a recent global analysis both proteins have been reported to function as either activators or repressors, depending on the specific target gene promoter (Sun et al 2010, Yu et al 2011). Based on these results, we propose the following model (Figure 5), in which *AtBRL3* is regulated in a feedback mechanism of BR signaling via BES1 protein levels. At low BR concentrations BES1 is mainly in a phosphorylated state. The level of free BES1 is low but it can possible interact with yet unidentified partners to promote the expression of *AtBRL3* in the protophloem cell layer and in addition presumably phloem differentiation. In the presence of high BR levels, BES1 is mainly in a dephosphorylated state. Possible BES1 interacting factors important for the promoting function of BES1 might be saturated and residual BES1 is able to bind as a homodimer to the BRRE, thus repressing *AtBRL3* expression.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and growth conditions

The ecotype Columbia (Col-0) of *Arabidopsis* has been used to generate the *AtBRL3* and *AtBRL1* transgenics. To avoid ecotype variability, the *bes1-D* mutant, originally in Enkheim-2 (En-2) background (Yin et al 2002a), was introgressed into the Col-0 ecotype. Seeds were surface sterilized in 35% sodium hypochlorite, vernalized for 72 hours at 4°C in darkness and grown on plates containing 1x Murashige and Skoog (MS) salt mixture, 1% sucrose and 0.8% agar in the absence or presence of different concentrations of BL (C28H48O6; Wako, Osaka, Japan). Plants were grown under fluorescent light (12 hours light/12 hours dark cycles) for 6 days prior analysis.

***In silico* analysis of the promoters**

The search for predetermined regulatory promoter elements was done by the program DNA-pattern (Thomas-Chollier et al 2008).

Construction of promoter fusions

To generate the various *AtBRL3* and *AtBRL1* promoter fusion constructs (Table S1), Invitrogen's Gateway technology has been used. In the first reaction step pDNOR 221 or pDONR207 have been used to generate entry clones. In the second reaction step the destination vectors pHGWFS7 (GUS/GFP) and pGWB635 (Firefly Luciferase) have been used to generate the expression clones. Transgenic plants (GUS/GFP) were selected for resistance to hygromycin and homozygous plants were used for analysis. In addition the construction 35S::BES1-D:GFP was generated by using the destination vector pB7m34GW and PHTT672 (Renilla luciferase) was bought from Promega.

Histology and microscopy

For b-glucuronidase (GUS) detection, 6-day-old seedlings were immersed on ice-cold 90% (v/v) acetone, incubated 20 minutes on ice, rinsed 2x in dH₂O, infiltrated with GUS (100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 10 mM sodium EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- b-D-glucuronide (Xgluc; Duchefa, Haarlem, The Netherlands), 10 mM potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide) and incubated at 37°C for 15 hours. Samples were rinsed three times in dH₂O and treated with 70% ethanol. Stained roots were visualized with an AxioPhot (Zeiss, Jena, Germany) microscope. For a cell type specific analysis of the root meristem, GUS stained seedlings were subsequently immersed in 10 % acetic acid, supplemented with 50 % MeOH, solution and stained using a modified Pseudo-Schiff (mPS)-PI staining method (Truernit et al 2008). Roots were analysed in a FV 1000 confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Images were processed with the Olympus FV software.

Dual Luciferase Expression Assay

Protoplasts of Arabidopsis were prepared according to Sheen J, 2002 and transfected with different *AtBRL3* promoter fusions, 35S::BES1-D:GFP, 35S::GFP and 35S::Renilla. For the expression assay per se the Dual-Luciferase Reporter Assay System from Promega has been used and with the luminometro Centro LB 960 (Berthold) the bioluminescent signal has been measured. For each experiment three technical and three biological replicates have been used

and results were normalized by dividing the activity of the reporter gene (Firefly) with the activity of control gene (Renilla). To obtain a normalized value for each group the following equation has been used: $\Delta\text{Fold Activity} = \text{Mean (F/R) treated sample} / \text{Mean (F/R) control sample}$ (Schagat et al 2007).

For ChIP experiments 35S::BES1-D:GFP and Col-0 plants were grown in $\frac{1}{2}$ MS (12 hours light/12 hours dark cycles) for 6 days. Seedlings were fixed with 1% of formaldehyde and nuclei were extracted according to (Deal & Henikoff 2011). ChIP experiments using anti-GFP antibodies were performed according to (Gendrel et al 2005). Detection of PCR products was performed using Absolute qPCR SYBR Green mix (Thermo scientific) in a Biorad thermocycler. Three different biological replicas were performed for each region of interest.

References

- Azpiroz R, Wu Y, LoCascio JC, Feldmann KA. 1998. An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* 10: 219-30
- Cano-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-Garcia S, et al. 2004. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* 131: 5341-51
- Clay NK, Nelson T. 2002. VH1, a provascular cell-specific receptor kinase that influences leaf cell patterns in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2707-22
- Clouse SD. 1996. Plant hormones: brassinosteroids in the spotlight. *Curr Biol* 6: 658-61
- Clouse SD. 2011. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23: 1219-30
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC. 1996. A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111: 671-8
- Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann KA. 2001. Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in Arabidopsis. *Plant J* 26: 573-82
- Choe S, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tissier CP, et al. 1999. The Arabidopsis *dwf7/stel* mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 11: 207-21
- Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee MO, et al. 2002. Arabidopsis brassinosteroid-insensitive dwarf12 mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3beta-like kinase. *Plant Physiol* 130: 1506-15
- Deal RB, Henikoff S. 2011. The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in Arabidopsis thaliana. *Nature protocols* 6: 56-68
- Fukuda H. 1997. Tracheary Element Differentiation. *Plant Cell* 9: 1147-56
- Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, et al. 2007. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Developmental cell* 13: 177-89
- Gendrel AV, Lippman Z, Martienssen R, Colot V. 2005. Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nature methods* 2: 213-8
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S. 2002. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130: 1319-34
- Gonzalez-Garcia MP, Vilarrasa-Blasi J, Zhiponova M, Divol F, Mora-Garcia S, et al. 2011. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* 138: 849-59
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, et al. 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. *Nature* 281: 216-17
- Gutierrez J, Lopez Nunez-Flores MJ, Gomez-Ros LV, Novo Uzal E, Esteban Carrasco A, et al. 2009. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from Zinnia elegans. *Planta* 230: 767-78
- Hacham Y, Holland N, Butterfield C, Ubeda-Tomas S, Bennett MJ, et al. 2011. Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* 138: 839-48
- Hao J, Yin Y, Fei SZ. 2013. Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance. *Plant cell reports* 32: 1017-30

- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, et al. 2005. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307: 1634-8
- Hothorn M, Belkhadir Y, Dreux M, Dabi T, Noel JP, et al. 2011. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* 474: 467-71
- Iwasaki T, Shibaoka H. 1991. Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated *Zinnia mesophyll* cells. *Plant Cell Physiol* 32
- Kauschmann A, Jessop A, Koncz C, Szekeres M, Willmitzer L, Altmann T. 1996. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J* 9: 701-13.
- Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, et al. 2005. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433: 167-71
- Lau S, Jurgens G, De Smet I. 2008. The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20: 1738-46
- Li J, Chory J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-38
- Li J, Chory J. 1999. Brassinosteroid actions in plants. *Journal of experimental botany* 50: 332-40
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272: 398-401
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC. 2002. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213-22
- Li L, Yu X, Thompson A, Guo M, Yoshida S, et al. 2009. *Arabidopsis* MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J* 58: 275-86
- Mandava NB. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 23-52
- Mathur J, Molnar G, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, et al. 1998. Transcription of the *Arabidopsis* CPD gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J* 14: 593-602
- Mora-Garcia S, Vert G, Yin Y, Cano-Delgado A, Cheong H, Chory J. 2004. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18: 448-60
- Mussig C, Fischer S, Altmann T. 2002. Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol* 129: 1241-51
- Nam KH, Li J. 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203-12
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, et al. 1999. Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol* 121: 743-52
- Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, et al. 2004. Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* 16: 3216-29
- Schagat T, Paguio A, Kopish K, PROMEGA. 2007. Normalizing genetic reporter assays: approaches and considerations for increasing consistency and statistical significance. *Cell notes*
- She J, Han Z, Kim TW, Wang J, Cheng W, et al. 2011. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* 474: 472-6

- She J, Han Z, Zhou B, Chai J. 2013. Structural basis for differential recognition of brassinolide by its receptors. *Protein & cell* 4: 475-82
- Shiu SH, Bleecker AB. 2001. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001: re22
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K, et al. 2010. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Developmental cell* 19: 765-77
- Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, et al. 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell* 85: 171-82
- Thomas-Chollier M, Sand O, Turatsinze JV, Janky R, Defrance M, et al. 2008. RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 36: W119-27
- Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, et al. 2008. High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of Phloem development and structure in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 1494-503
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. 1997. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276: 1865-8
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J. 2005. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual review of cell and developmental biology* 21: 177-201
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, et al. 2002. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental cell* 2: 505-13
- Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. 2001. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410: 380-3
- Yamamoto R, Demura T, Fukuda H. 1997. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured Zinnia cells. *Plant Cell Physiol* 38: 980-3
- Ye H, Li L, Yin Y. 2011. Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways. *Journal of integrative plant biology* 53: 455-68
- Ye Q, Zhu W, Li L, Zhang S, Yin Y, et al. 2010. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6100-5
- Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. 2005. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 120: 249-59
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, et al. 2002a. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109: 181-91
- Yin Y, Wu D, Chory J. 2002b. Plant receptor kinases: systemin receptor identified. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9090-2
- Yu X, Li L, Li L, Guo M, Chory J, Yin Y. 2008. Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7618-23
- Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, et al. 2011. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 65: 634-46
- Zhou A, Wang H, Walker JC, Li J. 2004. BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant J* 40: 399-409

FIGURES

Figure 1: *In silico* and genetic analysis of *AtBRL3* transgenics

Figure 1A: Schematic diagram of the 5' flanking regions of *AtBRL3*

The top represents part of the 5' flanking region of *AtBRL3* including the 5' UTR and an intron, labelled in orange and red, respectively. The BRRE at position -1441 bp is tagged in red and the E-box at position -892 bp is tagged in blue. The lower part represents the deletion constructs generated fused to the reporter genes GFP and GUS.

Figure 1B: Analysis of generated *AtBRL3* transgenics

A histochemical GUS assay has been performed in 6 day old seedlings of Arabidopsis. Two T3 representative homozygous lines of each construct generated have been used to analyse the GUS activity in the cotyledons, SAM, root differentiation and meristematic zone. Samples have been incubated in a GUS solution for 16 hrs. (A-D) *ProBRL3-1719::GUS* showed expression in the veins and the tip of the cotyledons, in the SAM, in regions where lateral roots emerge, in the differentiation zone, in the two protophloem cell files and the quiescent centre within the meristem. (E-H) *ProBRL3-1098::GUS* showed expression in the veins and the tip of the cotyledons, in regions where lateral roots emerge, in the differentiation zone and in the two protophloem cell files. (I-L) *ProBRL3-755::GUS* showed quite similar expression to *ProBRL3-1098::GUS* although the expression was weaker, especially in the two protophloem cell files and in the differentiation zone. (M-P) *ProBRL3-498::GUS* was only expressed in the veins and tip of the cotyledon. (Q-T) *ProBRL3-384::GUS* was expressed only in the tip of the cotyledon. (U-X) *ProBRL3-218::GUS* did not show any expression in the tissues analysed.

Figure S1: *In silico* and genetic analysis of *AtBRL1* transgenics

Figure S1A: Schematic diagram of the 5' flanking regions of *AtBRL1*

The top represents part of the 5' flanking region of *AtBRL1* including the 5' UTR and introns, labelled in orange and red, respectively. The E-boxes at position -1230, -1184, -1167, -779, -717 and -443 bp are tagged in blue. The lower part represents the deletion constructs generated fused to the reporter genes GFP and GUS.

Figure S1B: Analysis of generated *AtBRL1* transgenics

A histochemical GUS assay has been performed in 6 day old seedlings of Arabidopsis. Two T3 representative homozygous lines of each construct generated have been used to analyse the GUS activity in the cotyledons, SAM, root differentiation and meristematic zone. Samples

have been incubated in a GUS solution for 16 hrs. (A-D) *ProBRL1-1641::GUS* showed expression in the veins and the tip of the cotyledons, in the SAM, in the tip of lateral roots and in the differentiation zone. (E-H) *ProBRL1-978::GUS* and (I-L) *ProBRL1-790::GUS* showed expression in the veins and the tip of the cotyledons and in the differentiation zone. (M-P) *ProBRL1-479::GUS* and (Q-T) *ProBRL1-334::GUS* did not show any expression in the tissues analysed.

Figure 2: BRs regulate *AtBRL3* expression pattern

A histochemical GUS assay has been performed in 6 day old seedlings of *Arabidopsis* treated with 4 nM BL for 48 hrs. Two T3 representative homozygous lines of each construct generated have been used to analyse the GUS activity in the cotyledons, SAM, root differentiation and meristematic zone. Samples have been incubated in a GUS solution for 16 hrs. (A-D) *ProBRL3-1719::GUS* +BL showed expression in the veins and the tip of the cotyledons, in the SAM, in regions where lateral roots emerge, in the differentiation zone and in the quiescent centre. (D) Instead of expression in the two protophloem cell layers the GUS reporter showed diffuse expression in the stele. (E-H) *ProBRL3-1098::GUS* +BL showed expression in the veins and the tip of the cotyledons, in regions where lateral roots emerge, in the differentiation zone and (H) a significantly repressed expression pattern in the two protophloem cell files. (I-L) *ProBRL3-755::GUS* +BL showed quite similar expression to *ProBRL3-1098::GUS* and exhibited also (L) the significantly reduced expression in the two protophloem cell files. (M-P) *ProBRL3-498::GUS* +BL and (Q-T) *ProBRL3-384::GUS* +BL did not show any difference to the untreated lines analysed. (U-X) *ProBRL3-218::GUS* +BL was not expressed in any tissue analysed.

Figure S2: BRs do not regulate *AtBRL1* expression pattern

A histochemical GUS assay has been performed in 6 day old seedlings of *Arabidopsis* treated with 4 nM BL for 48 hrs. Two T3 representative homozygous lines of each construct generated have been used to analyse the GUS activity in the cotyledons, SAM, root differentiation and meristematic zone. Samples have been incubated in a GUS solution for 16 hrs. (A-D) *ProBRL1-1641::GUS* +BL showed expression in the veins and the tip of the cotyledons, in the SAM, in the tip of lateral roots and in the differentiation zone. (E-H) *ProBRL1-978::GUS* and (I-L) *ProBRL1-790::GUS* showed expression in the veins and the tip of the cotyledons and in the differentiation zone. (M-P) *ProBRL1-479::GUS* and (Q-T) *ProBRL1-334::GUS* did not show any expression in the tissues analysed.

Figure 3: *AtBRL3* expression pattern in the root meristem is BR dose dependent

(A) A histochemical GUS assay has been performed in 6 day old seedlings of *Arabidopsis* treated with 4 nM BL for 48 hrs. Two T3 representative homozygous lines of selected transgenics have been used to analyse the GUS activity root meristem. Samples have been incubated in a GUS solution for 16 hrs and subsequently stained with mPS-PI and imaged using a confocal microscope. (PP) protophloem and (QC) quiescent centre (A) *ProBRL3-1719::GUS* showed expression in the protophloem cell layer at the transition zone where protophloem differentiate and in the QC. (B and C) Transversal images of the meristem and the QC in *ProBRL3-1719::GUS* lines. (D) *ProBRL3-1719::GUS* + BL was expressed in the QC and in a diffused pattern in the stele. (E) Transversal images of the meristem in *ProBRL3-1719::GUS* lines treated with 4 nM BL. (F) *ProBRL3-1098::GUS* and (H) *ProBRL3-755::GUS* was expressed in the protophloem. (G) *ProBRL3-1098::GUS* and (I) *ProBRL3-755::GUS* treated with 4 nM BL showed a significantly reduced expression of the GUS reporter in the protophloem. (B) A histochemical GUS assay has been performed in 6 day old seedlings of *Arabidopsis* treated with increasing concentrations of BL (0.004 to 4 nM continuous treatment). Two T3 representative homozygous lines of *ProBRL3-1719::GUS* have been used to analyse the GUS activity in the root meristem. Samples have been incubated in a GUS solution for 16 hrs and subsequently stained with mPS-PI and imaged using a confocal microscope. (PP) protophloem and (QC) quiescent centre (J) *ProBRL3-1719::GUS* treated with 0.004 nM BL showed an increased and expanded expression in the protophloem cell layer towards the QC, where the GUS reporter is expressed as well. (K and L) Transversal images of the meristem and the QC after treatment with 0.004 nM BL. (M) *ProBRL3-1719::GUS* treated with 0.04 nM BL and (N) *ProBRL3-1719::GUS* treated with 0.4 nM BL showed a reduced and misplaced expression in the stele and repression in the QC. (O and P) Transversal images of the meristem and the QC after treatment with 0.4 nM BL. (Q) *ProBRL3-1719::GUS* treated with 4 nM BL showed a misplaced and strongly reduced expression in the stele.

Figure 4: BES1 regulates the *AtBRL3* expression pattern in the root meristem through binding the BRRE.

(A) A histochemical GUS assay has been performed in 6 day old seedlings of *Arabidopsis*. *ProBRL3-1719::GUS* transgenics crossed to either *bes1-D* or *35S::BES1-D:GR* lines. Representative lines have been used to analyse the GUS activity in the root meristem. Samples have been incubated in a GUS solution for 16 hrs and subsequently stained with

mPS-PI and imaged using a confocal microscope. (PP) protophloem and (QC) quiescent centre (A) *ProBRL3-1719::GUS* showed expression in the protophloem cell layer at the transition zone where protophloem differentiate and in the QC. (B) *ProBRL3-1719::GUS* treated continuously with 0.004 nM BL showed an increased and expanded expression in the protophloem cell layer towards the QC and in the QC. (C) *ProBRL3-1719::GUS* crossed to *bes1-D* lines showed increased expression in the protophloem cell layer towards the QC and in the QC, similar to transgenics treated with 0.004 nM BL. (D) *ProBRL3-1719::GUS* treated with 4 nM BL for 48 hrs showed expression in the QC and a diffused expression pattern in the stele. (E) *ProBRL3-1719::GUS* crossed to *35S::BES1-D:GR* lines showed expression in the QC and a diffused expression pattern in the stele, similar to transgenics treated with 4 nM BL for 48 hrs. (F) *ProBRL3-1098::GUS* was expressed in the protophloem. (G) *ProBRL3-1098::GUS* treated with 4 nM BL showed a significantly reduced expression in the protophloem cell layer. (H) *ProBRL3-1098::GUS* crossed to *bes1-D* lines showed expanded expression in the protophloem cell layer.

