



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**INTEGRACIÓN DE FACTORES HORMONALES Y AMBIENTALES EN UN
MODELO PARA LA FORMACIÓN DE PATRONES CELULARES EN LA
EPIDERMIS DE HOJA EN *Arabidopsis thaliana*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANDREA LIZBETH DOMÍNGUEZ ROMÁN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. MARIANA BENÍTEZ KEINRAD

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

DR. LUIS MENDOZA SIERRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**INTEGRACIÓN DE FACTORES HORMONALES Y AMBIENTALES EN UN
MODELO PARA LA FORMACIÓN DE PATRONES CELULARES EN LA
EPIDERMIS DE HOJA EN *Arabidopsis thaliana*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANDREA LIZBETH DOMÍNGUEZ ROMÁN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. MARIANA BENÍTEZ KEINRAD

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

DR. LUIS MENDOZA SIERRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. ENERO, 2017



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **DOMÍNGUEZ ROMAN ANDREA LIZBETH** con número de cuenta **513023864** con la tesis titulada **"INTEGRACIÓN DE FACTORES HORMONALES Y AMBIENTALES EN UN MODELO PARA LA FORMACIÓN DE PATRONES CELULARES EN ARABIDOPSIS THALIANA"**, bajo la dirección de la **DRA. MARIANA BENITEZ KEINRAD**:

Presidente: DRA. MARIA DEL ROCIO CRUZ ORTEGA
Vocal: DRA. KARINA BOEGE PARE
Secretario: DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA
Suplente: DR. CARLOS ESPINOSA SOTO
Suplente: DRA. BERENICE GARCIA PONCE DE LEON

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 17 de enero de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, a la beca CONACyT para estudios de Maestría 508770/288744, y a los proyectos: UNAM-DGAPA-PAPIIT (IA200714, IN113013-°©-3) y CONACyT (221341).

Agradezco a los miembros de mi comité tutor, a la Dra. Berenice García Ponce de León y al Dr. Luis Mendoza Sierra, por sus valiosos comentarios, su apoyo y paciencia a lo largo de la realización de esta tesis.

Agradezco también a los miembros de mi comité sinodal, la Dra. Rocio Cruz Ortega, La Dra. Karina Boege Paré y al Dr. Carlos Espinosa Soto que con sus correcciones y comentarios ayudaron a enriquecer esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a Mariana por todo su apoyo, esfuerzo, dedicación y comprensión durante este proceso. Ha sido un largo camino y en todo momento me brindó su ayuda incondicional y consejos que me servirán durante mi vida académica y personal. Gracias por ser tan buena persona y una excelente asesora, por siempre seguir al pendiente y ayudarme a finalizar esta etapa.

Así mismo agradezco al Dr. Jan Hejátko por permitirme realizar una estancia de investigación en el laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de Plantas (CEITEC) en la Universidad de Masaryk, Brno, Republica Checa. Los resultados de esta investigación ayudaron profundamente a complementar esta tesis y comparar los resultados teóricos con nuevos datos experimentales.

RESUMEN

La acumulación de datos genéticos y moleculares derivados de estudios en la biología del desarrollo, la genética y más recientemente la genómica han permitido la generación y el desarrollo de modelos de Redes de Regulación Genética (RRG) en estudios de morfogénesis y diferenciación celular. En las RRG, los genes, ARNm, proteínas u otros factores corresponden a los nodos de la red y las relaciones de regulación entre los nodos corresponden a interacciones de regulación positivas o negativas.

Los patrones celulares en la epidermis de hoja en *Arabidopsis thaliana* (en adelante *Arabidopsis*) son un excelente modelo para el estudio de la diferenciación celular y la formación de patrones. En particular, las RRG han sido utilizadas para estudiar la diferenciación celular y el patrón de los tricomas en las hojas de *Arabidopsis*. El patrón celular en este sistema es sensible a un amplio rango de procesos regulatorios a diferentes niveles. Por ejemplo, el estrés y la herbivoría pueden causar cambios en la distribución y en la densidad de los tricomas, además, la señalización de las hormonas Giberelinas, Ácido Jasmónico y Citoquininas regulan el desarrollo de tricomas, lo cual podría ayudar a entender el desarrollo plástico de éstos.

Con base en lo anterior, en este proyecto nos propusimos extender uno de los modelos de RRG, integrando el papel de los mecanismos genéticos, hormonales y ambientales en la formación y el desarrollo plástico de tricomas en la epidermis de hoja de *Arabidopsis*. Buscando así entender el papel que estas señales y sus complejas interacciones tienen en *Arabidopsis* y cómo estas interacciones contribuyen con el origen y la variación del patrón de tricomas. Los resultados de este trabajo permitieron estudiar los mecanismos detrás de la plasticidad fenotípica observada durante la diferenciación de tricomas así como predecir nuevas interacciones que retroalimentan al trabajo experimental, aportando datos originales respecto al efecto combinado de dos hormonas en la densidad de los tricomas.

Abstract

The accumulation of data from molecular genetic studies of development biology and genomics has enabled the generation and development of Gene Regulatory Network (GRN) models of cell differentiation and morphogenesis. In GRNs, genes, mRNA or proteins correspond to the network nodes and the links among nodes stand for regulatory interactions.

Epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana* leaves provides an excellent model for the study of cell differentiation and patterning formation. In particular, GRN models have been used to study cell fate determination and patterning of epidermal hairs, trichomes in the leaves. Dynamic network models and experimental evidence have suggested that cell patterning in this system is sensitive to a wide range of regulatory processes at different levels. For example, it has been shown that in the leaf epidermis, Gibberellins (GA) and Cytokinin (CK) signaling promotes trichome development, which could account for changes in trichome density and patterning during plant development. Plus, it has been found that environmental cues such as stress and herbivory also cause changes in the distribution and density of trichomes.

We set up to integrate the role of genetic and non-genetic mechanisms and the role of phenotypic plasticity in the formation and development of trichomes in the leaf epidermis of *Arabidopsis*. Since it is not yet well known which mechanisms are behind the plastic changes observed in trichome patterns in response to different environmental stimuli, in our research, we propose to include signaling and interactions of some hormonal pathways and environmental cues such as stress and herbivory in the gene regulatory network determining trichomes that exists in *Arabidopsis*. This, to understand the role that these signals and their complex interactions have with *Arabidopsis* and how these interactions contribute with the origin and variation of trichome patterning. The results allow us to understand in a better way the mechanisms behind phenotypic plasticity of trichome cell determination and to predict new interactions that feedback experimental work. Plus, this work provides new data on the combine effect of two hormones on trichome density.

INDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 ECOLOGÍA EVOLUTIVA DEL DESARROLLO	7
1.2 PLASTICIDAD FENOTÍPICA	8
1.3 PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS	10
2. FORMACIÓN DE PATRONES EN LA EPIDERMIS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>: MODELO DE ESTUDIO	12
2.1 RED DE REGULACION GENETICA PARA LA DETERMINACION DE TRICOMAS	15
3. LAS HORMONAS Y EL AMBIENTE EN LA DETERMINACION DE LOS TIPOS CELULARES EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	19
4. MODELOS DINAMICOS EN ECO-EVO-DEVO	23
4.1 MODELOS DINAMICOS DE REDES DE REGULACION GENETICA (RRG) . .	23
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1 MÉTODOS DE MODELADO MATEMÁTICO	28
7.1.1 ACTUALIZACIÓN DEL MODELO DE DETERMINACIÓN DE TIPO CELULAR EN LA EPIDERMIS DE <i>ARABIDOPSIS</i>	28
7.1.2 CONSTRUCCIÓN DEL PROGRAMA COMPUTACIONAL	29
7.1.3 SIMULACIÓN DE LÍNEAS MUTANTES Y EFECTO DE CAMBIOS EN LAS VARIABLES AMBIENTALES	33
7.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES	34