(B) BES1 was enriched in the 5' flanking region of *AtBRL3* containing the BRRE.

Resulting data of a chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiment showed enrichment of BES1 in the promoter region of *AtBRL3* containing the BRRE (region 1: -1719 to -1098 bp). In contrast between the region -1098 and -755 bp, containing an E-box, an enrichment of BES1 was not detectable (region 2). As a negative control the 3'UTR and UBC30 have been used. Both samples do not show any enrichment of BES1, too.

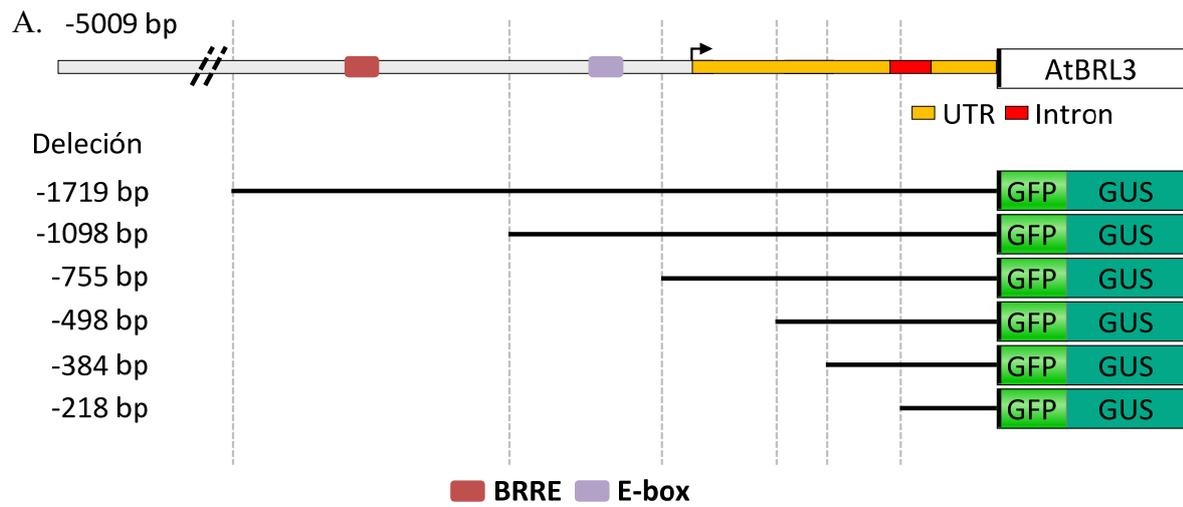
(C) BES1 represses *AtBRL3* expression through binding the BRRE .

In a luciferase reporter gene assay protoplasts of *Arabidopsis* have been co-transfected with either *ProBRL3-1719::LUC*, *ProBRL3-1098::LUC* or *ProBRL3-384::LUC* and either *35S::BES1-D:GFP* or *35S::GFP* (control) and additionally with *35S::Renilla*. Each experiment was done in triplicates and obtained data was normalized to the activity of Renilla (Grotewold et al., 2000). The ratio was calculated as the ratio of each treatment and the treatment of the longest construct used without the repressor. The plotted diagram shows the arithmetic means and the standard error of the mean, demonstrating a strong repression of *AtBRL3* due to the binding of BES1 to the BRRE in *ProBRL3-1719::LUC*.

Figure 5: Model of BR perception regarding expression of *AtBRL3*

A model based on the obtained results, suggesting an BR auto-regulated mechanism of *AtBRL3* expression in the root meristem, depending on BES1 protein levels and their binding capacity to BRRE within the 5' flanking region of *AtBRL3*.

Figure 1.



B.

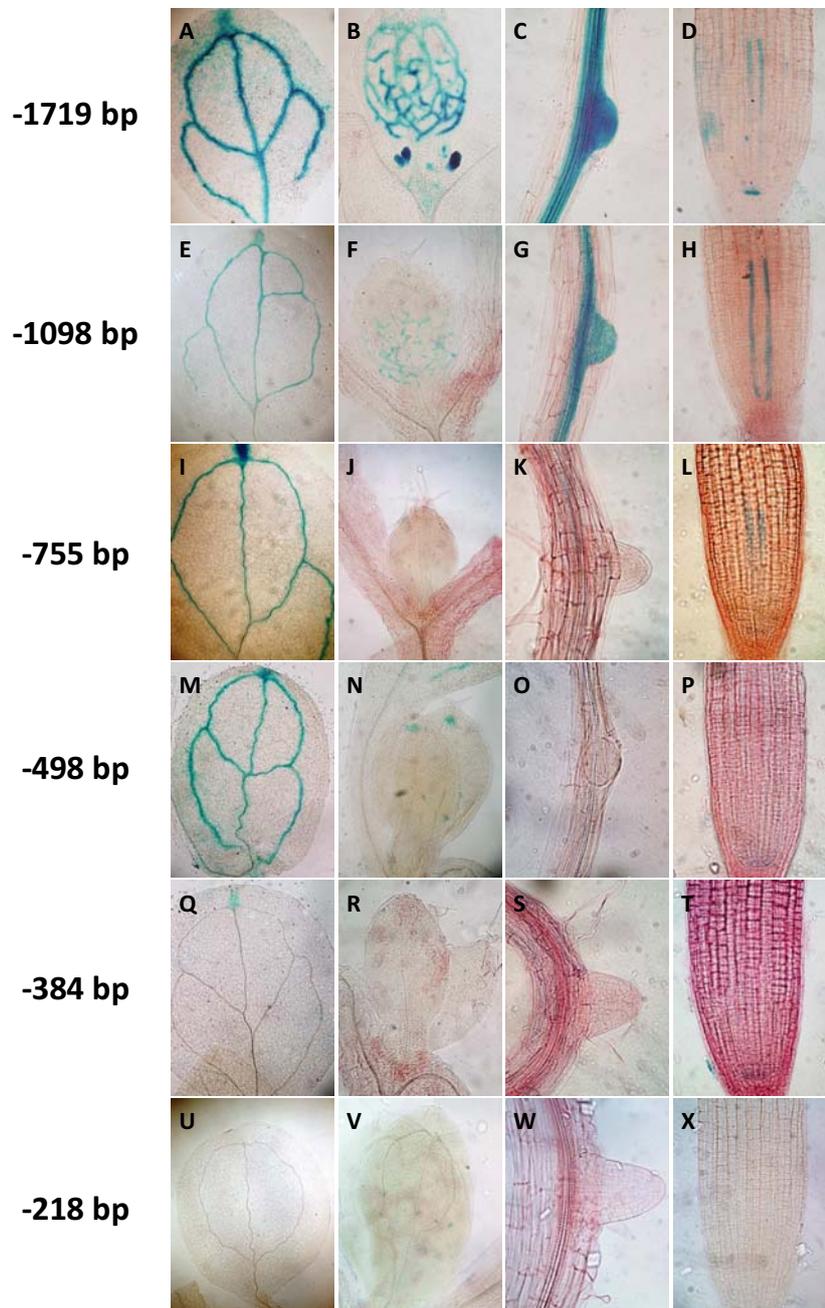


Figure 2.

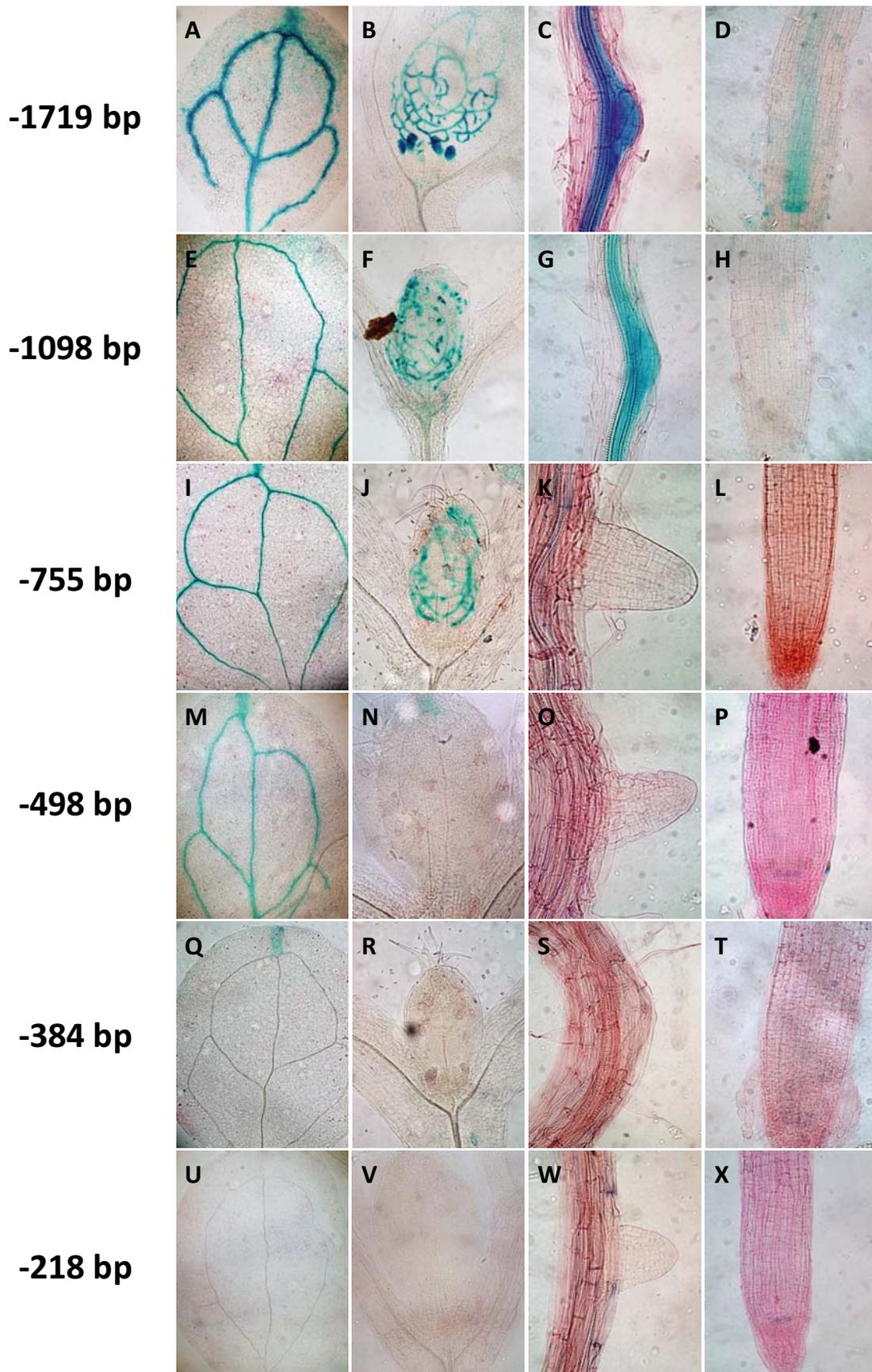


Figure 3.

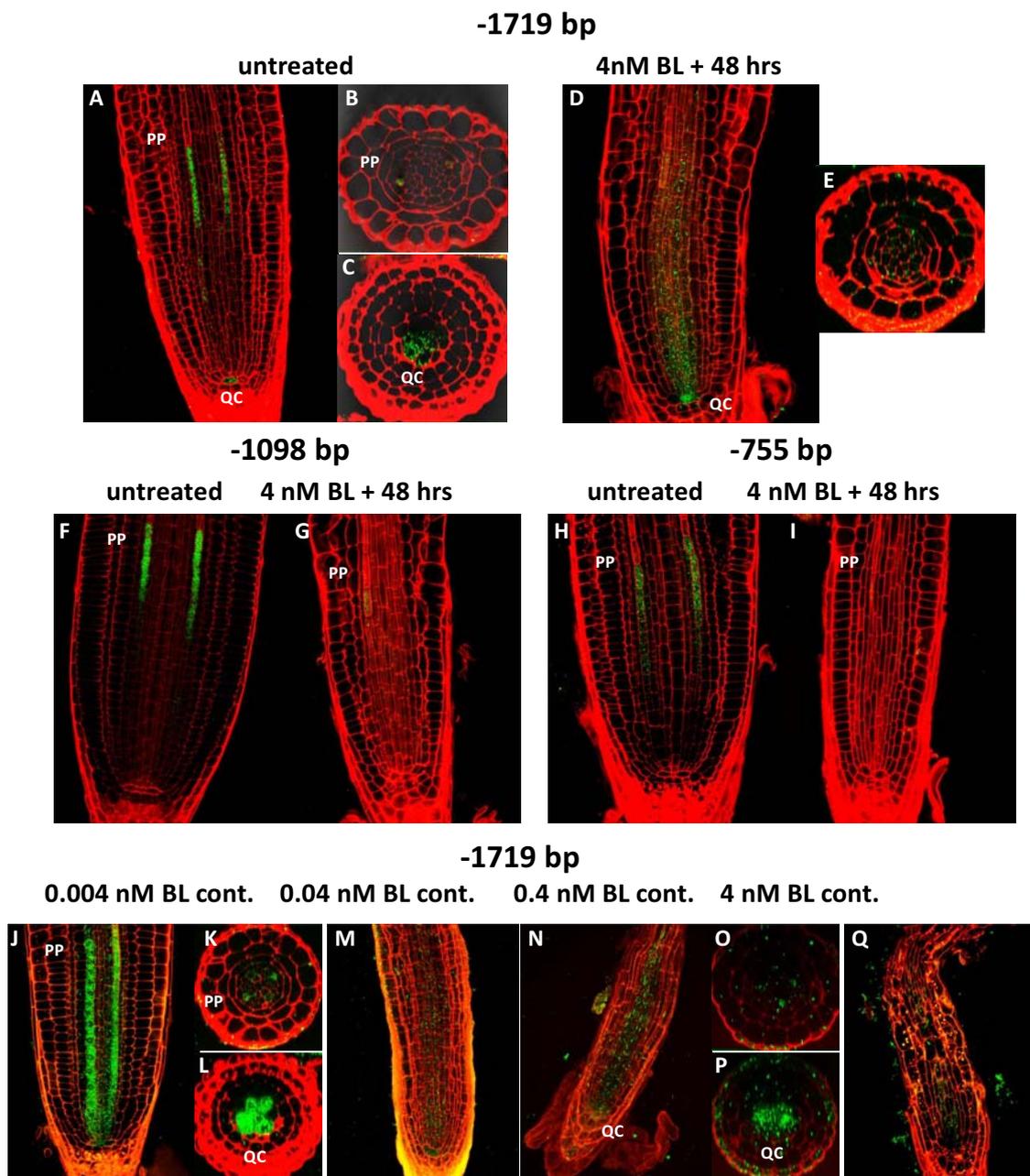


Figure 4.

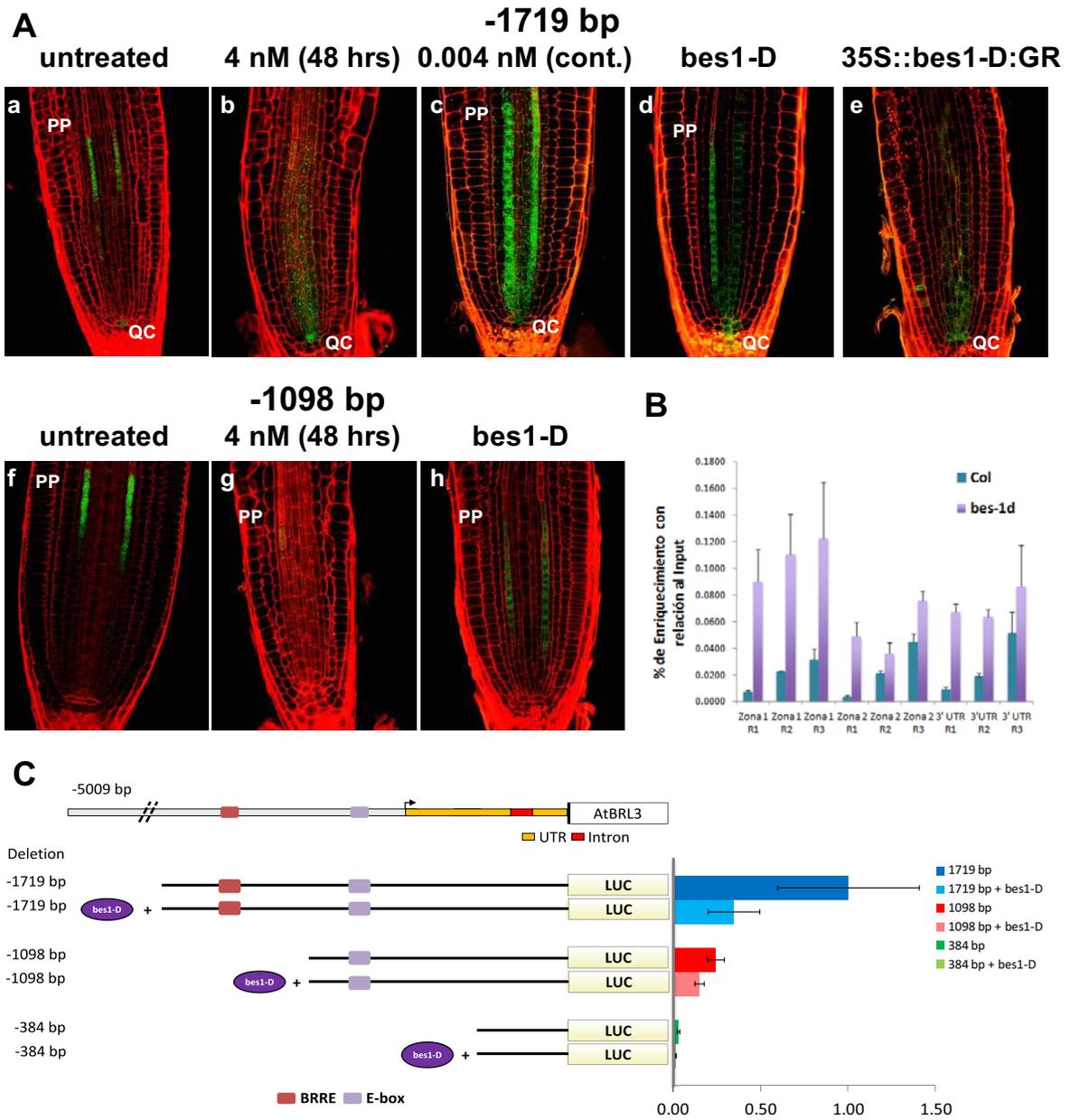


Figure 5.