8. RESULTADOS	36
8.1 DEFINICIÓN DE LOS NODOS Y LA REGLAS LÓGICAS DE LA RRG	38
8.1.1 FORMACIÓN DEL COMPLEJO ACTIVADOR (CA).	38
8.2 REGULACIÓN DE LOS INHIBIDORES Y SU PARTICIPACIÓN EN LA RRG. . .	41
8.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS NODOS INCORPORADOS A LA RED	42
8.3.1 ZINC FINGER PROTEIN6/ ZINC FINGER PROTEIN5/ GLABROUS INFLORESCENCE STEMS3	42
8.3.2 SPINDLY	43
8.3.3 GLABROUS INFLORESCENCE STEMS	44
8.3.4 ZINC FINGER PROTEIN8/ GLABROUS INFLORESCENCE STEMS2.	45
8.3.5 TRASPARENT TESTA GLABRA2	46
8.3.6 SPL9/MIR156	47
8.3.7 UPL3	47
8.3.8 DELLA PROTEINS	48
8.3.9 JASMONATO ZIM PROTEINS	49
8.4 PERFIL DE ACTIVACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE LA RED DE REGULACIÓN.	49
8.5 PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE TRICOMAS OBTENIDOS DE LAS SIMULACIONES.	50
8.6 EVALUACIÓN TEÓRICA DE DIFERENTES ESCENARIOS DE INTERACCIONES POSIBLES DENTRO DE LA RED, PERO NO VERIFICADAS EXPERIMENTALMENTE	57
8.7 COMPARACIÓN DEL MODELO CON EVIDENCIA EXPERIMENTAL	60
8.8 RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES	61
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	68
10. PERSPECTIVAS	73
11. REFERENCIAS	74
12. ANEXO I	80

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La ecología evolutiva del desarrollo (eco-evo-devo) estudia las relaciones entre los procesos del desarrollo, las interacciones organismo-ambiente en estos procesos y el cambio fenotípico durante la evolución (Hall et al., 2003). Gracias al desarrollo y uso de herramientas teóricas y computacionales que permiten analizar los datos experimentales disponibles de manera integrada, se han generado modelos dinámicos de regulación genética que ayudan a entender cómo surgen y evolucionan los procesos del desarrollo y los fenotipos (Kauffman 1969; von Dassow et al., 2000; Álvarez-Buylla et al., 2007), y cuál ha sido el papel del ambiente en la generación de la compleja variación fenotípica que observamos (Müller 2007).

La plasticidad fenotípica es la capacidad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a cambios en el ambiente y puede considerarse como una fuente de variabilidad importante en términos ecológicos y evolutivos (Pigliucci et al. 2006; West-Eberhard 2005). La epidermis de *Arabidopsis thaliana* representa un buen modelo para estudiar la formación de patrones y tipos celulares (tricomas o pelos y células de cementación) y el papel de mecanismos genéticos, hormonales y ambientales en la formación de éstos (Grebe 2012; Benítez et al., 2013). En este trabajo se presenta información actualizada sobre uno de los modelos de red de regulación genética de determinación de tricomas y no-tricomas que existe para *Arabidopsis* (Benítez et al., 2008; ver sin embargo, otros modelos matemáticos para la determinación del arreglo espacial de tricomas: Pesch y Hulskamp, 2004; Benítez et al., 2007; Bouyer et al., 2008; Digiuni et al., 2008). Se ha observado que las hormonas vegetales como giberelinas (GA), ácido jasmónico (AJ) y citoquininas (CK) juegan un papel importante en la percepción de las condiciones ambientales y su traducción en respuestas plásticas específicas, tales como un aumento en el número y patrón de distribución de tricomas (Voesenek et al., 1996, Traw et al.,

2003, Maes et al., 2010). Por ello, las interacciones de estas hormonas con los elementos de la red de regulación génica se incluirán en la nueva versión del modelo. Además, las señales ambientales como estrés y herbivoría también ocasionan cambios en la distribución y densidad de tricomas (Holeski 2007) y pueden estar mediadas en parte por vías hormonales (Holeski *et al.*, 2012, Jaillais & Chory 2010, An et al., 2011, Thaler et al., 2010). Así, la generación de este modelo permitirá explorar indirectamente la manera en que las complejas interacciones organismo-ambiente afectan el desarrollo y la plasticidad de los fenotipos, aportando en este sentido al programa de investigación de la eco-evo-devo.

1.1 ECOLOGÍA EVOLUTIVA DEL DESARROLLO

La biología evolutiva del desarrollo (evo-devo) emergió como un campo nuevo de conocimiento en los inicios de los años 80 (Olsson et al., 2006). Actualmente evo-devo es considerada como un marco teórico, que por una parte estudia cómo los procesos del desarrollo han evolucionado y por otra parte, intenta probar las consecuencias del establecimiento de estos procesos en la evolución de los organismos (Raff 2000; Gilbert 2003; Jablonka & Lamb 2005; Müller 2007). A partir de estas ideas, de la acumulación de evidencia experimental, y de que se ha observado que el ambiente puede influir en el cambio y desarrollo de los organismos, surge otra pregunta importante: ¿cómo los procesos estudiados por el evo-devo se relacionan con las condiciones ambientales en que los organismos habitan? (Jablonka y Lamb 2007; Müller, 2007; Pigliucci & Müller 2010; Gilbert 2003).

Al integrar las relaciones ecológicas que mantienen los organismos durante su desarrollo y evolución surge la ecología evolutiva del desarrollo (eco-evo-devo, por los nombres en inglés de estas disciplinas), la cual busca entender los diversos mecanismos detrás del origen de la variación fenotípica y su herencia transgeneracional, y en última instancia, las distintas dimensiones en la evolución de los seres vivos (Hall et al., 2003, Müller., 2007, Gilbert & Epe., 2009).

Así, en este proyecto se busca explorar y contribuir a entender la manera en que las complejas interacciones organismo ambiente afectan el desarrollo y la plasticidad de los patrones celulares en la epidermis de hoja de *Arabidopsis* al estudiar la expresión e interacciones de los genes que participan en la formación de tricomas.

1.2 PLASTICIDAD FENOTÍPICA

De manera general, la plasticidad fenotípica se refiere a cualquier cambio en las características de un organismo en respuesta a un estímulo ambiental. Es decir, la propiedad de un genotipo de producir más de un fenotipo cuando el organismo se encuentra en diferentes condiciones ambientales (Figura 1; Pigliucci et al., 2006; Whitman & Agrawal, 2009). Los cambios en los fenotipos dependen de factores como el pH, humedad, temperatura, fotoperiodo, estacionalidad, hormonas, entre otros. A su vez, esta plasticidad se puede expresar también como cambios químicos, fisiológicos, del desarrollo, morfológicos, de conducta, etc.

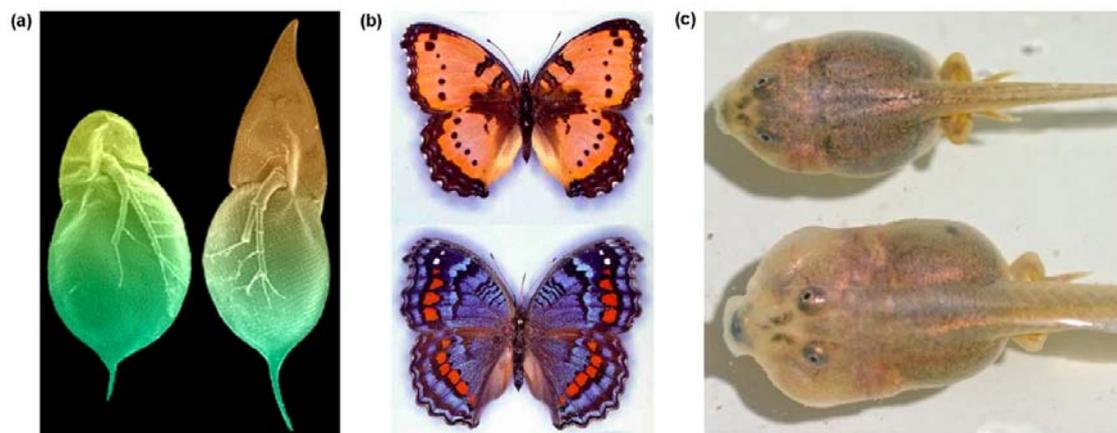


Figura 1. Ejemplos representativos de fenotipos alternativos inducidos por el ambiente (plasticidad fenotípica). **(a)** Fenotipo silvestre (izquierda) y fenotipo inducido por depredadores (derecha) de pulgas de agua, *Daphnia cucullata*; **(b)** mariposas, *Precis octavia* durante la temporada húmeda (arriba) y la temporada seca (abajo). **(c)** renacuajo, *Spea multiplicata* con una dieta omnívora (arriba) y carnívoro (abajo). Tomada de Pfenning et al., 2010).

El tipo y grado de plasticidad son específicos de las condiciones ambientales y de los rasgos individuales de los organismos; por ejemplo, un mismo rasgo puede ser plástico en respuesta a cambios en la temperatura, pero no al cambio de nutrientes, o un cierto rasgo puede ser plástico en respuesta a la temperatura mientras que otro rasgo no (Pigliucci et al., 2006).