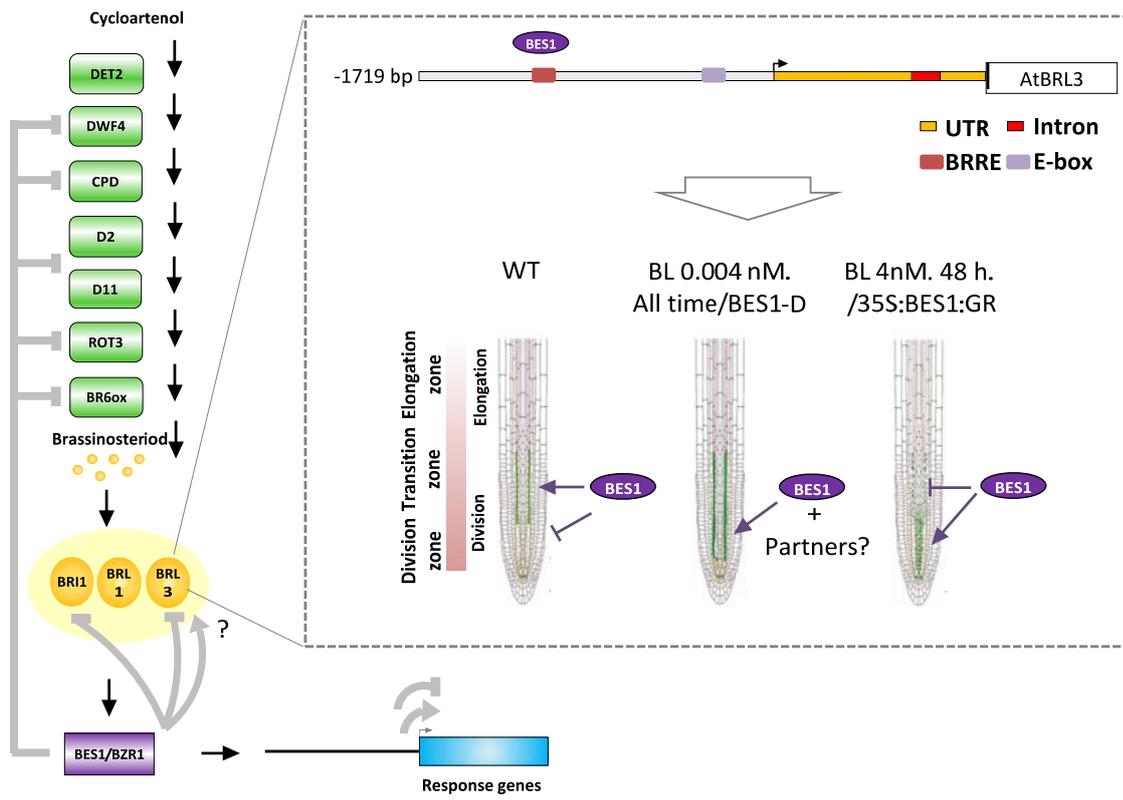
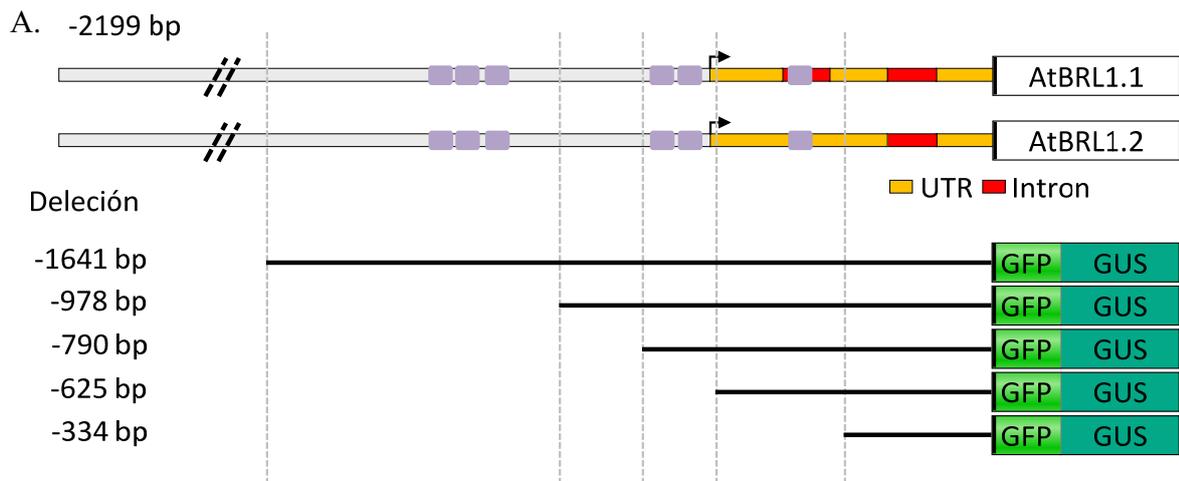


Figure S1



B.

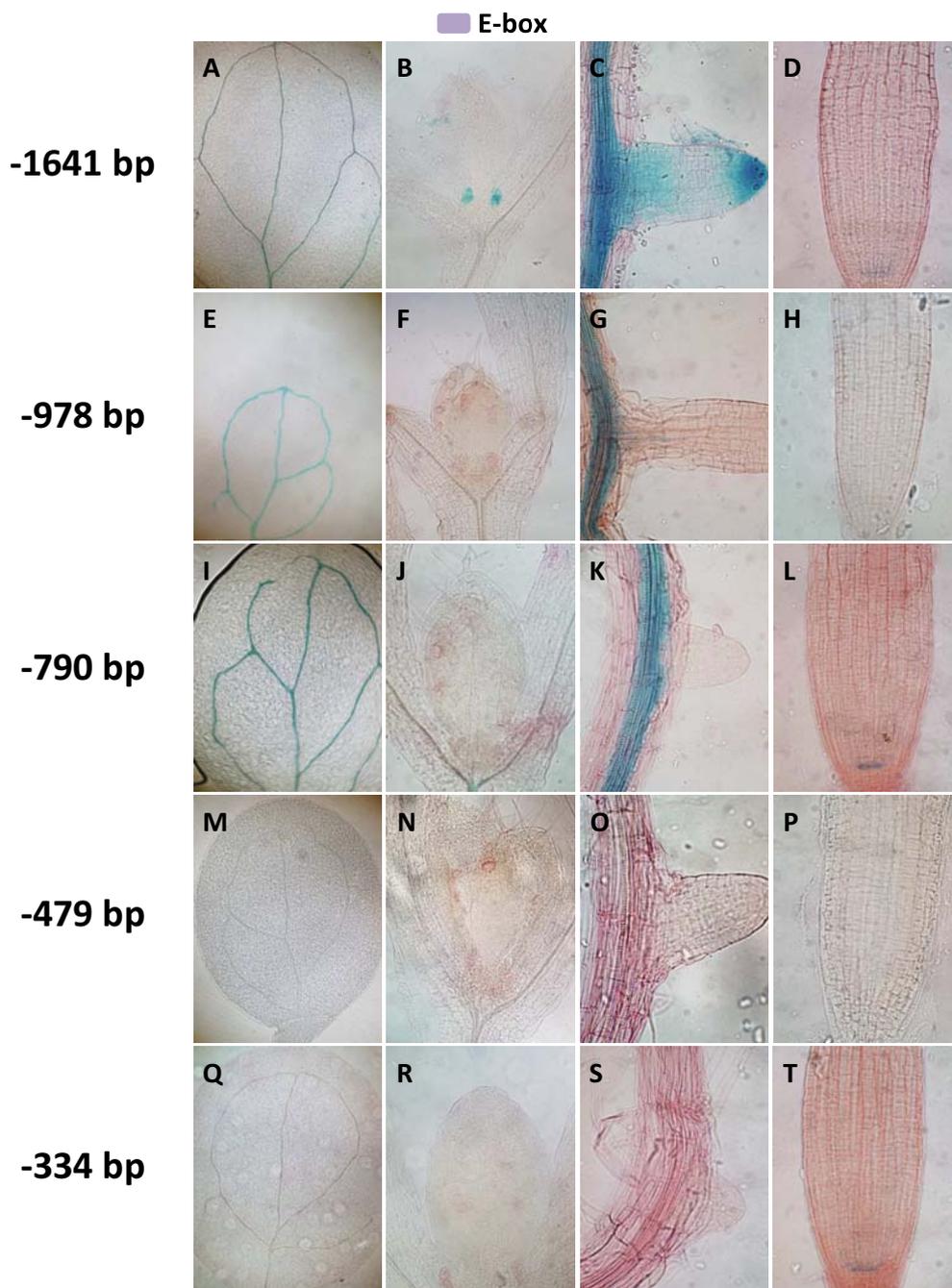


Figure S2

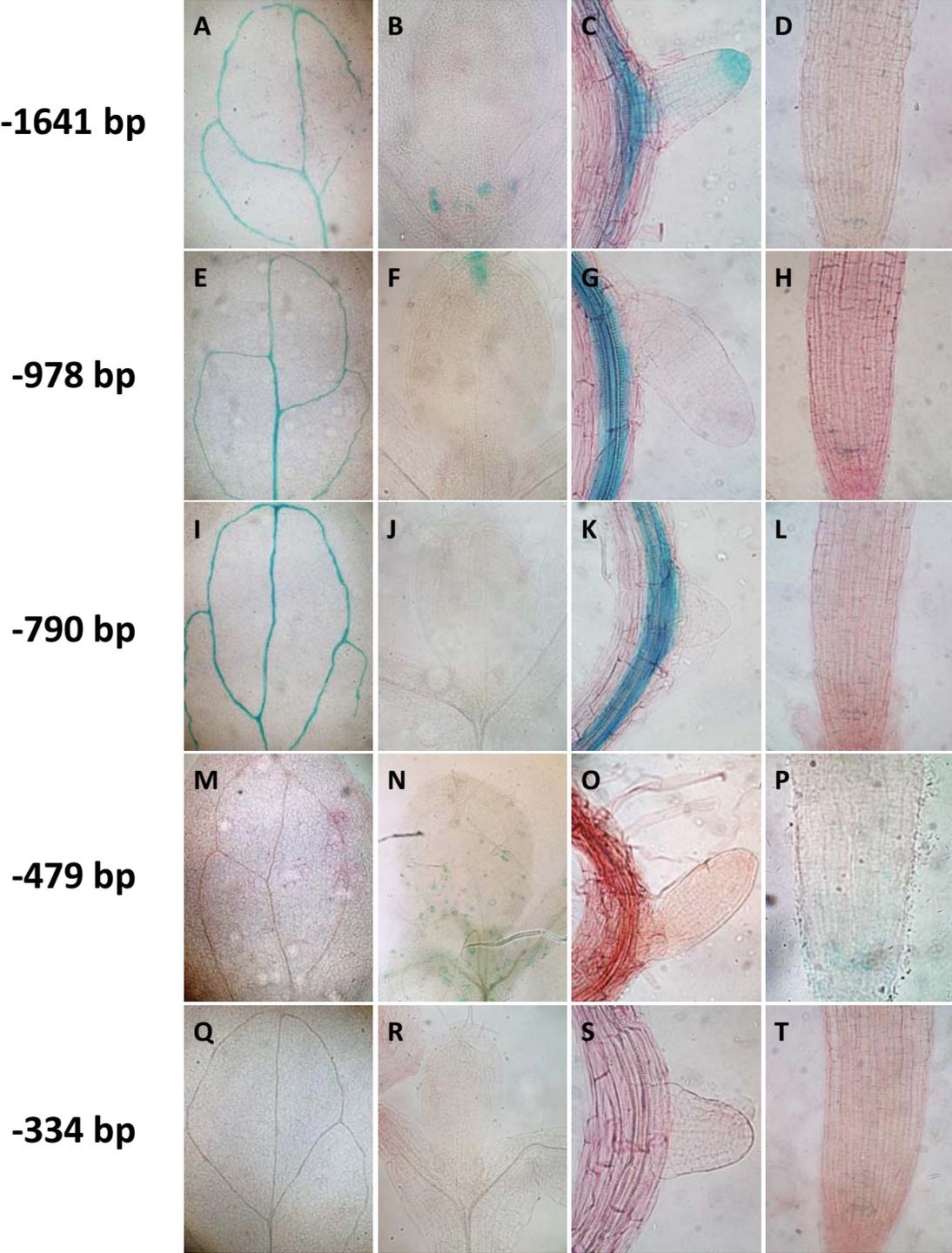
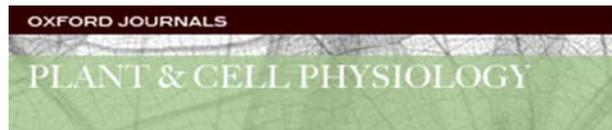


Table S1. Primer sequences used for construction of deletions from the BRL1 and BRL3 promoters.

Primer	sequence
JE pBRL1 AC 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> aaaatgctactttggc
JE pBRL1 5 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> catcaaccaagtaac
JE pBRL1 6 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> gtgacctcacttgcc
JE pBRL1 7 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> actcctcaattacgcaa
C pBRL1 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> agacaacctctgttgc
JE pBRL1(-26) 3'	<u>ggggaccactttgtacaagaaagctgggt</u> catttggcacagcaagag
JE pBRL3 0 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> cgtaggggattagttgctga
JE pBRL3 1 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> ggaaaccgaactat
JE pBRL3 2 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> gacgtagagtttga
JE pBRL3 3 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> acacgcttccttat
JE PBRL3 AC 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> gtctcatagttttgc
JE pBRL3 4 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> cttgaacaagacttg
A pBRL3 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> ggttccggatccgacc
B pBRL3 5'	<u>ggggacaagttgtacaaaaagcaggct</u> gagagacaacactgtcg
JE CompBRL3R1R2-3'	<u>ggggaccactttgtacaagaaagctgggt</u> cgttattagcccaaa

Underlines represent additional recognition sequence attB for recombination reaction.

Anexo2. AtMYB7, a new player in the regulation of UV-sunscreens in *Arabidopsis thaliana*.



**AtMYB7, a new player in the regulation of UV-sunscreens in
*Arabidopsis thaliana***

Journal:	<i>Plant and Cell Physiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fornalé, Silvia; Centre for Research in Agricultural Genomics, Plant Molecular Genetics Lopez, Eric; Centre for Research in Agricultural Genomics, Plant Molecular Genetics Salazar-Henao, Jorge; Centre for Research in Agricultural Genomics, Plant Molecular Genetics Rigau, joan; Centre for Research in Agricultural Genomics, Plant Molecular Genetics Caparros-Ruiz, David; Centre for Research in Agricultural Genomics, Plant Molecular Genetics
Keywords:	phenylpropanoids, R2R3-MYB factors, flavonoids, UV-sunscreens

Title: AtMYB7, a new player in the regulation of UV-sunscreens in *Arabidopsis thaliana*.

Running head: AtMYB7 and UV-sunscreens regulation in *A.thaliana*.

Corresponding author: Dr. D. Caparros-Ruiz

Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB

Edifici CRAG Campus de Bellaterra de la UAB

08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona (Spain)

Phone: +34-935636600

Fax: +34-935636601

e-mail: david.caparros@cragenomica.es

Subject areas:

- Growth and development
- Regulation of gene expression

Number of black and white figures: 3

Number of colour figures: 5

Supplementary material: 1 colour figure and 2 tables

Title: AtMYB7, a new player in the regulation of UV-sunscreens in *Arabidopsis thaliana*.

Running head: AtMYB7 and UV-sunscreens regulation in *A.thaliana*.

Authors: Silvia Fornalé, Eric Lopez, Jorge E. Salazar-Henao, Joan Rigau and David Caparros-Ruiz.

Address: Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB Edifici

CRAG Campus de Bellaterra de la UAB

08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona (Spain)

Phone: +34-935636600.

Fax: +34-935636601.

Abstract

The phenylpropanoid metabolic pathway provides a wide variety of essential compounds for plants. Together with sinapate esters, in *Brassicaceae* species, flavonoids play an important role in protecting plants against ultraviolet irradiation. Results: In this work we have characterized the *Arabidopsis thaliana* AtMYB7, the closest homolog of AtMYB4 and AtMYB32, described as repressors of different branches of the phenylpropanoid metabolism. The characterization of *atmyb7* plants revealed an induction of several genes involved in flavonols biosynthesis and increased amount of these compounds. In addition, the *AtMYB7* gene expression is repressed by AtMYB4. As a consequence, the *atmyb4* mutant plants present a reduction of flavonols contents, indicating once more that AtMYB7 represses flavonols biosynthesis. Our results also show that *AtMYB7* gene expression is induced by salt stress. The results obtained indicate that AtMYB7 is a repressor of flavonols biosynthesis and also lead us to propose AtMYB4 and AtMYB7 as part of the regulatory mechanism controlling the balance of the main *A. thaliana* UV-sunscreens.

Keywords: phenylpropanoids, R2R3-MYB factors, flavonoids, UV-sunscreens

Introduction

The phenylpropanoid metabolic pathway generates a wide variety of compounds that are essential for plants including lignin, flavonoids, and the brassicaceae-specific sinapate esters (Dixon et al., 2002; Milkowski and Strack, 2010; Vogt, 2010).

While lignin plays a structural function within the secondary cell walls (Vanholme et al., 2010), sinapate esters and flavonoids act as sunscreens that protect plants against the oxidative damage produced by the UV-B radiation (Li et al., 1993, Landry et al., 1995; Sheahan et al., 1996; Dixon and Pasinetti, 2010; Emiliani et al., 2013).