La adaptación en un nuevo ambiente a través de la plasticidad fenotípica conlleva en algunos casos a la conversión de la variación inducida ambientalmente no heredable a variación heredable. Uno de los procesos por el cual esta variación inducida ambientalmente se convierte en una variación fenotípica heredable es frecuentemente referido como “asimilación genética” (Figura 2; Pigliucci et al., 2006; Pigliucci & Murren 2003; Scheiner 1993; Schlichting & Smith 2002; Jablonka & Lamb 2005; West-Eberhard 2003). La asimilación genética es un proceso por el cual, un rasgo inducido ambientalmente se logra expresar constitutivamente después de un proceso de selección, es decir, se fija genéticamente (Waddington 1953, 1961).

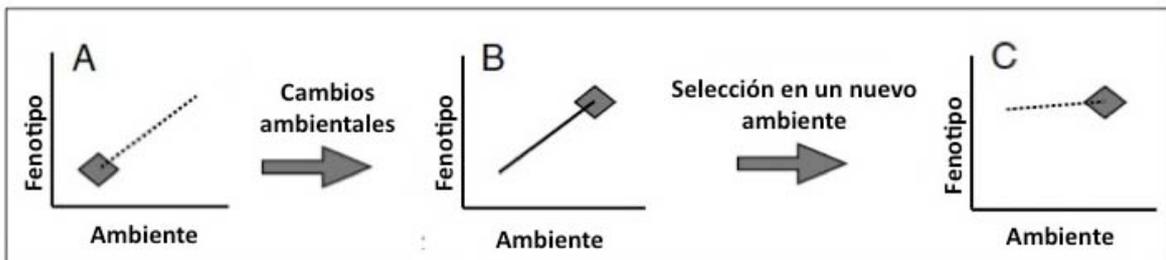


Figura 2. Concepto de asimilación genética visto en términos de norma de reacción y plasticidad fenotípica. Una población ocupa inicialmente un ambiente **(A)**, si el ambiente cambia **(B)**, la norma de reacción de la población le permite persistir al producir un nuevo fenotipo sin cambiar el genotipo. Si la selección natural opera de forma positiva en el nuevo ambiente y sobre el nuevo fenotipo, este se fijará genéticamente (se asimilará), se presentará en ausencia del nuevo ambiente y la norma de reacción original perderá plasticidad **(C)**. Tomada y modificada de Pigliucci et al., 2006.

Por su potencial para generar un fenotipo de forma casi inmediata en respuesta a cambios en el ambiente, la plasticidad fenotípica juega un papel muy importante en facilitar el surgimiento de fenotipos divergentes dentro de las poblaciones y, dados los mecanismos de asimilación discutidos arriba, podría conducir a la diversificación. En particular, cuando la selección direccional o disruptiva favorece un nuevo fenotipo, las vías genéticas del desarrollo que subyacen la plasticidad proveen inmediatamente una respuesta amplia de la población al ambiente y una variación genética sobre la cual puede actuar la selección, promoviendo la evolución de diversos fenotipos. Una vez inducidos, los fenotipos promovidos por el ambiente pueden ser refinados por la selección a través de diferentes procesos evolutivos (Pfennig et al., 2010).

1.3 PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

La plasticidad fenotípica ha sido ampliamente estudiada en plantas, las cuales pueden presentar efectos muy drásticos a lo largo de todo su crecimiento y desarrollo, muchos de ellos inducidos por el ambiente en el que se desarrollan. En un inicio, los estudios sobre la plasticidad en las plantas se enfocaban principalmente en la descripción del crecimiento y morfología, como el tamaño de la planta, número de ramas, longitud de los internodos, etc. Recientemente, algunos estudios se han enfocado en los aspectos de la plasticidad que se relacionan más directamente con el éxito reproductivo y funcional de las plantas en el ambiente en el que se desarrollan, y por lo tanto, son evolutiva y ecológicamente importantes (Pigliucci 2009; Sultan 2000). Las plantas pueden responder a cambios en las condiciones del ambiente a través de la plasticidad de muchos aspectos de sus fenotipos. Por ejemplo, cambios como la vasculatura de las hojas, el área de la esclerénquima, la estructura de los nódulos de la raíz en leguminosas, etc. (Sultan, 2000).

Se ha observado que las plantas responden a las condiciones del ambiente no sólo ajustando sus fenotipos, sino en ocasiones también los de su descendencia. Por ejemplo, se ha demostrado que en la planta *Mimulus*

guttatus el daño en las hojas tempranas por herbivoría puede inducir un aumento en la densidad de tricomas en las hojas que aparecen posteriormente, demostrando que la producción de tricomas es un rasgo fenotípicamente plástico (Holeski, 2007). En el 2001, Agrawal llevó a cabo una serie de experimentos con el rábano silvestre (*Raphanus raphanistrum*), y demostró que tanto el daño por herbivoría causado por la oruga *Pieris rapae*, como tratamientos con ácido jasmónico en las plantas parentales incrementaban la resistencia relativa de la progenie comparadas con el control, en un proceso conocido como herencia transgeneracional (Agrawal, 2001). Aunque los mecanismos de la herencia transgeneracional de cambios en los fenotipos plásticos aún no son muy conocidos, posiblemente modificaciones post-traduccionales o epigenéticas del ADN o de proteínas a través de procesos como metilación, acetilación, etc., puedan estar llevándose a cabo y persistiendo en los organismos de la progenie (Holeski, 2007). El impacto ecológico y evolutivo de esta herencia transgeneracional, dada por la plasticidad fenotípica del organismo aún no es claro y su relevancia aún está por ser evaluada, pero los nuevos rasgos dados por la plasticidad fenotípica, podrían llegar a ser adaptativos, facilitando la supervivencia de los organismos que los poseen (Holeski et al., 2012).

Las hormonas son fundamentales en la interacción del organismo con su ambiente y en la mediación de las respuestas plásticas. Los efectos de las hormonas vegetales en el desarrollo son particularmente complejos, ya que una determinada sustancia y su concentración puede afectar diversas características que no dependen solamente del tejido o la célula involucrada, sino también de las condiciones ambientales, la edad y estado de desarrollo de la planta. Por otra parte puede existir “crosstalk” o interacciones entre las hormonas. Estos procesos se detallan más adelante (Voesenek & Blom 1996; Sultan, 2000, Hou et al., 2013; Hou et al 2010; Yang et al., 2012; Jaillais & Chory 2010).

CAPÍTULO 2

2. FORMACIÓN DE PATRONES EN LA EPIDERMIS DE *Arabidopsis thaliana*: MODELO DE ESTUDIO

Las plantas son un buen modelo para estudiar el papel potencial de la plasticidad y la variación epigenética en el desarrollo de los organismos multicelulares. La organización celular en las plantas es relativamente simple y no existe migración celular, por lo que resulta factible proponer modelos computacionales que permitan develar la posible acción y funcionamiento de diversos factores genéticos y no genéticos implicados en el desarrollo, así como el papel que estos factores o conjunto de ellos desempeñan durante la formación de patrones, morfogénesis y diferenciación celular *in vivo* (Meyerowitz, 2002). Finalmente, el estudio y entendimiento de estos sistemas en las plantas, nos puede llevar a realizar estudios comparativos amplios, por ejemplo considerando sistemas similares presentes en animales, o extrapolar este conocimiento a otros campos diferentes de investigación científica.

Entender los procesos del desarrollo y la regulación de la diferenciación celular que están detrás del establecimiento de patrones espacio-temporales precisos durante el desarrollo de un organismo es un reto vigente en el estudio de la Biología. En particular, la epidermis de las plantas es considerada como un excelente tejido para estudiar la diferenciación celular y la formación de patrones celulares (Figura 3, Benítez, 2011; Grebe, 2011). Tanto en las hojas como en la raíz, la epidermis consiste de un número pequeño de células, y es accesible a la observación y manipulación durante su desarrollo.