As both classes of compounds are produced by the phenylpropanoid pathway and plays similar functions, it is likely that a tight regulation of their levels occurs in *Arabidopsis thaliana*.

Thus, it can be hypothesized that the relative amount of each one of these compounds is the result of the balanced expression of several interacting regulators, as already suggested (Hemm et al., 2001, Dubos et al., 2010).

During the last years, many efforts have been addressed to understand how the phenylpropanoid pathway is regulated to precisely synthesize every phenolic compound and a mounting amount of evidences indicates that the family of R2R3-MYB transcription factors plays a key function in this regulation (Hemm et al., 2001; Bomal et al., 2008; Dubos et al., 2010; Zhong and Ye, 2009; Feller et al., 2011; Gray et al., 2012). This large family of transcriptional regulators can be divided into subgroups based on the presence of conserved motifs in the C-terminal domain (Stracke et al., 2001; Dubos et al., 2010) and several studies showed that the members of a same subgroup share similar functions. This is the case of subgroup 4, which clusters the only R2R3-MYB factors acting as transcriptional repressors of different branches of the phenylpropanoid metabolism (Jin et al., 2000; Tamagnone et al., 1998; Preston et al., 2004; Sonbol et al., 2009; Legay et al., 2010; Fornalé et al., 2006 and 2010).

In *A. thaliana*, the subgroup 4 is composed by four members: AtMYB3, AtMYB4, AtMYB7 and AtMYB32 (Dubos et al., 2010). AtMYB4 is involved in the repression of the sinapate esters biosynthesis (Jin et al., 2000) and AtMYB32 was characterized as a repressor of lignin biosynthesis specifically in pollen (Preston et al., 2004) but nothing is known about the function of AtMYB7, the closest AtMYB4 and AtMYB32 homolog. Therefore, we investigated the role of AtMYB7 in the regulation of the main branches of the phenylpropanoid biosynthesis. In this work, we characterized the roles of AtMYB7 and we showed that it is mainly involved in the repression of flavonol biosynthesis. In addition, *AtMYB7* gene expression is controlled, at least partially, by AtMYB4 and induced by salt stress conditions.

Results

The expression of AtMYB7 is controlled by AtMYB4

AtMYB7 is phylogenetically closely related to AtMYB4 and AtMYB32 (Stracke et al., 2001; Dubos et al., 2010). A previous *GUS*-reporter gene analysis indicated that *AtMYB32* is mainly expressed in anthers, stigma and lateral root primordia and is induced after wounding (Preston et al., 2004). To get a global picture of the gene expression on these MYB factors, we generated *A. thaliana* plants expressing *GUS* under the control of the *AtMYB7* and *AtMYB4* gene promoters respectively (Fig. 1). The results show that *AtMYB7* and *AtMYB4* are both expressed in root tissues (with the exception of the root tips) and rosette leaves and the expression of both factors decreases as leaves mature. The expression of *AtMYB7* in leaves is generally lower and more localized than the one of *AtMYB4*. In fact, the *AtMYB7* promoter drives the expression of *GUS* mainly in the vasculature, while *AtMYB4* is expressed throughout the leaf (Fig. 1). These two factors present a non-overlapping pattern of expression in flowers, being *AtMYB4* mainly detected in filaments and in the style, and *AtMYB7* exclusively in anthers (Fig. 1). In addition, the excised stems of plants expressing *GUS* under the control of *AtMYB4* and *AtMYB7* gene promoter show that *AtMYB4*, but not *AtMYB7*, is induced by wounding (Fig. 1).

As *AtMYB7* is naturally expressed at a low level in near all the tissues in which *AtMYB4* is also expressed, we investigated whether *AtMYB4* controls the expression of *AtMYB7*. Thus, we followed the expression of *AtMYB7* into the *atmyb4* mutant background and vice versa both by *GUS*-gene reporter analyses and endogenous gene expression analyses (Fig. 2). The results show that in the absence of *AtMYB4*, the expression of *AtMYB7* is induced and can be detected throughout the leaf, while the expression of *AtMYB4* is not modified by the absence of *AtMYB7* (Fig. 2).

AtMYB7 represses flavonol biosynthesis

Both *AtMYB4* and *AtMYB32* have been described as transcriptional repressors of the phenylpropanoid pathway. The characterization of the *atmyb4* mutant led to demonstrate that *AtMYB4* acts as a main repressor of sinapate esters (Jin et al., 2000), while the characterization of *atmyb32* mutant plants showed that *AtMYB32* regulates the synthesis of lignin in pollen (Preston et al., 2004).

Thus, to study whether *AtMYB7* regulates the phenylpropanoid pathway, we characterized an *atmyb7* T-DNA insertion mutant and we studied the effect on the synthesis and accumulation of lignin and flavonoids, the two main end-products of this metabolic route.

As in the case of *atmyb4* and *atmyb32* plants, no obvious changes were observed in the phenotype of *atmyb7* plants, and the expression analysis of the main lignin genes did not show changes compared to wild-type stems. In agreement with these data, the distribution of lignin was not significantly altered in mutant stems (Fig. 3) and the determination of lignin content and of its composition (S/G ratio) did not indicate changes in respect to control plants (Fig. 3).

The expression analysis of the main flavonoid biosynthetic genes in rosette leaves from *atmyb7* and wild-type plants indicated that the lack of *AtMYB7* produces an increase in the expression of two early-phenylpropanoid genes, *C4H* and *4CL* and of two flavonoid specific genes, *F3'H* and *DFR* (Fig. 4). These changes are in line with the 2-fold increase of flavonols that can be detected in *atmyb7* rosettes (Fig. 5) and suggest that *AtMYB7* acts as a repressor of flavonols. On the other hand a 30% decrease of

anthocyanins is observed in mutant plants, while the amount of soluble phenolics does not change significantly compared to control plants (Fig. 5).

In *A. thaliana*, flavonols acts as UV-sunscreens together with sinapate esters and both class of compounds are synthesized through the phenylpropanoid pathway. Thus, to study if the higher flavonoid content of *atmyb7* plants influences the synthesis of sinapate esters, we also analyzed the expression of their main biosynthetic genes. The results indicate that *ALDH* is clearly repressed in *atmyb7* rosettes, while the expression of *SGT* is induced (Fig. 6)

The function of AtMYB4 and AtMYB7 is not redundant

AtMYB4 acts as a negative regulator of sinapate ester synthesis (Jin et al., 2000) and possibly of AtMYB7, which in turn seems to repress the synthesis of flavonols. To better define the interactions between these two factors, we generated *atmyb7 x atmyb4* double mutant plants and we studied the effects on the biosynthesis of flavonoids and sinapate esters. These double mutant plants do not show phenotypic alterations (supplementary file 1) and our results indicate that the lack of both MYB factors induces the expression of all the genes whose expression is induced in *atmyb7* rosettes (Fig. 4). In addition, *atmyb7 x atmyb4* rosettes display an increase in flavonols similar to that of *atmyb7* plants, making unlikely the occurrence of a functional redundancy between AtMYB7 and AtMYB4 and confirming the specific role of AtMYB7 as a repressor of flavonol synthesis (Fig. 5). The quantification of soluble phenolics in *atmyb7 x atmyb4* rosette leaves show no difference compared to wild-type plants, while anthocyanins levels are higher in the absence of both MYB factors (Fig. 5).

The lack of AtMYB4 increases the levels of sinapate esters (Jin et al., 2000) and our results indicate that this also lead to the up-regulation of *AtMYB7* (Fig. 2). To study the effect on the accumulation of flavonoids, we also determined their levels in *atmyb4* and wild-type rosette leaves. The reduced levels of flavonols in *atmyb4* mutant plants indicate once more that AtMYB7 acts a transcriptional repressor of

these compounds (Fig. 5). On the other hand, anthocyanins are slightly increased in *atmyb4* leaves, while the total soluble phenolics content is not significantly altered (Fig. 5).

To deepen in the study of the interactions between AtMYB7 and AtMYB4 we also analyzed the expression of the main genes involved in the synthesis of sinapate esters both in *atmyb7* and *atmyb7 x atmyb4* leaves. The lack of *AtMYB7* gene expression reduces the transcript levels of the *ALDH* gene but its expression is restored to wild-type levels in the double *atmyb7 x atmyb4* mutant plants (Fig. 6), in accordance with the specific function of AtMYB4 as a repressor of the synthesis of sinapate esters.

Finally, as *atmyb7* plants do not display changes in the synthesis of lignin (Fig. 3) we analyzed stems from *atmyb7 x atmyb4* plants to study if AtMYB4 plays a role in the regulation of this branch of the phenylpropanoid pathway. The lack of alterations of both lignin content and composition indicates that AtMYB4 is not directly involved in the regulation of lignin synthesis (Fig. 3).

AtMYB7 is induced by salt stress conditions

The data obtained indicate that AtMYB7 acts as a repressor of flavonol synthesis and that its function is at least partially controlled by AtMYB4. To better define the physiological role of AtMYB7, additional experiments were undertaken to identify additional factors that influences its gene expression. The *in silico* analysis of *AtMYB7* gene expression pattern (Arabidopsis eFP Browser, <http://bar.utoronto.ca>) revealed that it can be induced under abiotic stress conditions such as salt stress. Thus we supplied wild-type, *atmyb7* and *atmyb4* plants with NaCl during 4 hours and we studied the response of these two factors to this treatment. Under these experimental conditions, we observed a clear induction of *AtMYB7* both in wild-type and *atmyb4* plants, while *AtMYB4* gene expression remains unchanged in wild-type and *atmyb7* plants (Fig. 7). These data indicate that the salt-response of *AtMYB7* is independent from AtMYB4 as the induction occurs both in presence or absence of this repressor.

Discussion

Plant R2R3-MYB proteins are major regulators of the phenylpropanoid metabolism and their classification according to the presence of conserved domains allowed the identification of 22 subgroups in *A. thaliana* (Kranz et al., 1998; Stracke et al., 2001). An increasing amount of data indicates that MYB factors belonging to the same subgroup share a degree of functional conservation. This is the case of subgroup 4, which comprises AtMYB4 and AtMYB32 that act as transcriptional repressors (Jin et al., 2000; Preston et al., 2004). Thus, AtMYB4 was shown to control the synthesis of sinapate esters in a UV-dependent fashion by repressing the gene encoding C4H (Jin et al., 2000) while AtMYB32 regulates the synthesis of lignin in the pollen (Preston et al., 2004). Two other MYB factors are clustered within this subgroup: AtMYB3 and AtMYB7 and to date, no functional data are known on the physiological role of these regulators.

The phylogenetic analysis of the subgroup 4 R2R3-MYB proteins revealed that AtMYB7 is the closest one to the already characterized AtMYB4 and AtMYB32 (Dubos et al., 2010) and in this work we undertook its characterization to unravel its function in *A.thaliana*.

The GUS-reporter gene analysis indicated that *AtMYB7* is mainly expressed in roots and in anthers, while in rosettes it is mainly detected in leaf vasculature (Fig. 1). This expression pattern is similar to that of *AtMYB4* but comparatively weaker. Previous studies showed that *AtMYB32* is strongly expressed in root primordia (Preston et al., 2004) but this is not the case of both *AtMYB7* and *AtMYB4*.

The lack of AtMYB4 induces the expression of *AtMYB7* in tissues where normally it is not detected. Thus, it is likely that AtMYB4 limits the expression pattern of *AtMYB7*. A direct interaction of AtMYB4 with the *AtMYB7* gene promoter is not excluded due to the presence of several *cis*-elements typically recognized by MYB factors (data not shown) in the *AtMYB7* gene promoter.

The characterization of *atmyb7* and *atmyb7 x atmyb4* mutant plants makes unlikely a role of both AtMYB7 and AtMYB4 in the synthesis of lignin. The higher flavonol levels of *atmyb7* plants indicate a function of

AtMYB7 in the regulation of this branch of the phenylpropanoid pathway. In addition, the comparison of the flavonoid profiles of *atmyb7*, *atmyb4* and *atmyb7 x atmyb4* mutants suggests that the function of AtMYB7 on flavonol synthesis is specific, as the lack of AtMYB4 in the double *atmyb7 x atmyb4* does not modify the higher levels detected in the *atmyb7* single mutant.

At the molecular level, the lack of *atmyb7* induces the expression of several genes involved in the synthesis of flavonoids such as the early-phenylpropanoid genes *C4H* and *4CL1* and the specific flavonoid genes *F3'H*, *DFR* and *UGT*. The same pattern of up-regulation is found in *atmyb7 x atmyb4* plants and this reinforces the idea that the role of AtMYB7 on this branch of the phenylpropanoid pathway is not redundant with the one of AtMYB4.

The *atmyb4* mutants accumulate sinapate esters (Jin et al., 2000) and in this work we showed that in these plants, flavonols are reduced (Fig. 5). This effect is in line with the induction of *AtMYB7* expression that takes place in the absence of AtMYB4 (Fig. 2) and leads to hypothesize that this metabolic balance between the two main *A. thaliana* UV-protecting sunscreens would be regulated by AtMYB4 and AtMYB7 (Fig. 8).

Our results show that *AtMYB7* gene expression is induced by salt treatment. This is in agreement with previous results showing that R2R3-MYB factors can play a role in the synthesis of flavonols that takes place in response to this abiotic stress (Fini et al., 2011). Flavonols act as antioxidants against the reactive oxygen species generated by salt stress (Hong et al., 2009). Therefore, AtMYB7 can be proposed as a component of the regulatory network that controls the response to salt stress. In contrast, the gene expression of *AtMYB4* is not altered by salt stress, suggesting once more that the main function of this factor is the regulation of sinapate-esters.

The role of AtMYB7 as a repressor of flavonols biosynthesis provides an example of functional divergence within the members of the same subgroup 4 of the R2R3-MYB family. The duplication of these factors during the evolution led to a divergence of their function in the regulation of the different branches of the phenylpropanoid pathway (Feller et al., 2011). Thus, while AtMYB4 evolved to regulate sinapate esters biosynthesis and AtMYB32 to control lignin biosynthesis in pollen, in this work we have shown that

AtMYB7 has evolved to repress flavonols biosynthesis. In addition, the regulation of AtMYB7 gene expression by AtMYB4, lead us to propose the existence of a functional interplay between these two closely related factors to control the balance of the main *A. thaliana* UV-sunscreens.

Methods

Plant material

A. thaliana atmyb7 (ecotype Columbia) T-DNA mutant seeds were obtained from the SALK collection (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) and *atmyb4* (ecotype Landsberg erecta) mutant seeds from transposon GENETRAP collection (<http://genetrapp.cshl.edu>). The double mutant *atmyb7 x atmyb4* was obtained by cross-pollination of the homozygous single mutants. The segregation of the mutant alleles was followed by genotyping the offspring until the double homozygous plant was obtained. The primers used for the screening of single and double mutants are listed in Supplementary data 2.

For the in vitro culture, surface sterilized *A. thaliana* wild type and mutant seeds were sown on MS solid medium (Murashige and Skoog, 1962) kept for 2 days at 4°C in the dark and then transferred to a growth chamber with a 16 h light period at 22°C. For the greenhouse culture, seeds were grown under standard condition (25°C day and 22°C night with 50% humidity) with a 16/8 h photoperiod of natural and supplemented light.

Once harvested, plant material was immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C for the following biochemical and molecular analyses, or immediately used as fresh material for the histochemical studies.

Histology and lignin analysis

Hand-cross sections were prepared from the basal part of inflorescence stems, stained with the Wiesner solution (1% phloroglucinol in ethanol: 37% HCl 1/1) and immediately observed under light microscopy.

Lignin content and composition were determined in mature stems of mutants and wild-type plants. Thioacidolysis and GC were used to determine lignin composition according to the method published by Lapierre et al., (1986) and lignin content was determined by derivatization with thioglycolic acid (Withmore, 1978).

Constructions and RT-PCR

2 Kb of *AtMYB7* and *AtMYB4* gene promoters (pATMYB7 and pATMYB4) were fused to the β -glucuronidase (*GUS*) coding sequence using the pHGWF57 vector (Karimi et al., 2002). The resulting pATMYB7::*GUS* and pATMYB4::*GUS* constructs were then transferred by floral dip (Clough and Bent, 1998) to *A. thaliana* wild-type, *atmyb7* and *atmyb4* mutant plants. The primer sequences used to clone both promoters are shown in Supplementary data 2.

Total RNA was extracted with Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Approximately 1.5 μ g of total RNA were reverse-transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. First-strand cDNA was generated using an oligo(dT)15 primer, and 2 μ l of the first-strand cDNA used as a template in subsequent PCR reactions. Gene-specific primers were used to amplify *AtMYB7*, *AtMYB4* and all the main phenylpropanoid biosynthetic genes (Supplementary data 3) and actin was used for data normalization. To confirm the absence of genomic DNA contamination, "no-RT" PCR assays were run.

β -Glucuronidase (GUS) staining

Histochemical staining for GUS activity in transgenic plants was performed as described previously (Jefferson et al., 1987) with minor modifications. Seedlings grown in vitro on MS plates for 10 days,

rosettes or flowering plants were harvested and immediately immersed in the reaction solution composed by 1mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-glucuronic acid, 50mM sodium phosphate, 2 mM ferricyanide, 2 mM ferrocyanide, and 0.2% Triton X-100, pH 7.0. After 5 min of vacuum infiltration, samples were incubated overnight at 37°C. Serial washes of 30 min each were then performed with increasing concentrations of ethanol (from 20% to 70%) and pictures of the stained tissues were taken with a stereomicroscope.

Salt treatments

Wild-type, *atmyb7* and *atmyb4* mutant plants grown in vitro for two weeks were transferred to a liquid MS medium containing 150 mM NaCl during 4 hours. For each treatment, the corresponding control was prepared incubating seedlings in MS liquid medium for the same time. After this time period, whole plants were collected and immediately frozen with liquid nitrogen.

Quantification of flavonoids and soluble phenolics

Total flavonols were determined according to Chang et al., (2002). Leaf tissues were extracted in 80% methanol at 4°C for two hours. After centrifugation, aliquots of supernatant were taken to 2 mL with methanol and sequentially mixed with 0.1 mL aluminium chloride (10% water solution), 0.1ml K-acetate 1M and 2.8 ml distilled water. After 30 min incubation at room temperature, absorbance at 415 nm was recorded. Flavonol content was quantified as equivalents of rutin used as standard.

Total anthocyanins were determined according to Laitinen et al. (2008). Leaf tissues (100 mg) were extracted with 1 ml of extraction solvent (methanol, water, hydrochloric acid, 7:2:1) at 4°C for 20h and centrifuged (20 min, 10000 rpm, 4°C). The absorbance of the supernatants was measured at 530 nm and the anthocyanin content was quantified as equivalents of cyanidine chloride used as standard.

Total phenolics were determined using a modified Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton and Rossi, 1965). Fresh leaf tissue (100 mg) was extracted in 1 ml ethanol (80%), incubated 2h at 4°C in the dark and then centrifuged to remove cell debris. Aliquots of supernatant were made up to a volume of 3 ml with distilled water. Then 0.5 ml Folin Ciocalteu reagent (1:1 with water) and 2 ml of Na₂CO₃ (20%) were added. The solution was warmed 15 min at 45°C, cooled to room temperature and the absorbance was measured at 650 nm. Phenolics were quantified as equivalents of gallic acid used as standard.

Funding

This work was supported by the Spanish “Ministerio de Economía y Competitividad” (AGL2011-30545-C02-01 to D.C.-R.). This work received financial support from the CONSOLIDER-INGENIO program (CSD2007-00036) from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. This work was carried out within the framework of the “Xarxa de Referència de Biotecnologia” (XarBa) from the Autonomous Government of Catalonia. J.E.S. was granted by AGAUR (2008FI-B 00399) from the Autonomous Government of Catalonia and by a contract from CRAG.

Disclosures

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We are indebted to Nuria Mir, Yasin Torres and Pedro Fernandez for technical support and helpful comments.

References

Bomal, C., Bedon, F., Caron, S., Mansfield, S.D., Levasseur, C., Cooke, J.E.K., Blais, S., Tremblay, L., Morency, M.J. and Pavy, N. (2008) Involvement of *Pinus taeda* MYB1 and MYB8 in phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biogenesis: a comparative in planta analysis. *J. Exp. Bot.* 59: 3925–3939.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178–182.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. thaliana*. *Plant J.* 16: 735–743.

Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.S. and Wang, L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3: 371–390.

Dixon, R.A. and Pasinetti, G.M. (2010) Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiol.* 154: 453–457.

Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L. (2010) MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 15: 573–81.

Emiliani, J., Grotewold, E., Falcone Ferreyra, M.L. and Casati, P. (2013) Flavonols protect arabidopsis plants against UV-B deleterious effects. *Mol. Plant* 6: 1376–1379.

Feller, A., Machemer, K., Braun, E.L. and Grotewold, E. (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* 66: 94-116.

Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F. and Tattini, M. (2011) Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signal. Behav.* 6: 709-711.

Fornalé, S., Sonbol, F.M., Maes, T., Capellades, M., Puigdomènech, P., Rigau, J. and Caparrós-Ruiz, D. (2006) Down-regulation of the maize and *Arabidopsis thaliana* caffeic acid O-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors. *Plant Mol. Biol.* 62: 809-823.

Fornalé, S., Shi, X., Chai, C., Encina, A., Irar, S., Capellades, M., Fuguet, E., Torres, J.L., Rovira, P., Puigdomènech, P., Rigau, J., Grotewold, E., Gray, J. and Caparrós-Ruiz, D. (2010) ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J.* 64: 633-644.

Gray, J., Caparros-Ruiz, D. and Grotewold, E. (2012) Grass phenylpropanoids: regulate before using! *Plant Sci.*, 184: 112-120.

Hemm, M.R., Herrmann, K.M. and Chapple, C. (2001) AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. *Trends Plant Sci.* 6: 135-136.

Hong, C.Y., Chao, Y.Y., Yang, M.Y., Cheng, S.Y., Cho, S.C. and Kao, C.H. (2009) NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. *Plant Soil* 320: 103–115.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, J.J., Tonelli, C., Weisshaar, B. and Martin, C. (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 19: 6150-6161.

Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A. (2002) Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7: 193-195.

Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. and Weisshaar, B. (1998) Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 263-276.

Laitinen, R.A.E., Ainasoja, M., Broholm, S.K., Teeri, T.H. and Elomaa, P. (2008) Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. *J. Exp. Bot.* 59: 3691-3703.

Landry, L.G., Chapple, C.C.S. and Last, R.L. (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolics sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Phys.* 109: 1159-1166.

Lapierre, C., Rolando, C. and Monties, B. (1986) Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl syringyl fractions. *Holzforschung* 40: 113-118.

Legay, S., Lacombe, E., Goicoechea, M., Brière, C., Séguin, A., Mackay, J. and Grima-Pettenati, J. (2007) Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Sci.* 173: 542-549.

Li, J.Y., Oulee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179.

Milkowski, C. and Strack, D. (2010) Sinapate esters in brassicaceous plants: biochemistry, molecular biology, evolution and metabolic engineering. *Planta* 232: 19-35.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Preston, J., Wheeler, J., Hazlewood, J., Li, S.F. and Parish, R.W. (2004) AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 40: 979-995.

Sheahan, J.J. (1996) Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *Am. J. Bot.* 83: 679-686.

Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.

Sonbol, F.M., Fornalé, S., Capellades, M., Encina, A., Touriño, S., Torres, J.L., Rovira, P., Ruel, K., Puigdomènech, P., Rigau, J. and Caparrós-Ruiz, D. (2009) The maize ZmMYB42 represses the phenylpropanoid pathway and affects the cell wall structure, composition and degradability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 70: 283-296.

Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B. (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 447-456.

Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K., Martin, C. (1998) The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* 10: 135-154.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 153: 895–905.

Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3: 2-20.

Withmore, F.W. (1978) Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochemistry* 17: 421-425.

Zhong, R. and Ye, Z.H. (2009) Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal. Behav.* 4: 1028-1034.

Figure Legends

Fig 1 Expression pattern of AtMYB7 and AtMYB4. Arabidopsis plants expressing GUS reporter gene under the control of the *AtMYB7* gene promoter (left panel) or *AtMYB4* gene promoter (right panel). (A) Detail of a rosette leaf from ten days-old seedling. (B) Whole seedling. (C) Detail of apical root from ten days-old seedling. (D) Rosette leaves from three weeks-old plants (E) florets (F) Silique. (G) Stalk. Arrows refer to excision points

Fig 2 Expression pattern of AtMYB7 and AtMYB4 in *atmyb4* and *atmyb7* mutant backgrounds. (A) Arabidopsis plants expressing GUS under the control of the *AtMYB7* gene promoter in *atmyb4* mutant background (left panel) and Arabidopsis plants expressing GUS under the control of the *AtMYB4* gene

promoter in *atmyb7* mutant background (right panel). (B) Relative expression levels of *AtMYB7* and *AtMYB4* in wild type and *atmyb7* and *atmyb4* mutant plants.

Fig 3 Lignin biosynthesis is not repressed by AtMYB7. (A) Relative expression levels of all the monolignol biosynthetic genes in wild type and *atmyb7* bolting stems: *PAL*, *phenylalanine ammonia-lyase*; *C4H*, *cinnamate 4-hydroxylase*; *4CL*, *4-coumarate-CoA ligase*; *CCR*, *cinnamoyl-CoA reductase*; *CAD*, *cinnamyl alcohol dehydrogenase*; *HCT*, *hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase*; *C3H*, *4-coumarate 3-hydroxylase*; *COMT*, *caffeic acid o-methyltransferase*; *CCoAOMT*, *caffeoyl-CoA o-methyltransferase*; *F5H*, *ferulate-5-hydroxylase*. (B) Phloroglucinol staining of mature wild type and *atmyb7* stems. (C) Quantification of total lignin content by thioglycolate acid method and S to G ratio in stems of wild type, *atmyb7* and *atmyb7* x *atmyb4* plants.

Fig 4 AtMYB7 regulates genes involved in the biosynthesis of flavonoids. Gene expression analysis of genes involved in flavonoids biosynthesis in *atmyb7* and *atmyb7* x *atmyb4* rosette leaves. The flavonoid biosynthetic pathway. *CHS*, *chalcone synthase*; *CHI*, *chalcone isomerase*; *F3H*, *flavanone 3-hydroxylase*; *F3'H*, *flavonoids 3'-hydroxylase*; *FLS*, *flavonol synthase*; *UGTs*, *UDP sugar glycosyltransferases*; *DFR*, *dihydroflavonol reductase*. Asterisks refer to genes induced in the absence of AtMYB7.

Fig 5 Soluble phenolics, flavonoids and anthocyanins quantification in wild type, *atmyb7*, *atmyb4* and *atmyb7* x *atmyb4* plants. Soluble phenolics, flavonols and anthocyanins are expressed as equivalents of gallic acid, rutin and cyanidine chloride, respectively. Data are the mean of three replicates \pm standard deviation.

Fig 6 Sinapate esters biosynthetic genes are not regulated by AtMYB7. Gene expression analyses of sinapate esters biosynthetic genes in wild type, *atmyb7* and *atmyb7* x *atmyb4* plants. Sinapate-ester biosynthesis: *ALDH*, aldehyde dehydrogenase; *SGT*, sinapate UDP-glucose sinapoyltransferase; *SMT*, sinapoylglucose malate sinapoyltransferase.

Fig 7 AtMYB7 is induced by salt. Relative expression levels of *AtMYB7* and *AtMYB4* in wild type and *atmyb7* and *atmyb4* mutant plants treated with salt.

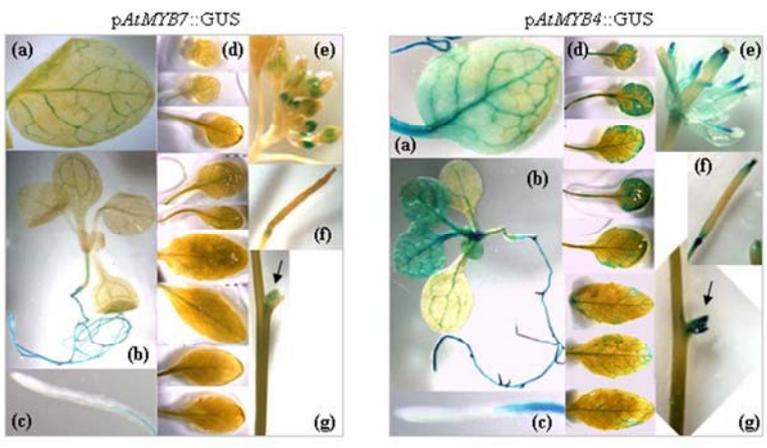
Fig 8 Schematic representation of AtMYB7 and AtMYB4 function. Wild type conditions are shown as grey ovals while mutant conditions are shown as dotted white ovals. Increased or decreased levels of flavonols and/or sinapate esters are shown in capital letters or lower case letters, respectively.

Supplementary files

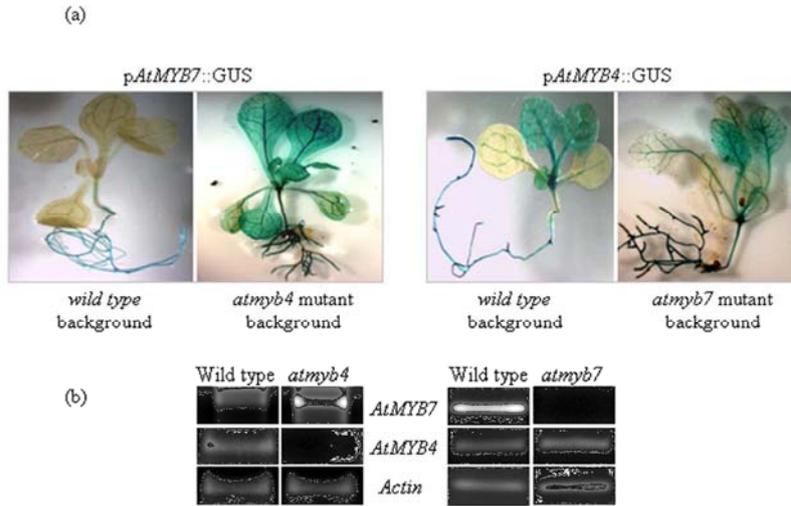
Supplementary file 1: Macroscopic phenotype of *atmyb7* and *atmyb7* x *atmyb4* mutant adult plants and rosettes.

Supplementary file 2: Sequence of primers used to genotype *atmyb7*, *atmyb4* and *atmy7* x *atmyb4* mutant plants.

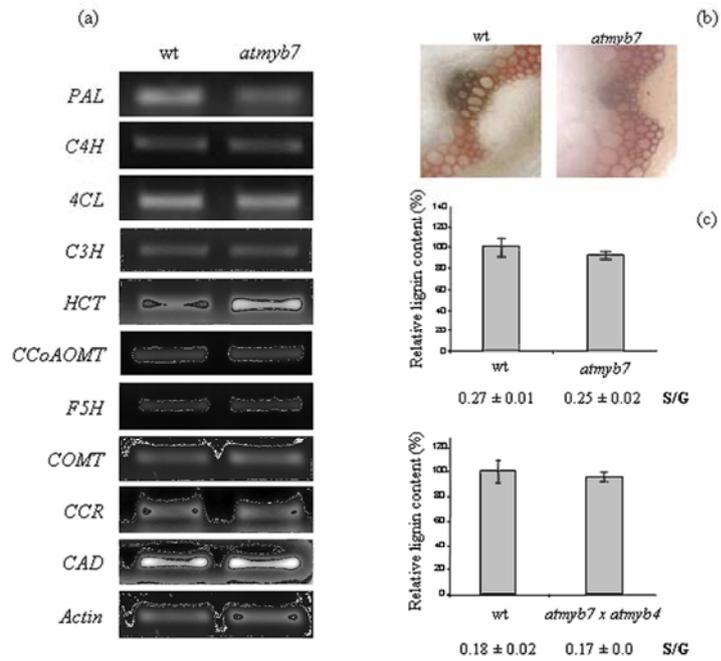
Supplementary file 3: Sequence of primers used for gene expression analyses in *atmyb7* and *atmy7* x *atmyb4* mutant plants.



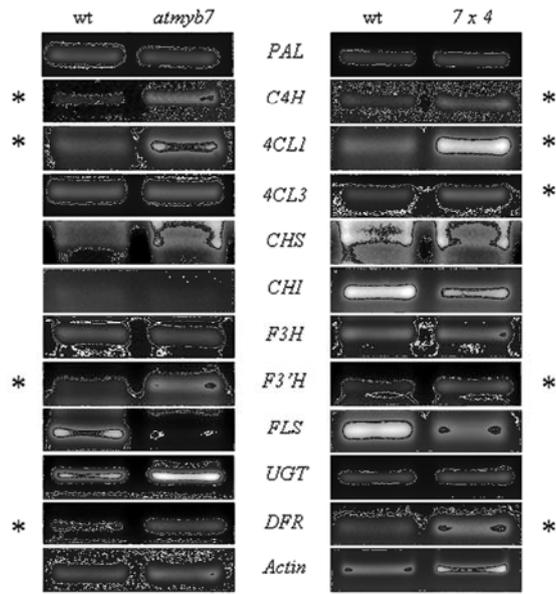
190x254mm (96 x 96 DPI)



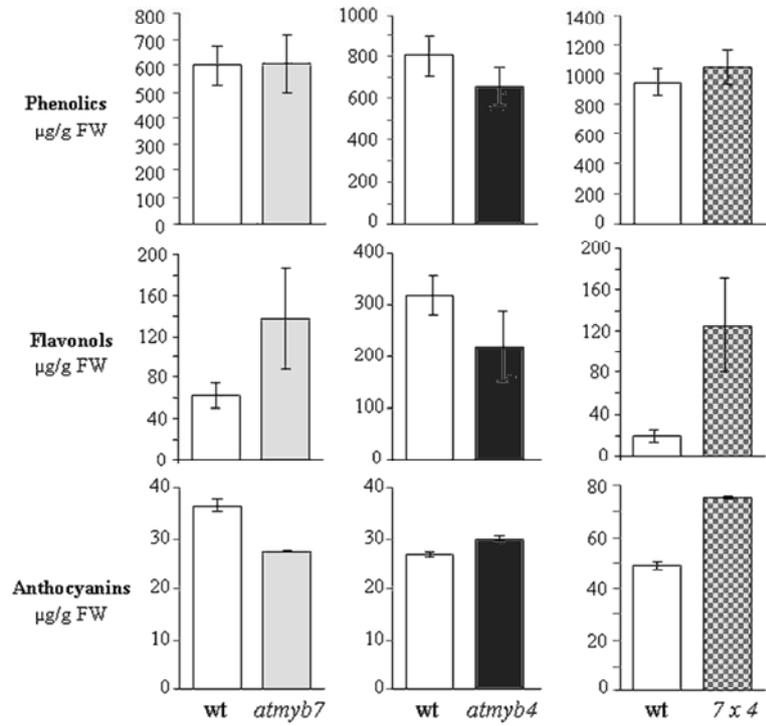
190x254mm (96 x 96 DPI)



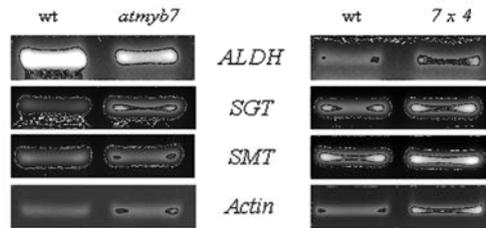
190x254mm (96 x 96 DPI)



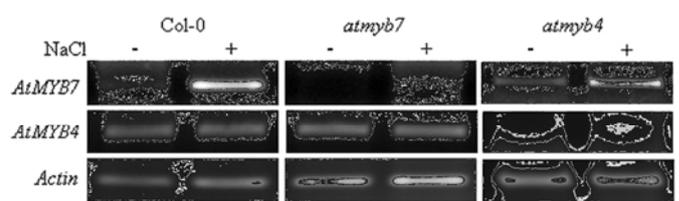
190x254mm (96 x 96 DPI)



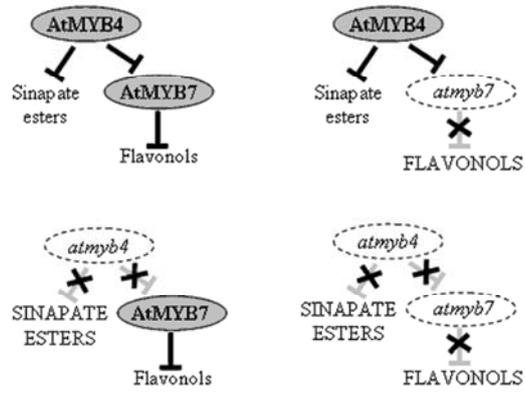
190x254mm (96 x 96 DPI)



190x254mm (96 x 96 DPI)



190x254mm (96 x 96 DPI)



190x254mm (96 x 96 DPI)

Anexo 3. Material suplementario capítulo 3.