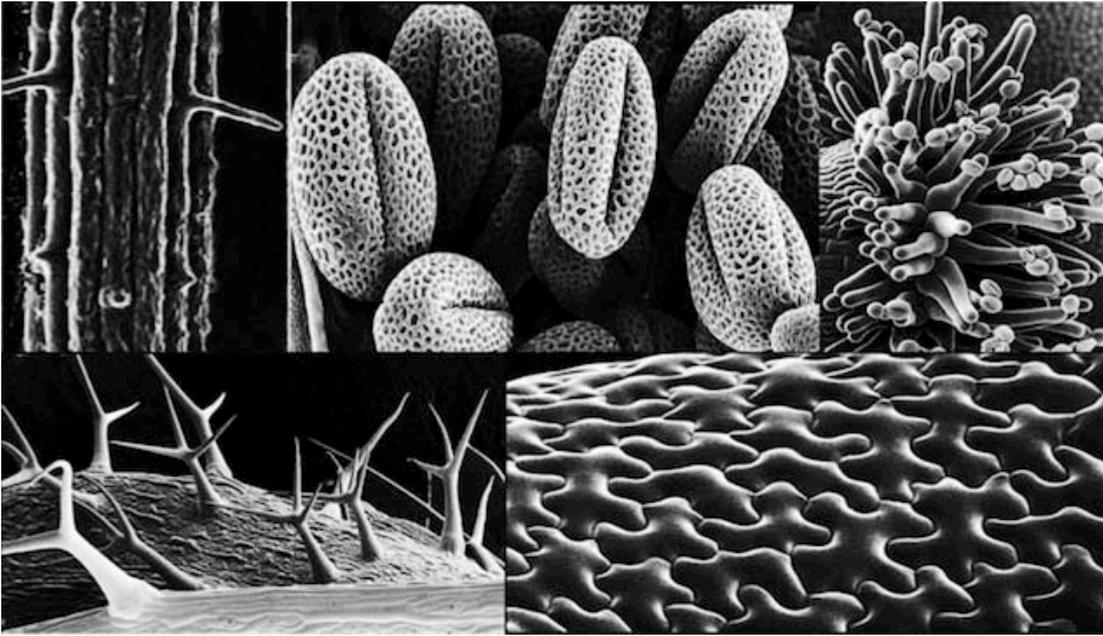


Figura 3. Tipos celulares presentes en *Arabidopsis thaliana*. En la epidermis de *Arabidopsis* se desarrollan diferentes tipos celulares dependiendo de los estímulos a los que las células se encuentran sometidas y su posición en la planta. Entre los principales tipos celulares en la epidermis se encuentran los estomas, células sementadas, tricomas y tricoblastos. Los tricoblastos en la raíz de *Arabidopsis* se observan como filamentos que sobresalen de la epidermis. Los tricomas se encuentran regularmente espaciados con tres o cuatro ramificaciones y su diferenciación o no diferenciación (células sementadas) obedece a distintas señales. Tomadas y modificadas de Kang et al., 2009 y Grebe, 2012.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han aislado y estudiado numerosas líneas mutantes en las que se afectan los tipos celulares en epidermis (ver revisiones en Schiefelbein, et al., 2003, Kang et al., 2009; Benítez et al, 2011, Grebe et al., 2011). Además de esto, existe una gran cantidad de información experimental disponible para este organismo (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>), por lo que el estudio de la formación y arreglo de los tipos celulares en epidermis de *Arabidopsis* es útil para comprender el papel de mecanismos genéticos, ambientales y hormonales en la formación de patrones celulares y en la regulación del desarrollo, así como para estudiar la plasticidad y variabilidad en las plantas.

Los tricomas, del Griego *trichos*, que significa “pelos” (pelos ubicados en la epidermis del tallo y hoja) se encuentran en la superficie de la mayoría de las plantas (Figura 4), abarcando desde helechos hasta angiospermas. Los tricomas presentan una gran variedad de morfologías y funciones; estas incluyen resistencia a herbívoros, reducción de la transpiración, incremento de la tolerancia al frío y protección contra la luz UV, entre otras (Kivimaki 2007). Los tricomas consisten de una sola célula que sobresale de la epidermis de hoja y tallo, generalmente cuentan con dos a tres proyecciones, y se encuentran distribuidos de forma espaciada entre sí, sin formar cúmulos, sugiriendo la existencia de un mecanismo activo de regulación de la distribución espacial y densidad de éstos (Pesch y Hulskamp 2009). En *Arabidopsis*, el número de tricomas se determina antes del crecimiento de la hoja, y su desarrollo comienza cerca de la parte distal de las hojas cuando estas miden aproximadamente 100 μm de largo, continuando basipetalmente. Las células de la epidermis que se diferenciarán en tricomas se identifican por mostrar un incremento en su volumen celular y nuclear. Este aumento en el volumen nuclear está correlacionado con el inicio de la endoreduplicación; en este proceso el núcleo de la célula continúa replicando su ADN durante la diferenciación, alcanzando en promedio un nivel de ADN nuclear de 20C a 32C (Larkin, et al., 2003). La endoreduplicación es una variante común del ciclo celular en el cual la mitosis y la citocinesis son suprimidas, pero los ciclos de replicación del ADN continúan. Posteriormente, el tricoma comienza a expandirse fuera del plano de la epidermis y la ramificación de estos comienza, seguido de la elaboración de una capa celular secundaria gruesa ya en el tricoma maduro (Larkin, et al., 2003). En este trabajo estudiaremos únicamente los mecanismos detrás de la determinación y arreglo espacial de las células que se convertirán en tricomas, dejando de lado los procesos posteriores de endoreduplicación y formación del tricoma.

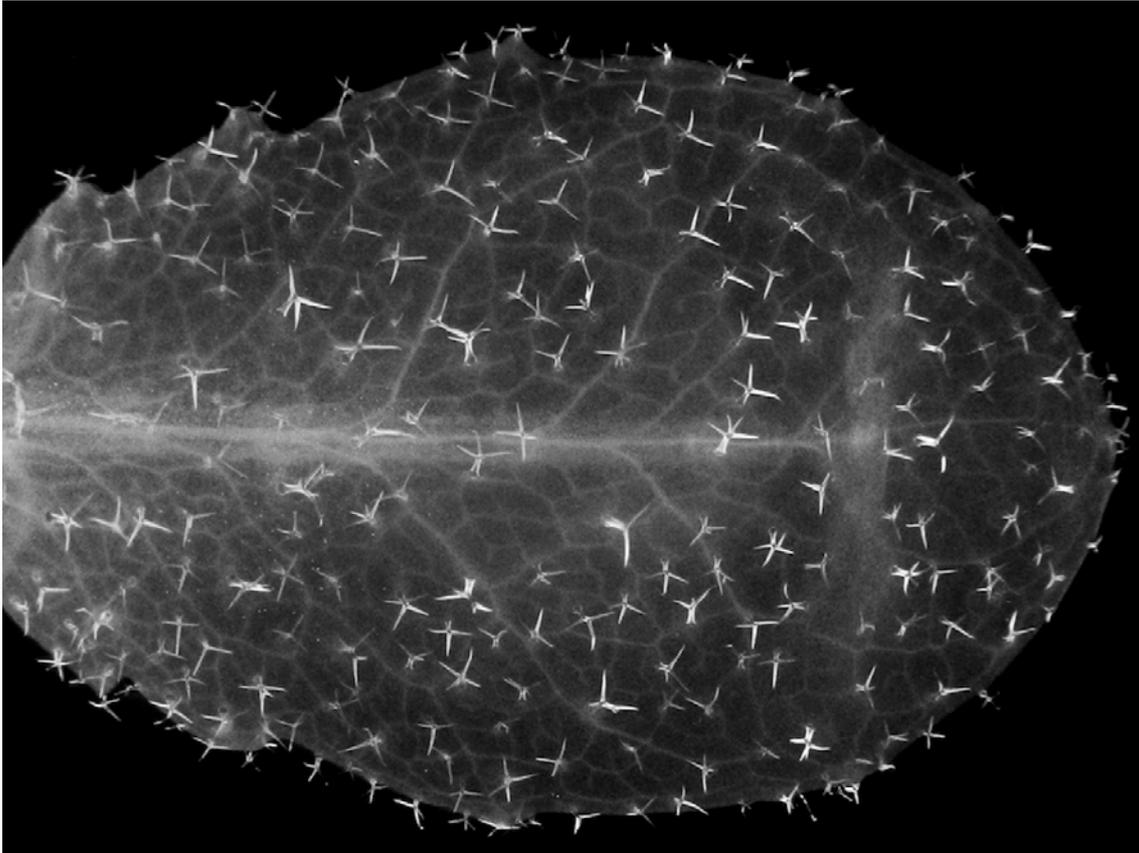


Figura 4. Fotografía de una hoja silvestre ecotipo Columbia de *Arabidopsis*, donde se observan los tricomas resaltados. Debido a su propiedad de birrefringencia, los tricomas pueden ser observados en el microscopio utilizando luz polarizada.