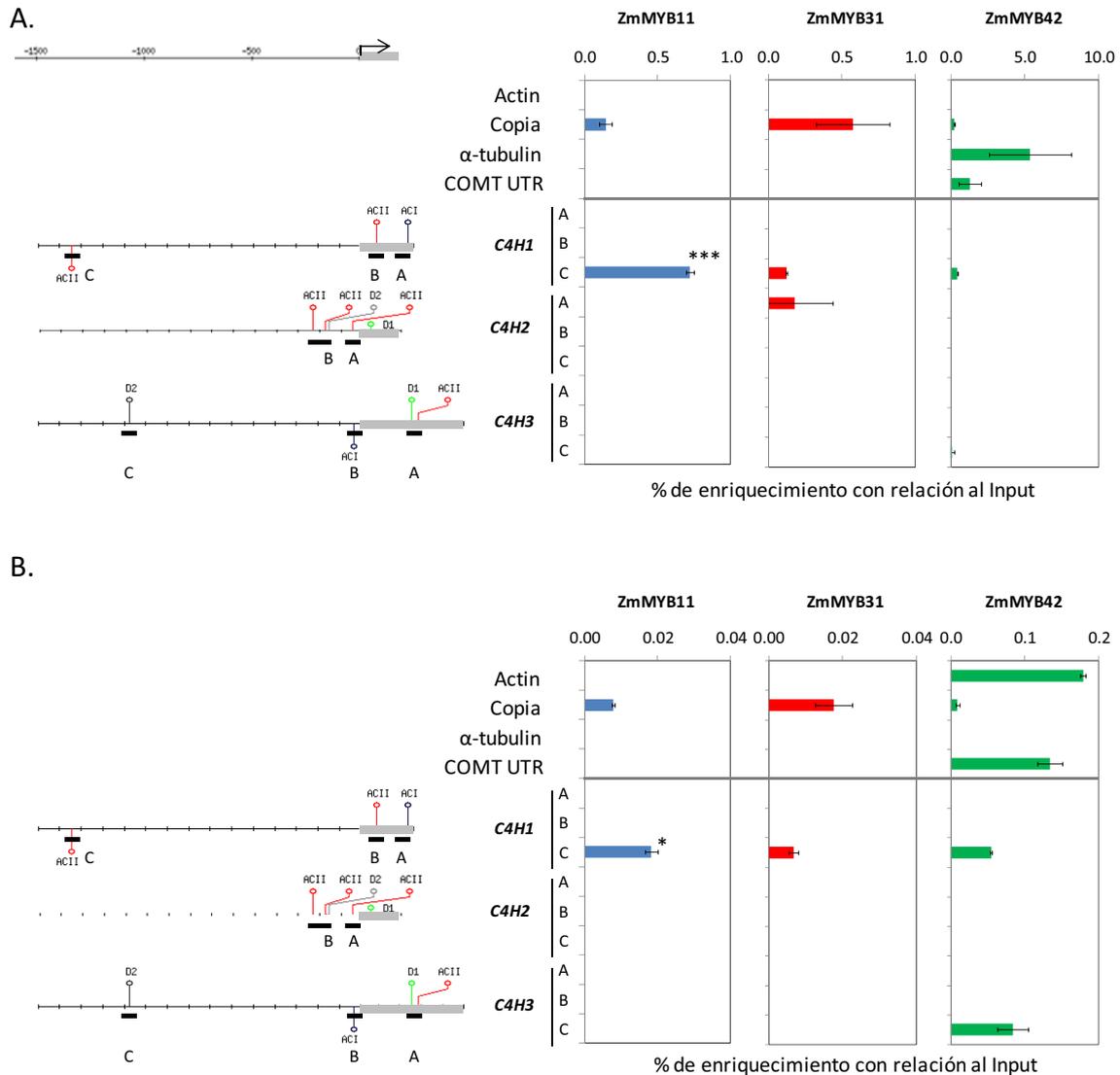
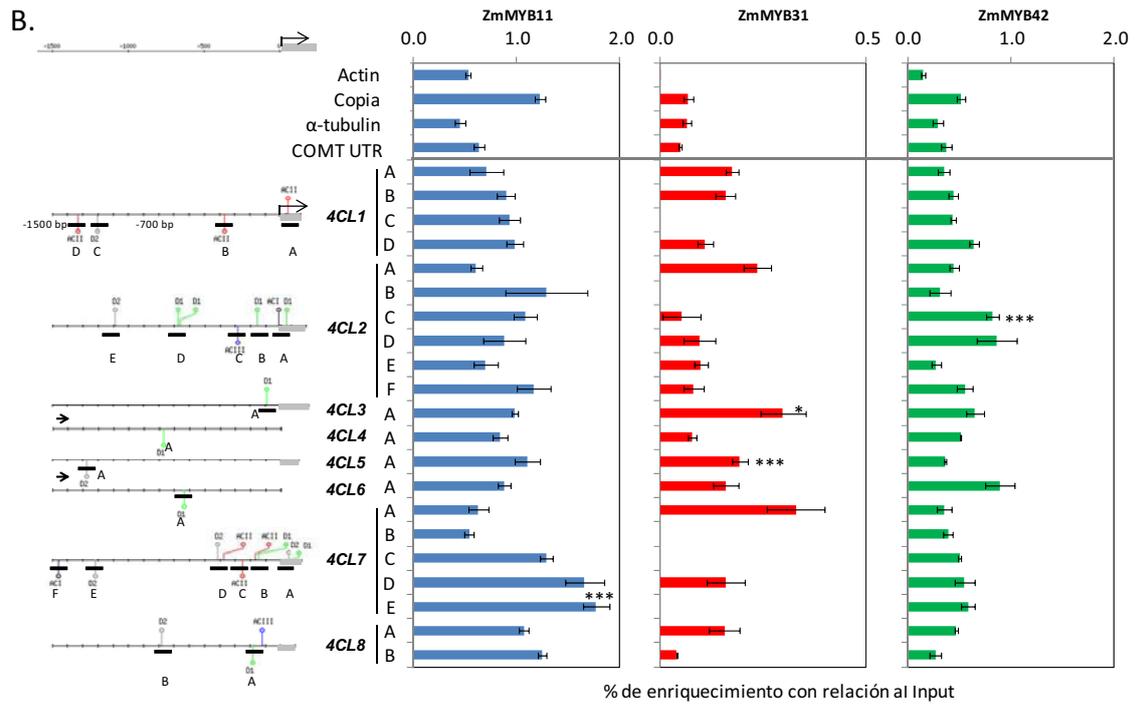
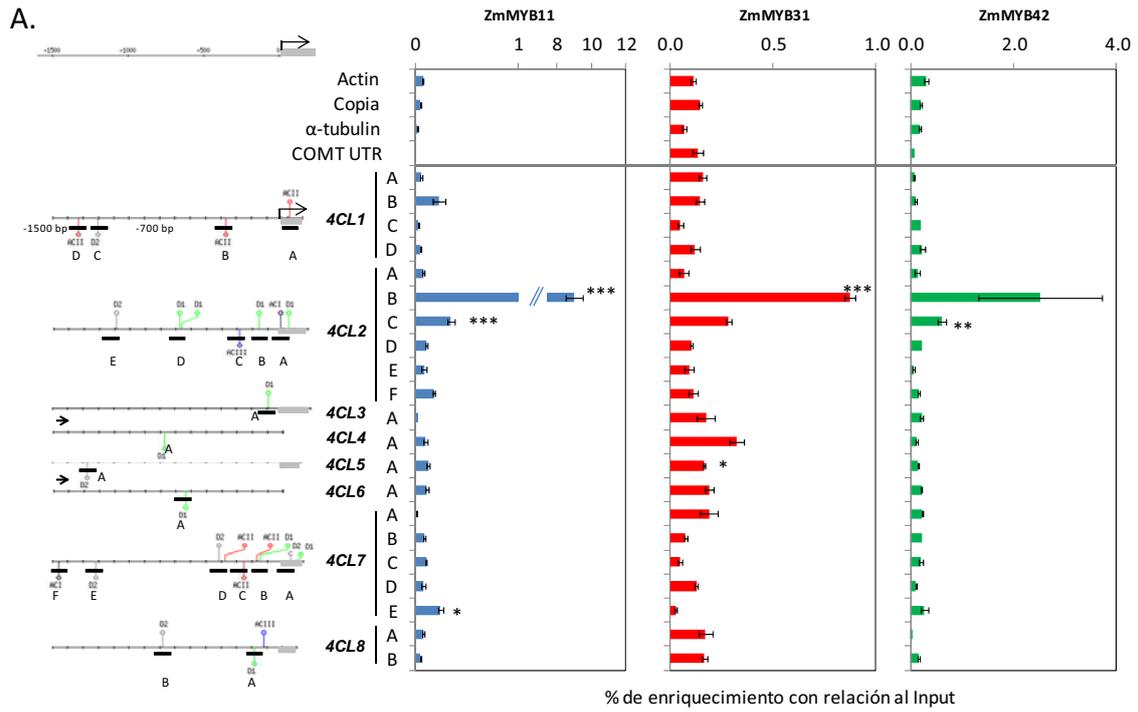


Figura S1. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *C4H*.

A y B son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *C4H*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T-Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.



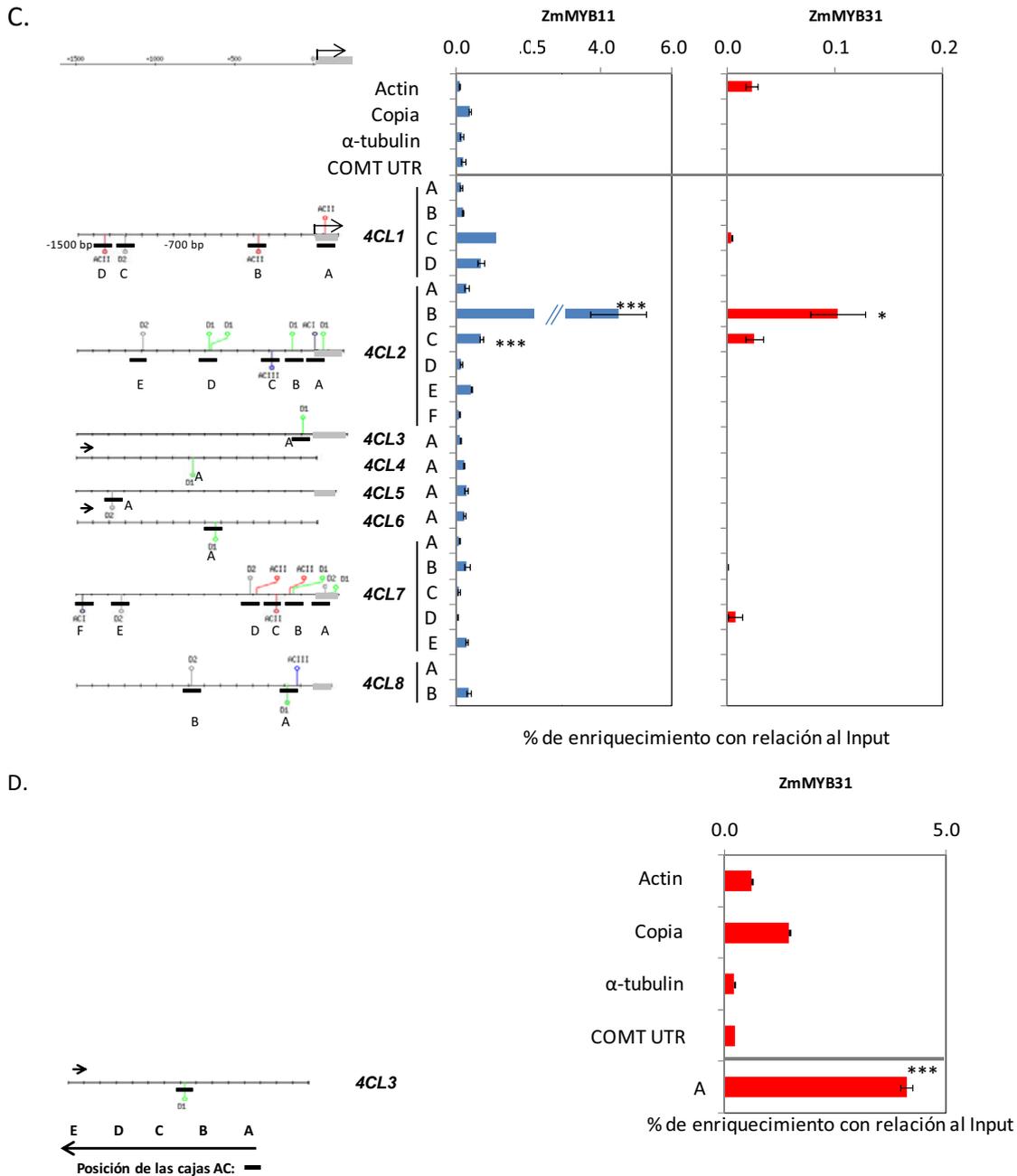


Figura S2. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *4CL*.

A, B, C y D son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *4CL*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T-Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.

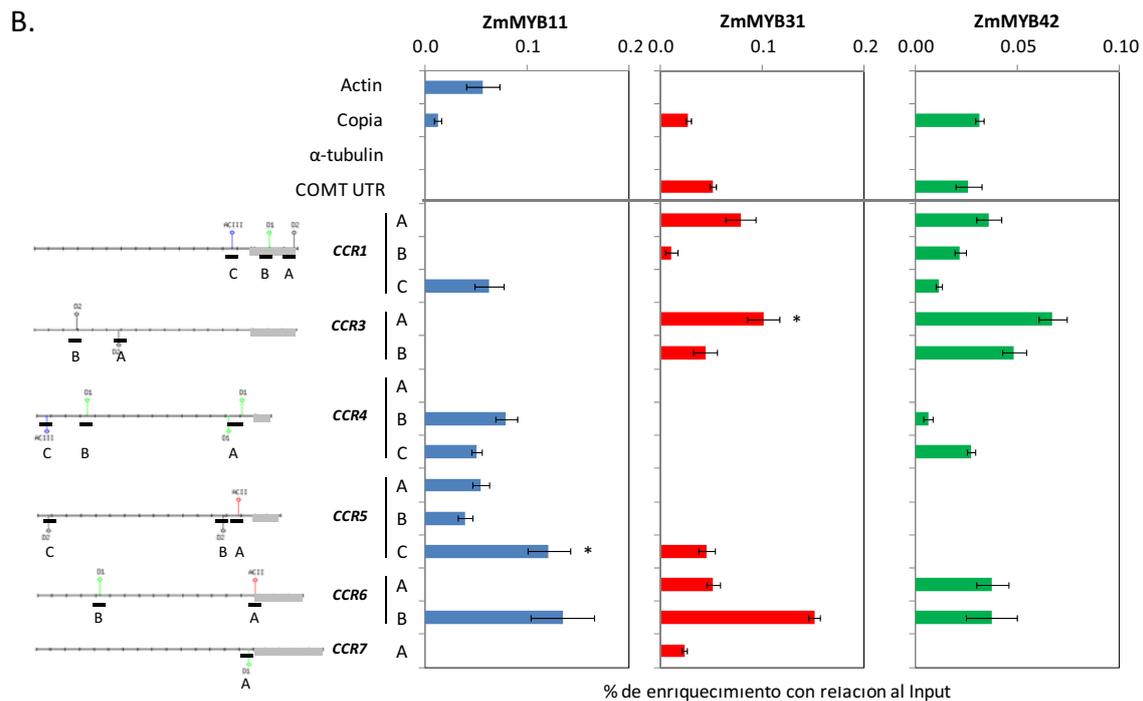
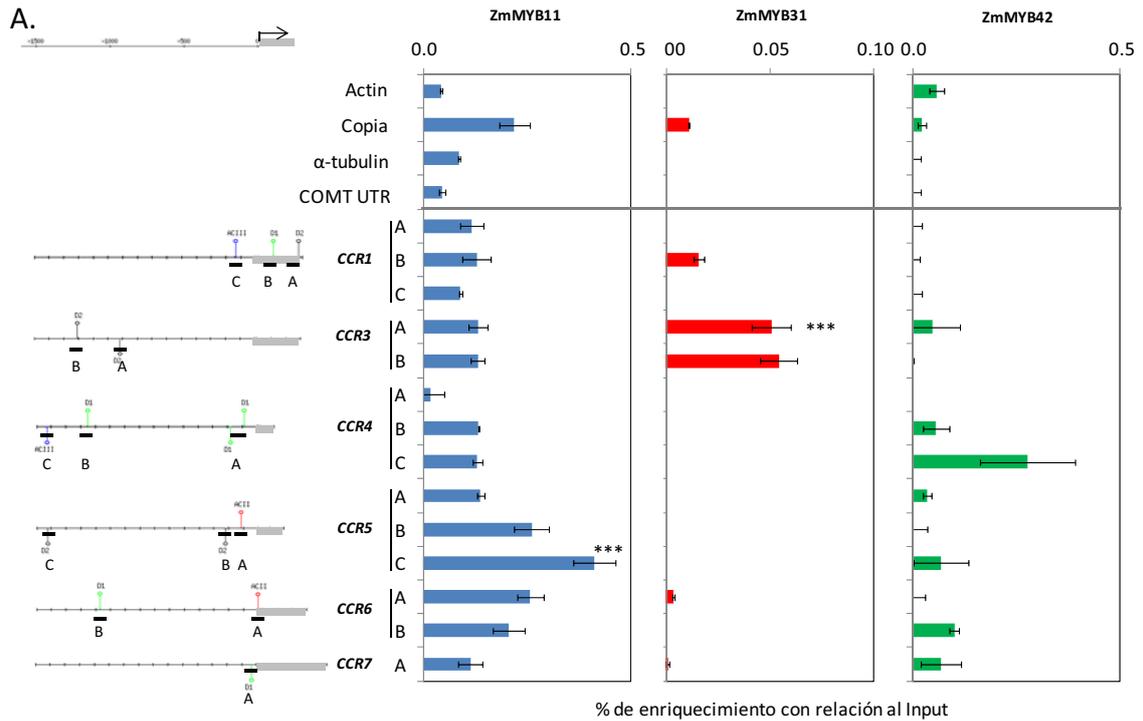
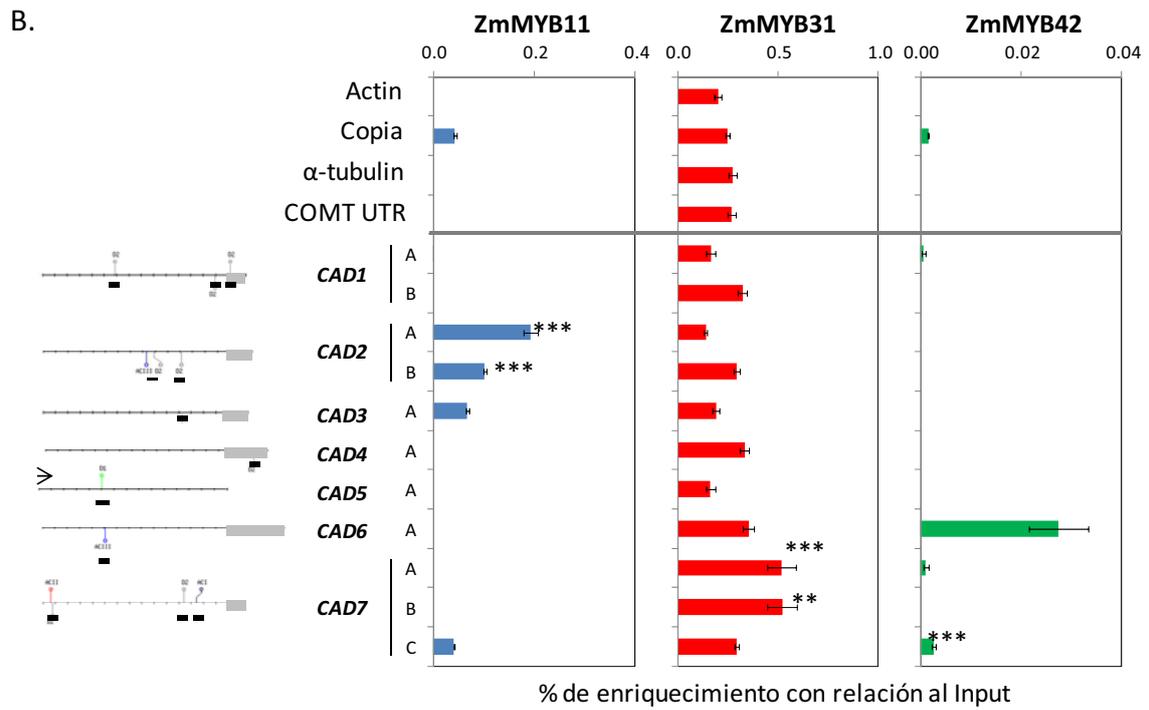
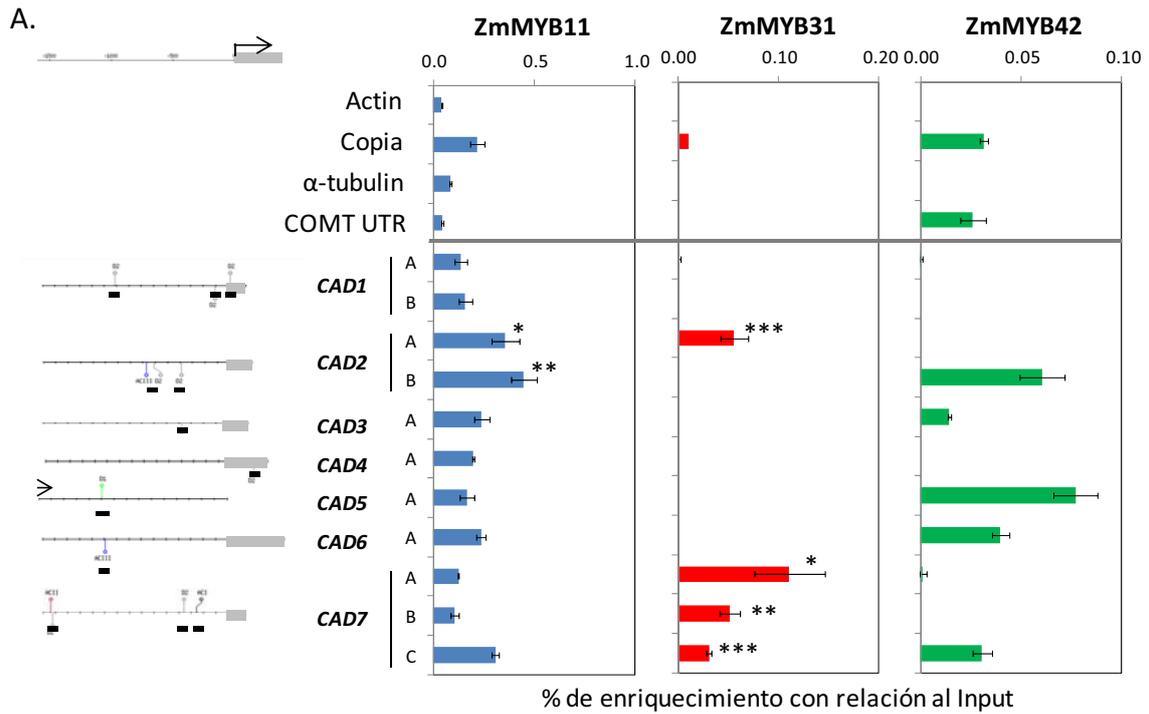


Figura S3. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *CCR*.

A y B son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *CCR*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'*

(AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T -Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.



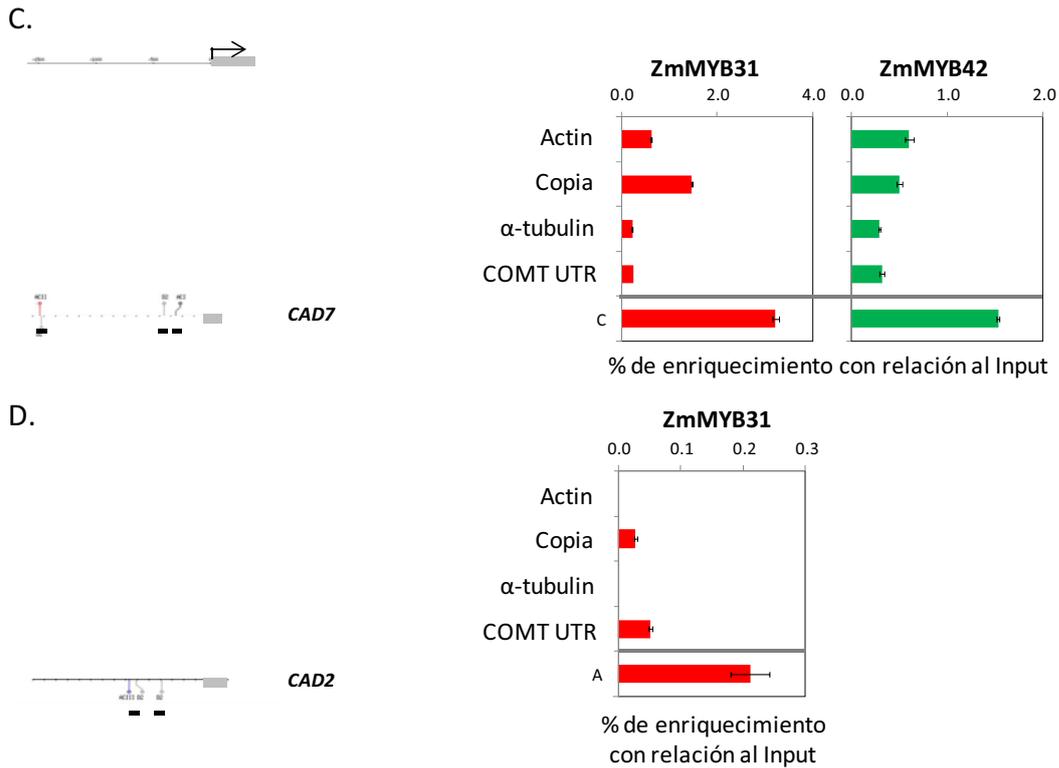
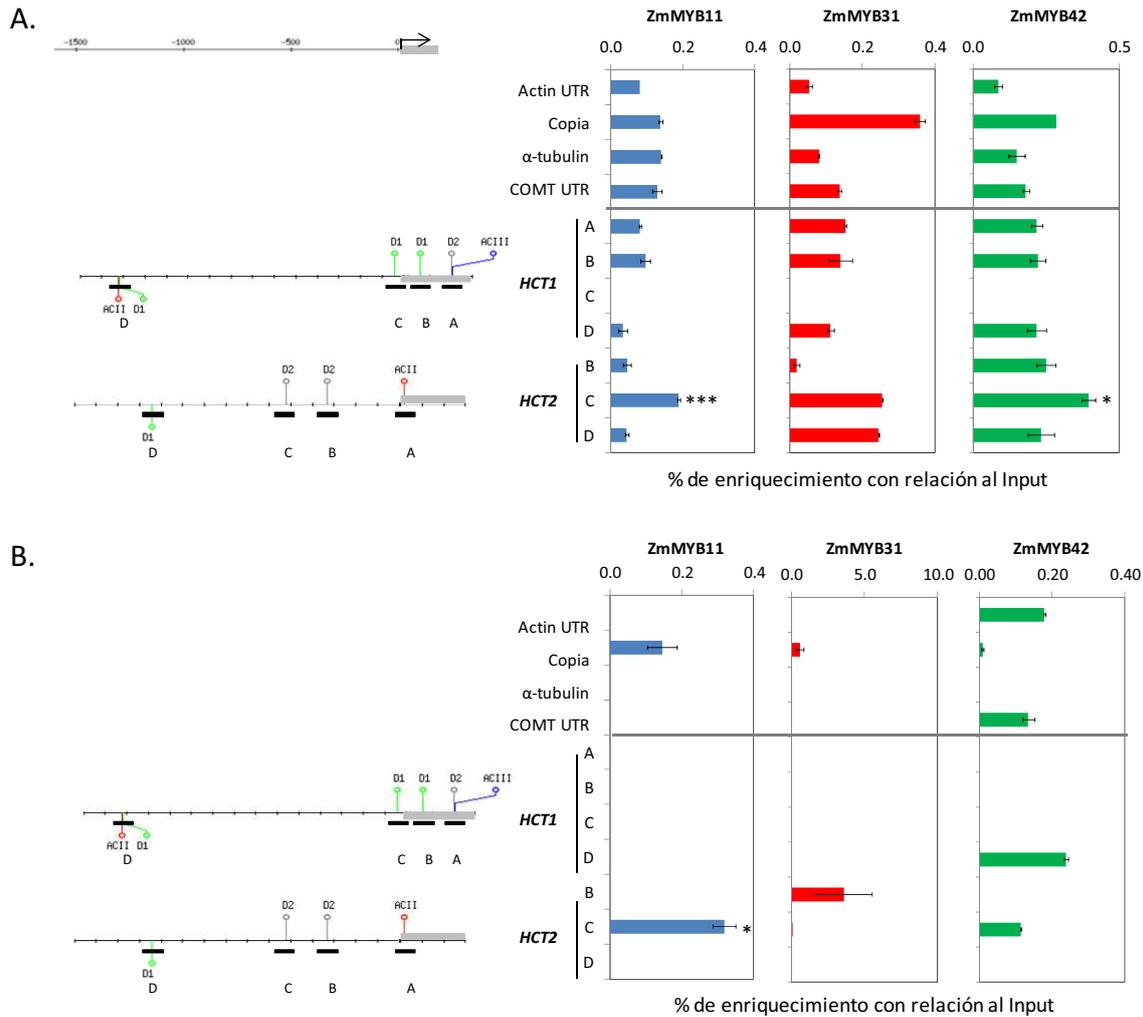


Figura S4. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *CAD*.

A, B, C y D son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *CAD*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T -Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.



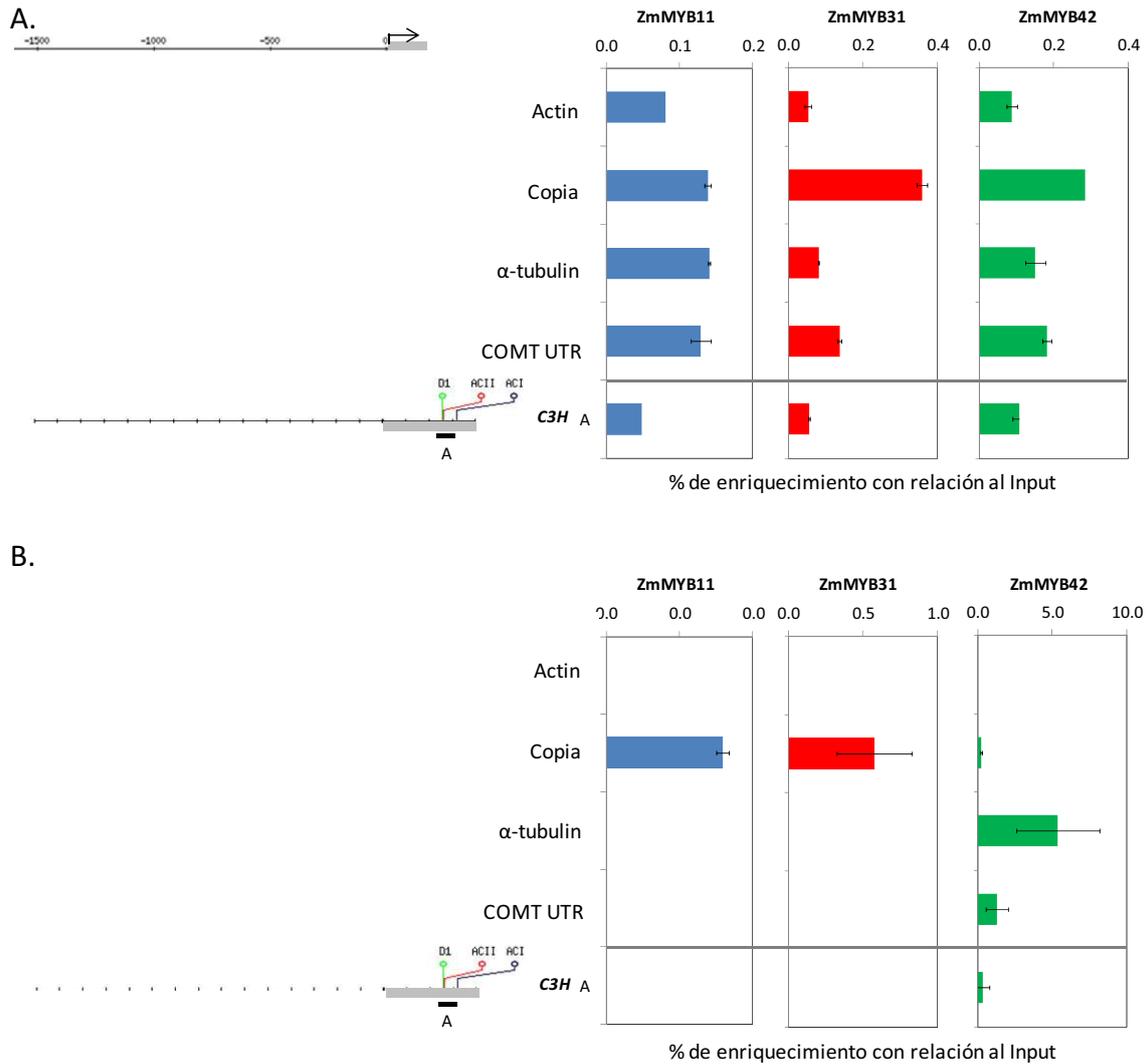


Figura S6. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *C3H*

A y B son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *C3H*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T-Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.