2.1 RED DE REGULACIÓN GENÉTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRICOMAS

Se han sido identificado numerosos genes que regulan la determinación del destino celular y el inicio del desarrollo de los tricomas. El análisis de las mutantes de estos genes los ha agrupado en dos clases; una de reguladores positivos del desarrollo de los tricomas y otra de inhibidores (Pesch y Hülskamp, 2009; Ishida et al., 2008). Entre los reguladores identificados como positivos se encuentran tres clases de proteínas principales: WD40 codificada por *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)*, el factor de transcripción tipo MYB R2R3, codificado por *GLABRA1* y *MYB23*, y los factores de transcripción

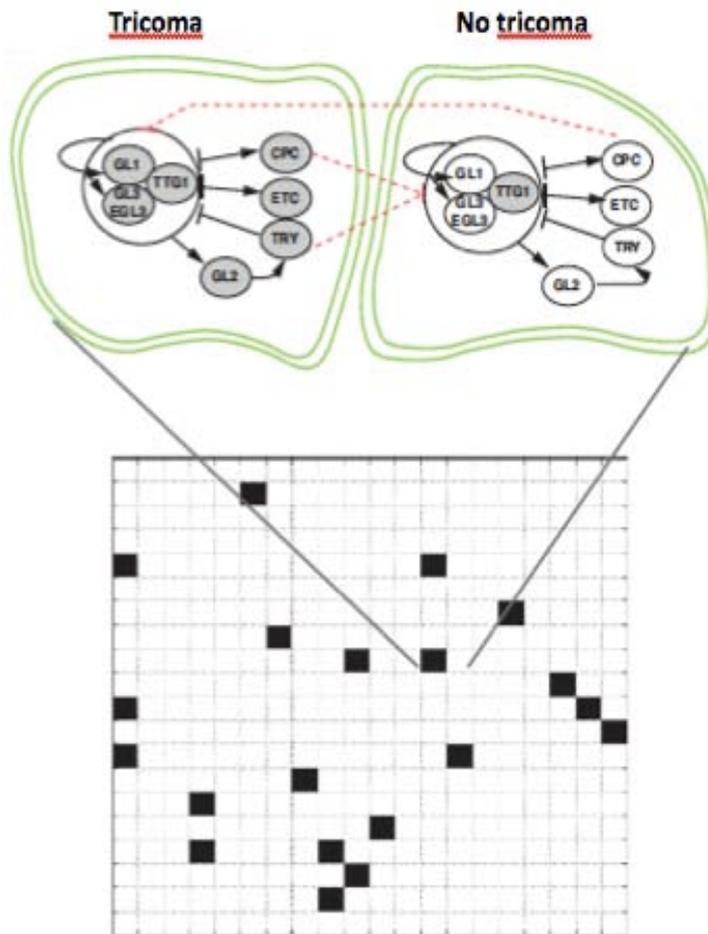
bHLH (basic helix-loop-helix), codificados por *GLABRA3 (GL3)* y *ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)* (Koornneef, 1981; Koornneef et al., 1982; Hülskamp et al., 1994). Entre los reguladores negativos se encuentran los factores de transcripción MYB R3, codificados por una familia de seis genes, *CAPRICE (CPC)*, *TRIPTYCHON (TRY)*, *ENHANCER OF TRY AND CPC1 (ETC1)*, *ETC2*, *ETC3* y *TRICHOMELESS1 (TCL1)*. Por ensayos de dos híbridos se ha demostrado que estas proteínas interactúan entre ellas de una forma característica. GL3 y EGL3 interactúan con TTG1 y GL1 pero GL1 y TTG1 no interactúan entre ellos (Payne et al., 2000; Zhang et al., 2003). Además, se ha demostrado que TRY es capaz de interactuar con GL3 (Schellmann & Hülskamp 2005).

Con base en la información anterior, se ha propuesto un modelo en el que los reguladores positivos forman un complejo MYB/bHLH/TTG dentro de las células. Este complejo promueve la expresión de MYB R3 (reguladores negativos) y del factor de transcripción con homeodominio *GLABRA2 (GL2)*, un regulador positivo de la diferenciación de las células en tricomas; que una vez expresado, las células se diferencian en tricomas. Se ha demostrado que los reguladores negativos son capaces de moverse a las células vecinas y competir con GL1 para unirse a GL3 y así contrarrestar la formación del complejo activador y la activación de *GL2*, inhibiendo así la formación de los tricomas en las células vecinas (Schnittger et al., 1999; Lee and Schiefelbein, 2002; Pesch and Hülskamp, 2004). En el 2008 Benítez y colaboradores propusieron un modelo dinámico de RRG (Figura 4), en el que integran datos experimentales sobre el desarrollo y formación de los patrones de tricomas en la epidermis de *Arabidopsis*. Este modelo reproduce los patrones espaciales observados en la hoja de *Arabidopsis*. Además, los estados estables de la red corresponden con los perfiles de expresión genética observados en las células de la epidermis de hoja (Benítez et al, 2007, 2008).

En este modelo, los nodos de la RRG corresponden a los genes *GL1*, *GL3*, *EGL3*, *TTG1*, *CPC*, *TRY* y *ETC*, los cuales se encuentran en cada una de las células del modelo. Los primeros cuatro forman un complejo (Complejo Activador, CA) que activa la expresión de *GL2*, mientras que los últimos tres

reprimen la formación de este complejo CA; además *GL1* se autorregula positivamente. Por otra parte, el estado de cada nodo depende del estado de los nodos que lo regulan, de esta forma, dadas la reglas lógicas, es posible seguir la dinámica de la red para cualquier condición inicial del estado de expresión de los nodos. El modelo consiste de una rejilla de 20 columnas y 20 filas, en donde cada casilla representa una célula con una RRG. Además de *TTG1*, las proteínas de *TRY* y *CPC* pueden difundirse y moverse a las células vecinas (Balkunde et al., 2010; Wester et al., 2009; Grebe 2012), lo cual se considera en el modelo a través de la simulación de la difusión de estas proteínas entre celdas vecinas, afectando la expresión de los demás genes de la red y dando lugar a una red compuesta por el acoplamiento de las redes de cada celda (Benítez et al, 2007, 2008).

Modelo de desarrollo de tricomas en hoja



Patrón de tricomas de una planta WT simulado

Figura 4. Modelo espacio-temporal de diferenciación celular y formación de patrones postulado por Benítez et al. (2008). Este modelo considera a la epidermis de la hoja como un dominio bi-dimensional conformado por células, cada una contiene una RRG. En esta ilustración (arriba), los componentes de la red que se expresan de manera estable en cada célula se encuentran sombreados (gris). En esta red, los nodos corresponden a factores de transcripción, las flechas representan interacciones de regulación positiva, mientras que las que terminan en **T** representan una regulación negativa. Las líneas rojas representan las interacciones celulares establecidas por los elementos móviles (nodos en rojo). Nótese que la topología general de la RRG en cada célula es la misma. Se ha demostrado que algunos componentes de esta red pueden moverse a las células vecinas a través de los plasmodesmos, haciendo que la dinámica de la RRG se acople y modifique en cada célula. La dinámica de estas RRG (abajo) es suficiente para reproducir la generación de los patrones celulares en la hoja de Arabidopsis (Tomado de Benítez et al., 2013).

Este modelo logra reproducir el perfil de expresión genética y el patrón espacial observado en las plantas silvestres de Arabidopsis. Además, al simular mutantes en la RRG, los resultados coinciden con los fenotipos observados en mutantes de Arabidopsis. Por otra parte, el modelo es capaz de poner a prueba ciertas hipótesis y generar predicciones respecto al comportamiento del sistema (Benítez et al., 2008, 2011). Sin embargo, el modelo de Benítez et al., 2008 no integra la información experimental que describe la forma en que los elementos de la RRG responden ante factores tales como las vías de señalización hormonal o variables ambientales como estrés y herbivoría. Por lo tanto, este modelo no permite simular las diferencias en la dinámica de la RRG ante cambios externos, ni determinar si dichas diferencias producen la plasticidad fenotípica reportada en la literatura científica.

CAPÍTULO 3

3. LAS HORMONAS Y EL AMBIENTE EN LA DETERMINACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES EN *Arabidopsis thaliana*

Hay diversas hormonas involucradas en el desarrollo de las plantas, que presentan un gran número de funciones tanto en la regulación fisiológica como en las respuestas al estrés durante su crecimiento y desarrollo. Las auxinas (AUX), citoquininas (CK), giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BR), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y el etileno, entre otras, se encuentran entre las principales hormonas vegetales (Taiz & Zeiger, 2006). Estas son moléculas pequeñas con estructuras químicas análogas a algunos metabolitos primarios o secundarios (Oliva et al., 2013). Por ejemplo, las giberelinas y brasinoesteroides son capaces de promover la expansión de las células a lo largo del eje longitudinal; el ácido abscísico induce el estado fisiológico de dormancia, mientras que las auxinas controlan la actividad meristemática; las citoquininas controlan principalmente el crecimiento a través de la regulación de la división celular y la diferenciación; el ácido jasmónico está mayormente involucrado en la defensa de las plantas contra herbívoros y el etileno es necesario durante la maduración de los frutos carnosos (Alabadí et al., 2009; Jaillais & Chory, 2010). Se ha observado además que la actividad de diferentes hormonas puede sobrelaparse y afectar mutuamente la regulación de diversos procesos (Depuydt & Hardtke, 2011). Por ejemplo, se ha reportado que las CK actúan antagónicamente con las auxinas en el control de la actividad meristemática, mientras que el ABA antagoniza la promoción del crecimiento con las GAs y brasinoesteroides (Jaillais & Chory, 2010).

La diferenciación de los tricomas es un proceso que se encuentra significativamente regulado por fitohormonas. A través de diferentes experimentos se ha demostrado que en particular las citoquininas, giberelinas y el ácido jasmónico son capaces de promover la formación de tricomas en

CAPÍTULO 3 | LAS HORMONAS Y EL AMBIENTE

Arabidopsis y otras dicotiledóneas como *Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa*, además de plantas monocotiledóneas como el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays*). Por otra parte se ha demostrado que el ácido salicílico reduce el número y densidad de los tricomas en Arabidopsis (Traw & Bergelson, 2003). A partir de estas observaciones se ha propuesto que los mecanismos básicos de respuesta a estas hormonas deben estar conservados en las plantas, aunque, por otra parte, puede haber diferencias en la respuesta en diferentes plantas; es decir, aunque estas tres fitohormonas promueven la formación de los tricomas, los efectos en la maduración y otros parámetros como el tipo de tricomas (glandulares o filamentosos) que se producen, pueden ser diferentes (Maes & Goossens, 2010).

En Arabidopsis, el inicio en la formación de los tricomas es promovido por la señalización de GA y se ha demostrado que la respuesta a los niveles de GA se relaciona positivamente con el número de tricomas (Chien & Sussex, 1996). Se ha demostrado que la vía de señalización de las GA podría regular positivamente al factor de transcripción GL1 identificado como regulador positivo del desarrollo de tricomas, aunque no es claro si esta regulación es directa o indirecta (Gan et al., 2006). También se ha demostrado que las proteínas DELLA, reguladores negativos de la señalización de GA, interactúan con los factores de transcripción BHLH así como con GL1 (Qi et al., 2014), reprimiendo así la formación de tricomas en la ausencia de giberelinas; aunque no se conoce aún si este efecto es directo o indirecto. Se ha propuesto que GIS actúa sobre GL1 y debajo de SPINDLY (SPY), el cual codifica un represor de la señalización de las GA para promover la diferenciación de los tricomas por esta vía (Jacobsen & Olszewski, 1993; Jacobsen, et al., 1996; Gan et al., 2006). Además de esto se ha encontrado que los genes ZINC FINGER PROTEIN, ZFP5, GIS2, y ZFP8 pueden tener un papel importante en el control de la diferenciación de los tricomas a través de la señalización de las GA (Gan et al., 2007; Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2011).

El tratamiento con CK en plantas silvestres también produce un aumento en el número de tricomas y se ha propuesto que este proceso requiere de la expresión de ZFP8 y GIS2; este último podría actuar por debajo de SPY y

arriba de *GL1*; además ambos podrían interactuar con *GIS* para integrar la señalización de GA y CK en la regulación de los tricomas (Gan et al., 2007). Por otra parte, podrían existir otras vías alternas a esta que darían los mismos efectos en mutantes, por ejemplo, los factores de transcripción ZFP5, ZFP6 y GIS3, modifican la formación de tricomas a través de las GA y CK y podrían estar actuando sobre GIS, sobre algunos elementos del complejo activador o incluso sobre los factores ZFP8 y GIS2 (Sun et al., 2014).

El AJ y AS juegan un papel importante en la resistencia contra herbívoros y patógenos respectivamente, además de que participan en la formación de los tricomas en *Arabidopsis*. El AJ tiene un papel positivo en la producción de tricomas, y se ha demostrado por medio de ensayos de dos híbridos que las proteínas con dominio JAZ son capaces de interactuar con GL3 (*GLABRA3*), EGL3 (*ENHANCER OF GLABRA3*) y GL1 para reprimir la acumulación de antocianinas y el desarrollo de los tricomas en ausencia del AJ (An et al., 2011; Qi et al., 2011; Traw & Bergelson, 2003). Además, se ha observado que el AS reduce el número y densidad de tricomas en las hojas nuevas de *Arabidopsis*, además de que reduce los efectos positivos del AJ y las GA en la inducción de los tricomas, lo cual sugiere una interferencia negativa entre la señalización de estas vías hormonales.

De manera general, los tricomas realizan dos funciones distintas, proveen una defensa estructural contra los herbívoros y proveen un aislamiento contra el ambiente. Estas dos funciones se observan principalmente a nivel de la hoja. En la planta *Wigandia urens* (Ruiz & Pavón), se ha observado que la presencia y densidad de tricomas está relacionada con la aridez del ambiente y la presencia de herbívoros; además la densidad de los tricomas es mayor durante la época de secas que en la época de lluvias, y esta también se encuentra correlacionada con la temperatura y la radiación fotosintética, entre otros factores, lo que refleja el papel de defensa que presentan los tricomas y su capacidad de generar cambios en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Pérez-Estrada et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios han demostrado que el daño foliar, causado por herbivoría o daño mecánico, es capaz de inducir un aumento en la producción de tricomas y que esta inducción puede ser heredada transgeneracionalmente (Holeski, 2007). Por esta razón, estudiar el papel que tienen las señales ambientales y hormonales en la determinación de los tipos celulares en las hojas, específicamente en Arabidopsis, nos ayudará a entender de mejor manera, cómo surgen y se determinan los tipos celulares, los cuales no están completamente determinados genéticamente, si no que en conjunto con las señales ambientales con las que interactúan son capaces de generar diversas estructuras y fenotipos, los cuales posteriormente, pueden ser parte de diversos procesos de selección y evolución (Figura 5).

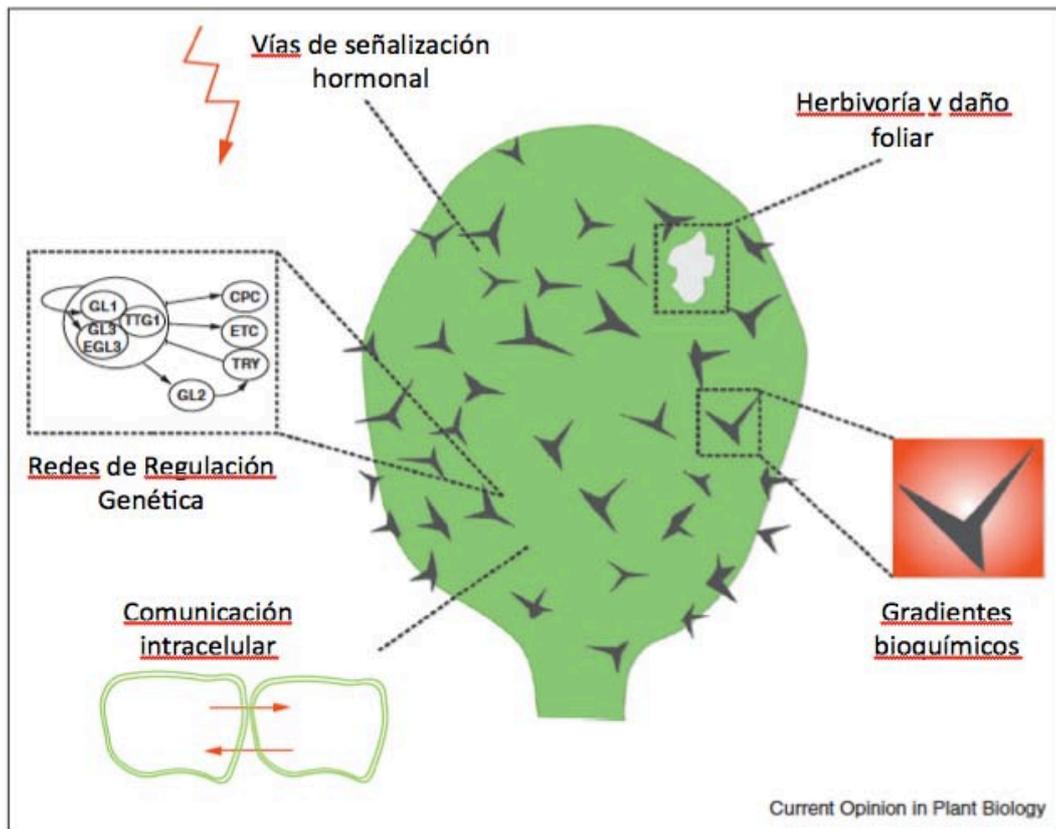


Figura 5. Factores involucrados en el desarrollo de tricomas en Arabidopsis. La diferenciación y el patrón de tricomas emerge de la interacción de diversos factores genéticos y ambientales. En las hojas, este proceso es afectado por la comunicación intracelular, la formación de gradientes bioquímicos, interacciones bióticas (herbívoros) y abióticas, y redes de regulación genética, que a su vez, pueden establecer regulaciones mutuas con algunas vías de señalización hormonal (Tomado de Benítez et al., 2013).