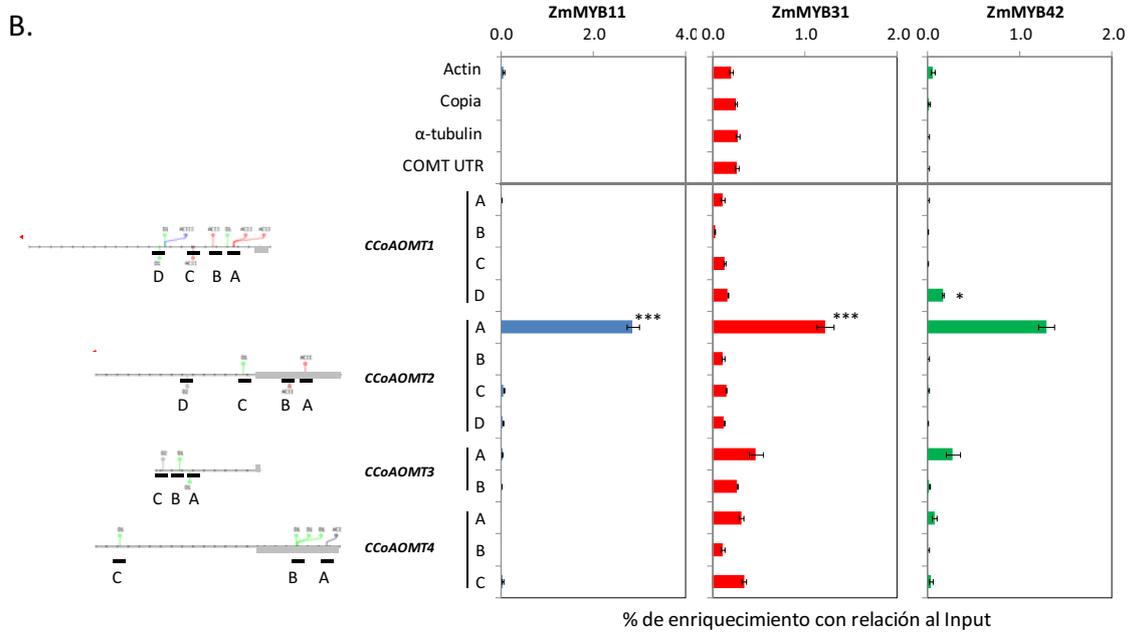
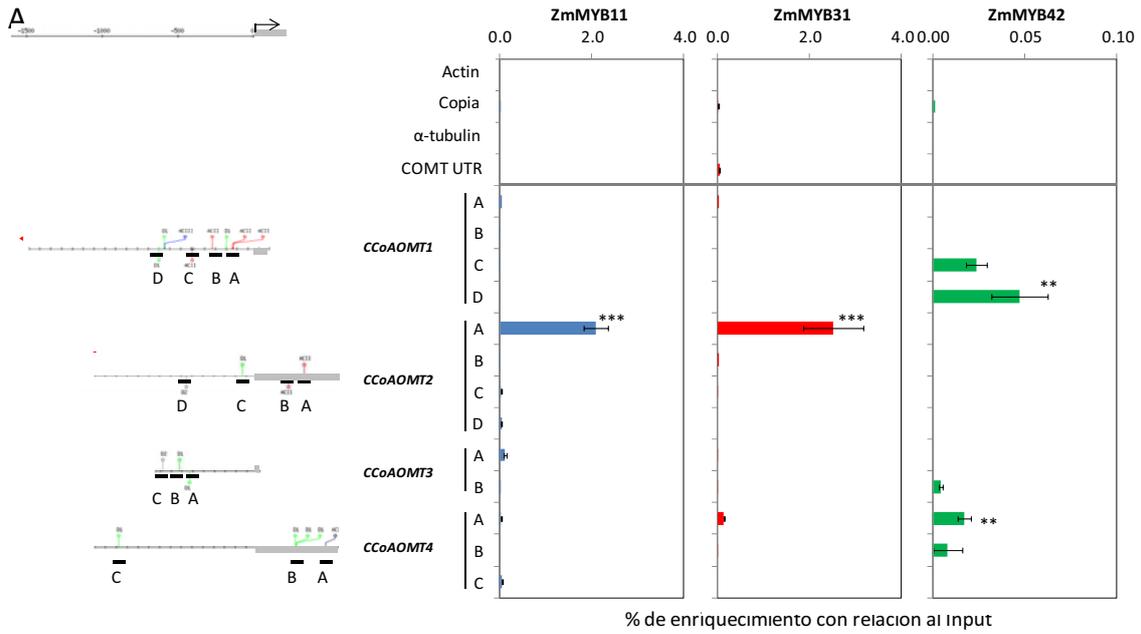
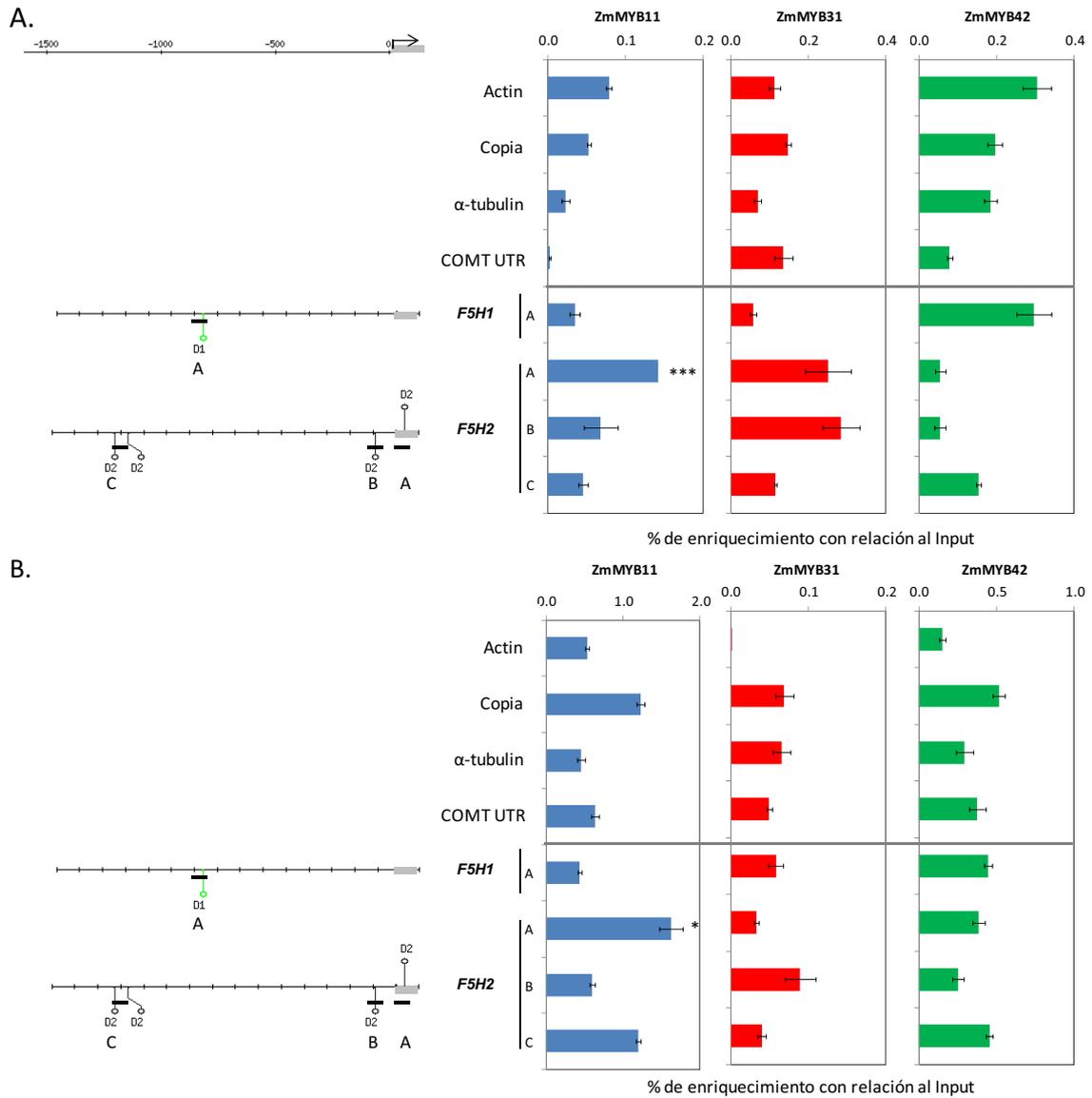


Figura S7. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *CCOAOMT*

A , B y C son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *CCOAOMT*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T -Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.



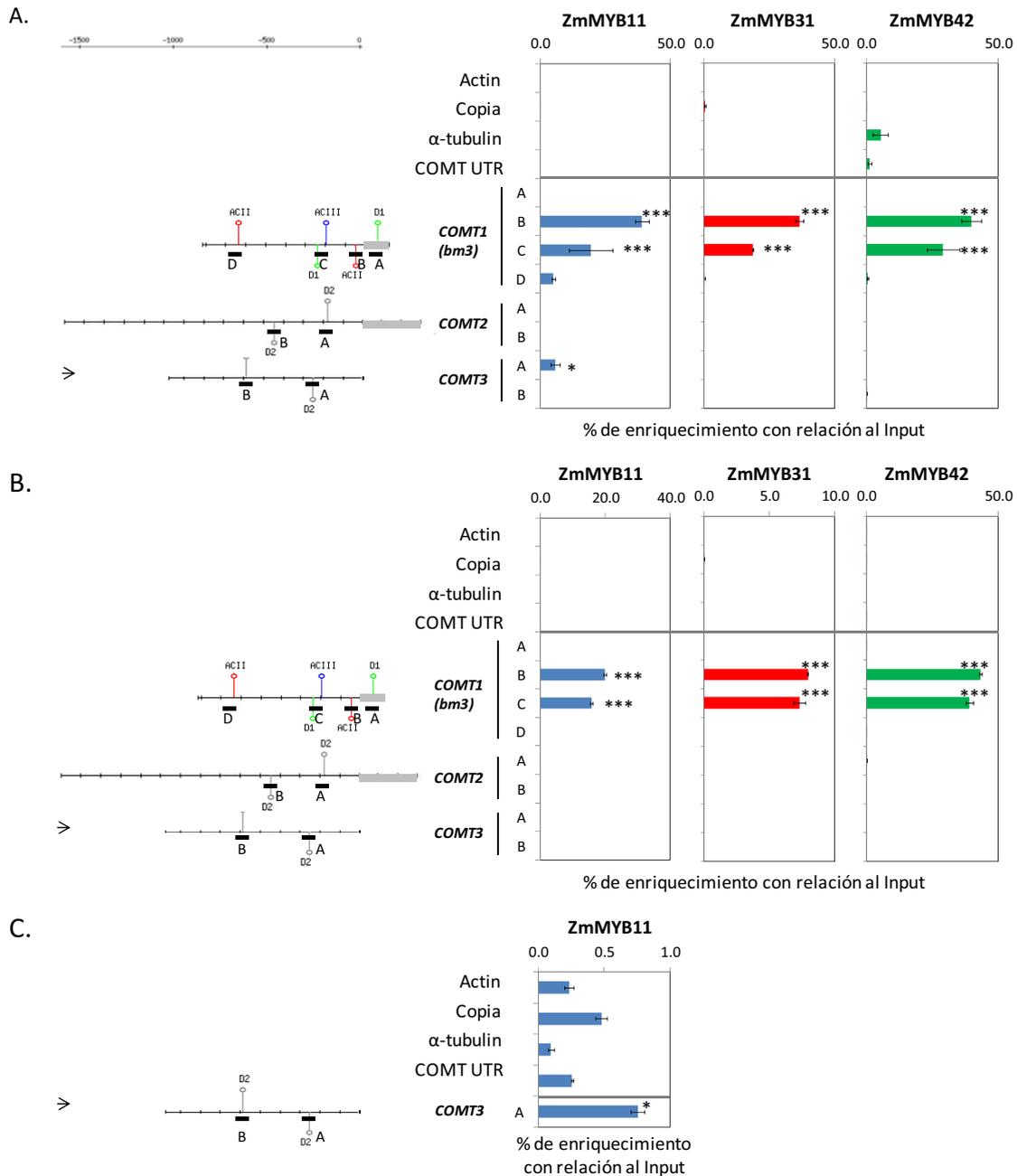


Figura S9. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *COMT*.

A , B y C son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *COMT*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T -Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.

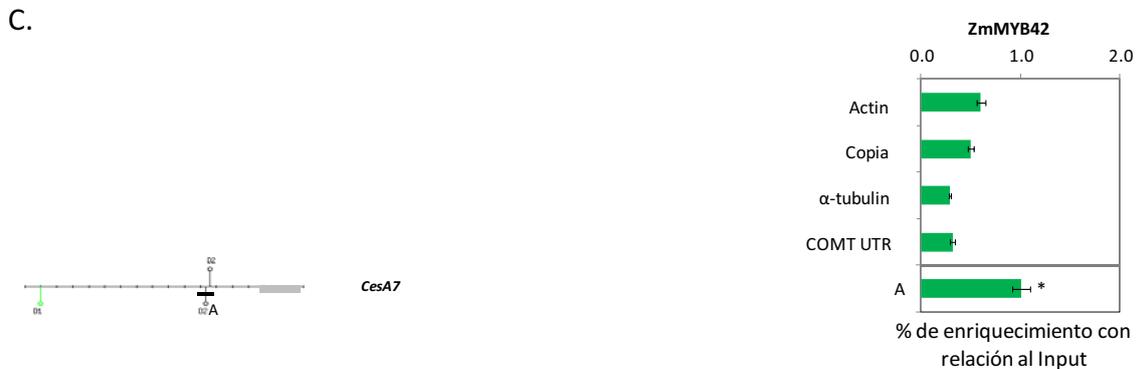
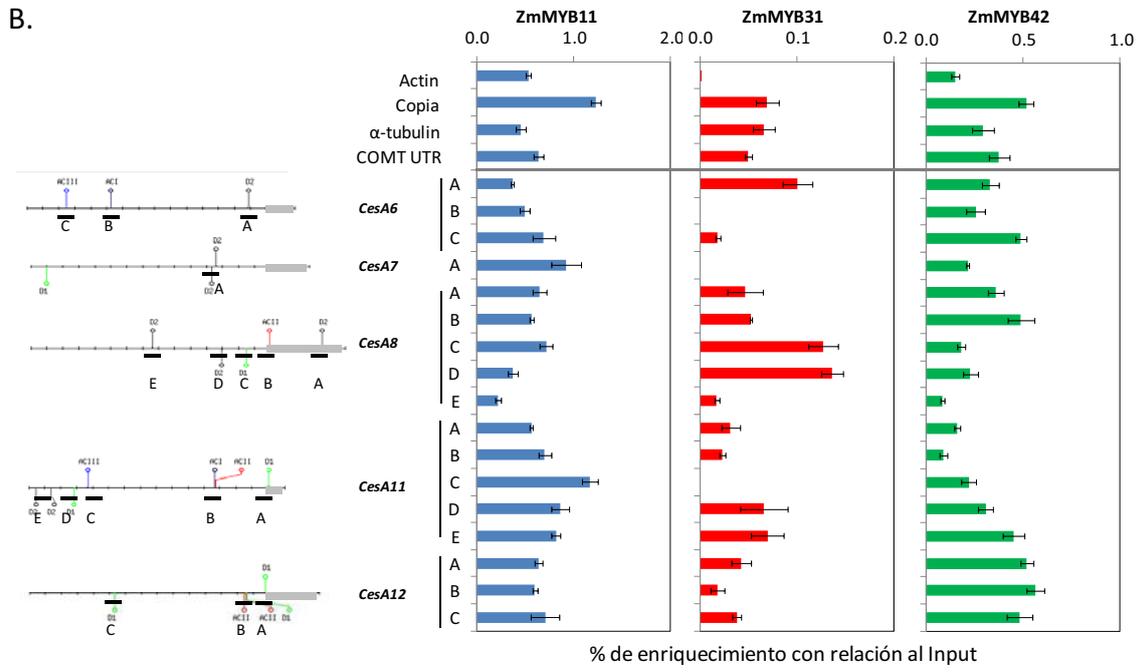
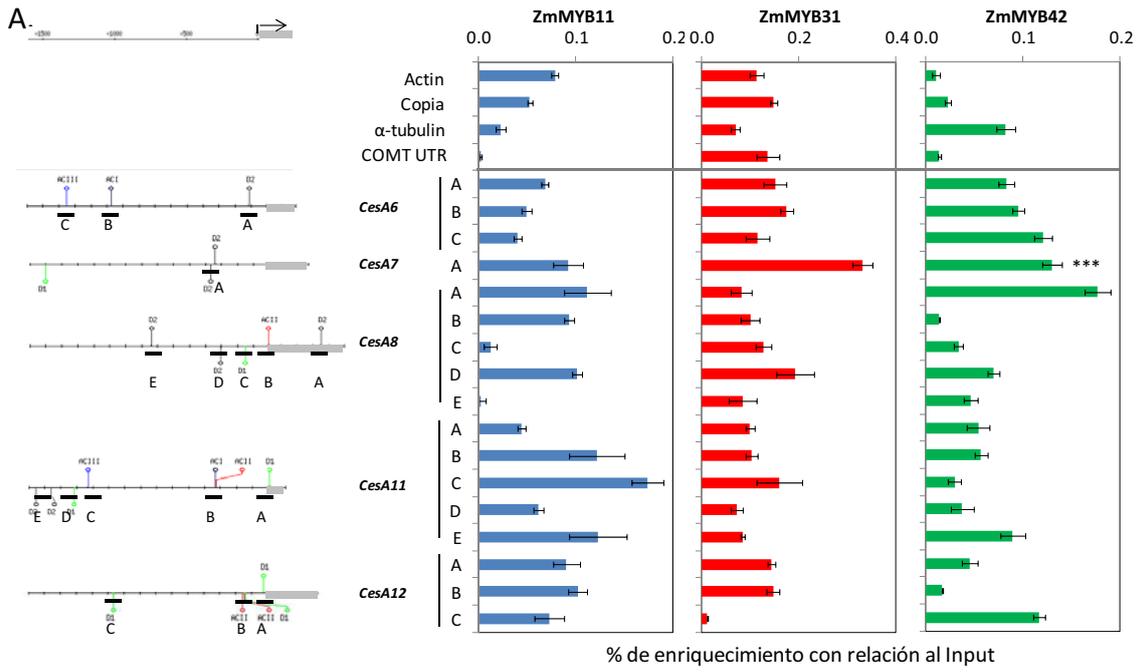


Figura S10. Análisis *in vivo* del patrón de unión de los miembros de la familia *R2R3-MYB* del subgrupo cuatro a la región aguas arriba de los genes de la familia *CesA*.

A , B y C son réplicas biológicas independientes. A la izquierda se presenta la representación de la estructura de la región 5' de los genes de la familia *CesA*. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción de los genes y con una línea la posición de las cajas AC, que a su vez corresponde con el área que fue amplificada mediante ChIP nano-qPCR. El análisis de enriquecimiento se realizó usando el parámetro % de enriquecimiento con respecto al input. De izquierda a derecha se presentan los resultados obtenidos de ChIP realizados utilizando los anticuerpo purificados α ZmMYB11, α ZmMYB31 y α ZmMYB42 y como fuente de cromatina la base de hoja ligule 2 de plantas de maíz de la variedad B73. En la parte superior derecha se presenta el enriquecimiento de los controles negativos *actin1* (GRMZM2G126010), *copia* (genbank #AF398212), *Alpha-3-tubulin* (AC195340.3_FGT001) y *COMT-3'* (AC196475.3_FGT0045). El análisis estadístico de las diferencias entre las muestras se realizó con la prueba T -Student. Uno, dos y tres asteriscos indican una diferencia significativa ($P < 0,05$), altamente significativa ($P < 0,01$) y extremadamente significativa ($P < 0,005$), respectivamente, entre la región enriquecida y el control negativo que obtuvo el valor más alto de % de input. Las barras de error representan la desviación estándar de una réplica biológica con mínimo dos replicas técnicas.