CAPÍTULO 4

4. MODELOS DINÁMICOS EN ECO-EVO-DEVO

Durante las últimas dos décadas se han desarrollado herramientas matemáticas, teóricas y computacionales que permiten cuantificar, modelar, simular y comparar en términos dinámicos los procesos del desarrollo. Además de esto, la acumulación de datos obtenidos de estudios de genómica, genética y biología molecular ha permitido la generación de modelos dinámicos de redes de regulación genética. Estos modelos han sido capaces de explicar, al menos parcialmente cómo surgen y evolucionan los fenotipos y algunos procesos del desarrollo (Von Dassow et al., 2000; Espinosa-Soto et al., 2004; Mendoza et al., 2000; Müller, 2007). A partir de su uso surge una gran cantidad de preguntas nuevas e interesantes como ¿qué pueden decirnos las interacciones entre diversos factores acerca del origen y variación de los fenotipos de un organismo? ¿cómo se originan y cambian las redes durante la evolución? ¿cuáles son las restricciones y posibilidades de la variabilidad fenotípica? ¿cómo es generada? entre otras. Con el uso de estos modelos, muchas de estas preguntas que “in vivo” serían difíciles de responder, podrían llegar a responderse al menos parcialmente.

4.1 MODELOS DINÁMICOS DE REDES DE REGULACIÓN GENÉTICA (RRG)

Existe una diversa variedad de modelos, cada uno de los cuales presenta diferentes limitaciones, fortalezas y dominios de aplicación dependiendo del contexto de las preguntas que se intenta responder y de la cantidad de información acerca del sistema de estudio con la que se cuenta. Al momento de elegir el tipo de modelo con el que se trabajará es importante tomar en cuenta preguntas como ¿para qué escala de tiempo es válido el modelo? ¿con cuánta y con qué tipo de información se dispone (cuantitativa, cualitativa, etc.)? ¿qué supuestos conlleva el modelo? y ¿qué es lo que se espera que el

CAPÍTULO 4 | MODELOS DINÁMICOS EN ECO-EVO-DEVO

modelo pueda predecir? Los modelos dinámicos son utilizados normalmente para obtener un acercamiento a los procesos clave del sistema de estudio, lo cual sería difícil de lograr a través del uso de modelos esquemáticos. Se han propuesto diversas herramientas teóricas para modelar la dinámica de los patrones de expresión genética de los organismos relacionados con los rasgos fenotípicos que presentan. Entre estas herramientas teóricas, destacan los modelos continuos y discretos. En este trabajo nos enfocamos en el uso de los segundos.

Los modelos discretos describen cualitativamente procesos de regulación genética y diferenciación celular. Esta herramienta analiza el estado de expresión de los genes más que la concentración de sus productos. Así, el estado de expresión de un gen dado está representado por una variable discreta (g) que, en el caso Booleano, puede tomar el valor de $g=0$ si el gen no se expresa o su expresión está debajo de un umbral, y $g=1$ si el gen se expresa o está sobre un umbral. En este contexto, el genoma es considerado como un conjunto de N variables discretas, g_1, g_2, \dots, g_N , en donde el valor de cada una de ellas cambia en el tiempo dependiendo del estado de los genes que lo regula.

Los modelos de redes de regulación genética están constituidos por nodos, los cuales corresponden a genes, proteínas, ARNm, etc., que pueden tener relaciones de regulación entre ellos (activación o inhibición). Estas relaciones de regulación son traducidas en un conjunto de funciones discretas o reglas lógicas que determinan el estado de los nodos en un momento particular del tiempo. Estas reglas, que pueden ser inferidas a partir de evidencia experimental, hacen posible seguir la trayectoria de la actividad de una configuración genética a otra, a partir de una configuración genética inicial dada (condiciones iniciales). Las configuraciones pueden ser seguidas hasta que alcancen un estado tal que, dadas las reglas de la red, permanezcan sin cambio. Este estado es comúnmente llamado atractor (Kaufman, 1969; Álvarez-Buylla et al., 2007). Se ha propuesto que estos atractores corresponden normalmente con una configuración genética particular que puede dar origen a un tipo celular (Kaufman, 1969 1993). Así, la arquitectura

de una sola red que funcione como un circuito dinámico, puede alcanzar múltiples tipos celulares, cada uno caracterizado por un conjunto diferente de estados de expresión genética estables (Kaufman, 1993, Figura 6).

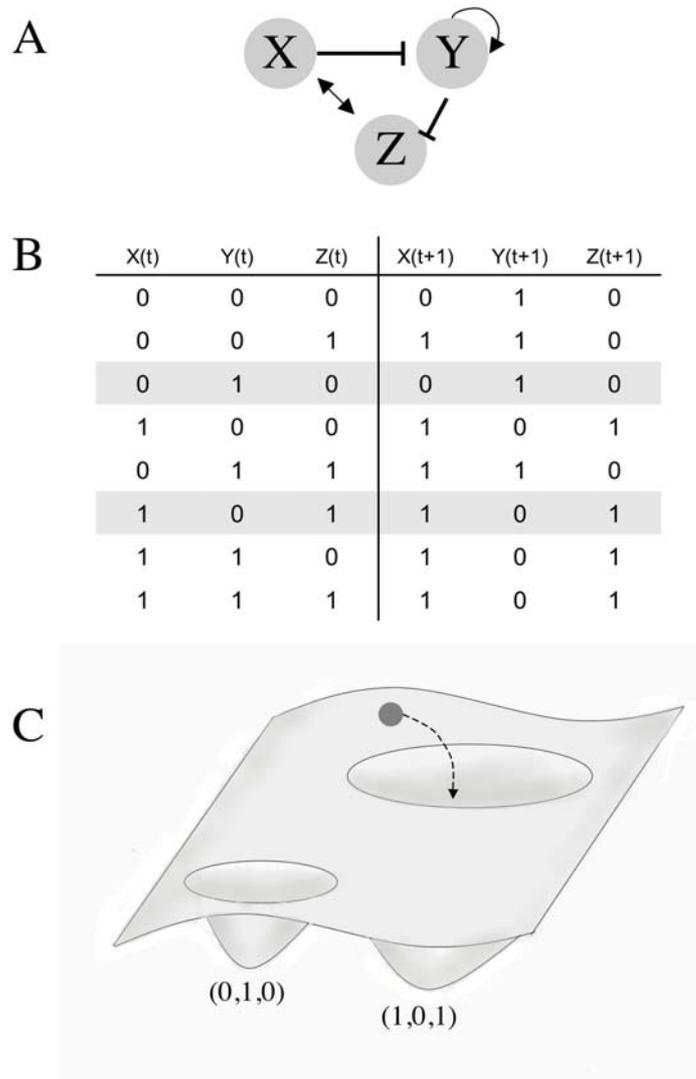


Figura 6. Representación de las reglas lógicas correspondientes a una red de regulación muy simple. En ésta, X, Y y Z corresponden a los nodos de la red. Las flechas corresponden al mecanismo de regulación o reglas de interacción entre los nodos de la red (→ corresponde a activación, mientras que T corresponde a inhibición) (A). En (B) están dadas las reglas lógicas que regulan el estado de los nodos de la red A. En este sistema las variables tienen valores discretos, pueden tener el valor de 0 si están inactivos o de 1 si se encuentran activos. Podemos especificar todas las posibles condiciones del sistema y especificar una función en forma de tabla que muestra el estado que tendrá el sistema en un tiempo $t+1$. Eventualmente, este sistema discreto alcanzará algunos estados estables llamados atractores, los cuales pueden mantener fija su configuración de 0's y 1's (C). Estos atractores pueden representar a su vez diferentes tipos celulares (Kauffman, 1969).

CAPÍTULO 4 | MODELOS DINÁMICOS EN ECO-EVO-DEVO

Con base en lo anterior, en este proyecto se plantea actualizar la red de regulación de determinación de tricomas en *Arabidopsis* (Benítez et al., 2008) e incluir las interacciones con las hormonas involucradas en este proceso, mismas que parecen mediar el efecto de factores ambientales. Esto permitirá explorar y entender mejor la manera en que las complejas interacciones organismo-ambiente afectan el desarrollo y la plasticidad de los fenotipos, aportando en este sentido al programa de investigación de la eco-evo-devo. Una vez ampliada la red y generado el modelo dinámico que nos aproxime a entender como se generan los patrones plásticos de tricomas durante el desarrollo de las hojas, se propondrán experimentos con tratamientos hormonales que permitan validar experimentalmente el modelo, poner a prueba las predicciones que se deriven de su estudio y, a su vez, refinar el modelo propuesto.

HIPÓTESIS

Los datos empíricos disponibles hasta ahora para el sistema de estudio son suficientes para entender el origen y la plasticidad de los patrones epidérmicos de las hojas de *Arabidopsis* en el contexto de la interacción planta-ambiente.

OBJETIVOS

- Actualizar la red de regulación genética de formación de patrones en epidermis de hoja de *Arabidopsis thaliana*.
- Ampliar la red integrando señales ambientales mediadas por señales hormonales.
- Proponer un modelo dinámico que permita entender el desarrollo plástico de los patrones epidérmicos en las hojas de *Arabidopsis* y que provea de predicciones novedosas que retroalimenten el trabajo experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describe el modelo utilizado en este proyecto, el cual es un modelo discreto multivaluado con actualización sincrónica de sus nodos. Así mismo, se presenta una descripción del proceso de obtención de la evidencia experimental utilizada para generar la red y las reglas lógicas.

7.1 MÉTODOS DE MODELADO MATEMÁTICO

7.1.1 ACTUALIZACIÓN DEL MODELO DE DETERMINACIÓN DE TIPO CELULAR EN LA EPIDERMIS DE ARABIDOPSIS

Durante este proyecto, se actualizó la red de regulación propuesta por Benítez y colaboradores (2008). Se realizó una revisión de los datos experimentales disponibles hasta mayo del 2016, acerca de los factores genéticos y hormonales que participan en el desarrollo de tricomas, los cuales corresponden a los nodos e interacciones de la red. Las tablas que sintetizan esta información pueden consultarse en el Anexo I. Para cada nodo se generaron reglas lógicas con base en la evidencia experimental recabada, la cual se basa principalmente en interacciones genéticas y patrones de expresión. Estas reglas pueden consultarse en el Anexo I.

En este trabajo, los datos de expresión de los genes pueden ser traducidos en una regla de interacción positiva o negativa. Por ejemplo, si la pérdida de función de un gen dada por una mutación causa la expresión ectópica o la disminución de un segundo gen, se considera que el gen mutado reprime o activa la expresión del segundo gen, respectivamente. De la misma forma, si la ganancia de función de un gen por una mutación causa el aumento o la disminución de un segundo gen, se considera que el gen sobre expresado activa o reprime la expresión del segundo, respectivamente. Por otra parte, los análisis de epistasis se tradujeron de la siguiente forma: si se tienen dos genes,

X y Y , y la doble mutante (xy) presenta el mismo fenotipo que X , podemos decir que X es epistático sobre Y y que ambos genes se podrían encontrar en la misma vía de señalización. Si la sobre expresión del gen X ($x+$) es capaz de recuperar el fenotipo de la mutante de pérdida de función Y ($y-$) se dice que hay una interacción de regulación positiva y que X se encuentra debajo de Y . Por el contrario, si $x+$ no logra recuperar el fenotipo de la mutante $y-$ se dice que X se encuentra arriba de Y .

Una vez establecidas las interacciones entre los nodos, se generaron las reglas lógicas representadas en tablas de ceros y unos (Anexo I). En la mayoría de los casos los datos experimentales permitieron establecer un tercer estado posible: 2; en este caso, 1 representa un estado intermedio de expresión, 0 se refiere a que no hay expresión y 2 hace referencia a una sobre-expresión. Para la mayoría de los nodos existe evidencia experimental que sustenta las reglas lógicas, sin embargo para aquellos en los que no existe suficiente evidencia para generar las reglas lógicas, se propondrán diferentes alternativas de regulación y cada una se probará en el modelo.

7.1.2 CONSTRUCCIÓN DEL PROGRAMA COMPUTACIONAL

Con el fin de evaluar el modelo generado, se tomó como base un programa en el lenguaje de programación C que simula la dinámica de la red de regulación genética propuesta por Benítez et al., en el 2008. Este modelo simula un dominio bidimensional formado por una rejilla de 20x20 celdas que representan a células de la epidermis. En cada célula está modelada la red de regulación propuesta, y existe comunicación intercelular entre células vecinas a través de elementos de la red que se difunden. Las redes de todas las celdas son idénticas. Este sistema presenta condiciones periódicas en todos los lados del cuadrado. La comunicación celular se modeló mediante una versión discreta de difusión, y representa el movimiento pasivo de proteínas a través de plasmodesmos que comunican a células vecinas. La ecuación para la difusión está dada por:

$$g(t)_{\tau[i][j]} = H(g(t)_{[i][j]}) + D(g(t)_{[i+1][j]} + g(t)_{[i-1][j]} + g(t)_{[i][j+1]} + g(t)_{[i][j-1]} - V(g(t)_{[i][j]})) \quad (1)$$

donde $g(t)_{\tau[i][j]}$ es la cantidad de proteína g en la célula en la posición i,j .

La cantidad de la proteína g depende de la cantidad de proteína producida en la célula i,j , de la cantidad de proteína en las células vecinas que ingresa por difusión y de la cantidad de proteína que sale de la célula por el mismo mecanismo. D es una variable continua que determina la cantidad de g que puede difundir de una célula a sus vecinas. H es una función que convierte los valores continuos de difusión de g en valores discretos entre 0, 1 y 2. V representa a las células vecinas y puede adoptar un valor de 2, 3, ó 4 dependiendo del número de células vecinas hacia los cuales pueden difundir los elementos móviles de acuerdo a su ubicación en la rejilla.

Al implementarse la comunicación celular en el modelo, se tiene un sistema de redes acopladas, ya que los elementos móviles modifican el estado de ciertos elementos de la red en las células vecinas. Por ello este modelo representa un modelo de *meta-red*.

El estado de expresión de cada nodo en un momento determinado t depende del estado de los nodos involucrados en su regulación de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$g_n(t + 1) = F_n(g_1(t), g_2(t), \dots, g_{nk}(t)) \quad (2)$$

donde F_n es una regla lógica que determina el estado de g_n al tiempo $t+1$ en función de sus reguladores g_1, g_2, \dots, g_{nk} al tiempo t .

Una vez calculado el valor de difusión de los elementos móviles, éste se integra a la entrada de las reglas lógicas para calcular el valor de los nodos $g'(t)_{[i][j]}$ los cuales representan a los elementos móviles:

$$g'(t)_{[i][j]} = g(t)_{[i][j]} + g(t)_{[i][j]} - d \quad (3)$$

donde d es un valor de degradación de los elementos móviles. Este valor está dado por una probabilidad dictada por un “dado de 10 caras” de que se le reste 1 a los elementos móviles en una celda dada.

En las simulaciones, el estado de activación de los nodos está dado aleatoriamente, posteriormente se realizaron iteraciones en las que, alternadamente, se actualiza el estado de los genes de cada célula aplicando las reglas lógicas y se difunden los elementos móviles del sistema (Figura 7).

Al inicio de cada simulación, cada una de las células comienza con un perfil de expresión aleatorio para cada gen excepto para los nodos que representan a las hormonas y señales ambientales, los cuales tienen un valor fijo a lo largo de las simulaciones.

Posteriormente se repiten los siguientes tres pasos en 100 iteraciones:

1. Se aplican sincrónicamente las reglas lógicas en la RRG de cada una de las 400 células para actualizar la red (ecuación 2).
2. Se simula la difusión de los elementos móviles (ecuación 1)
3. Se integran los elementos que difundieron en la red para la siguiente iteración (ecuación 3).

Después de las 100 iteraciones, a las células que expresan el gen GL2 se consideran tricomas, mientras que aquellas que no lo expresan son consideradas células cementadas o no tricomas. Los patrones de distribución espacial de los tricomas de las simulaciones y los perfiles de expresión de los

genes de la red en las células fueron comparados con los reportados en la literatura.

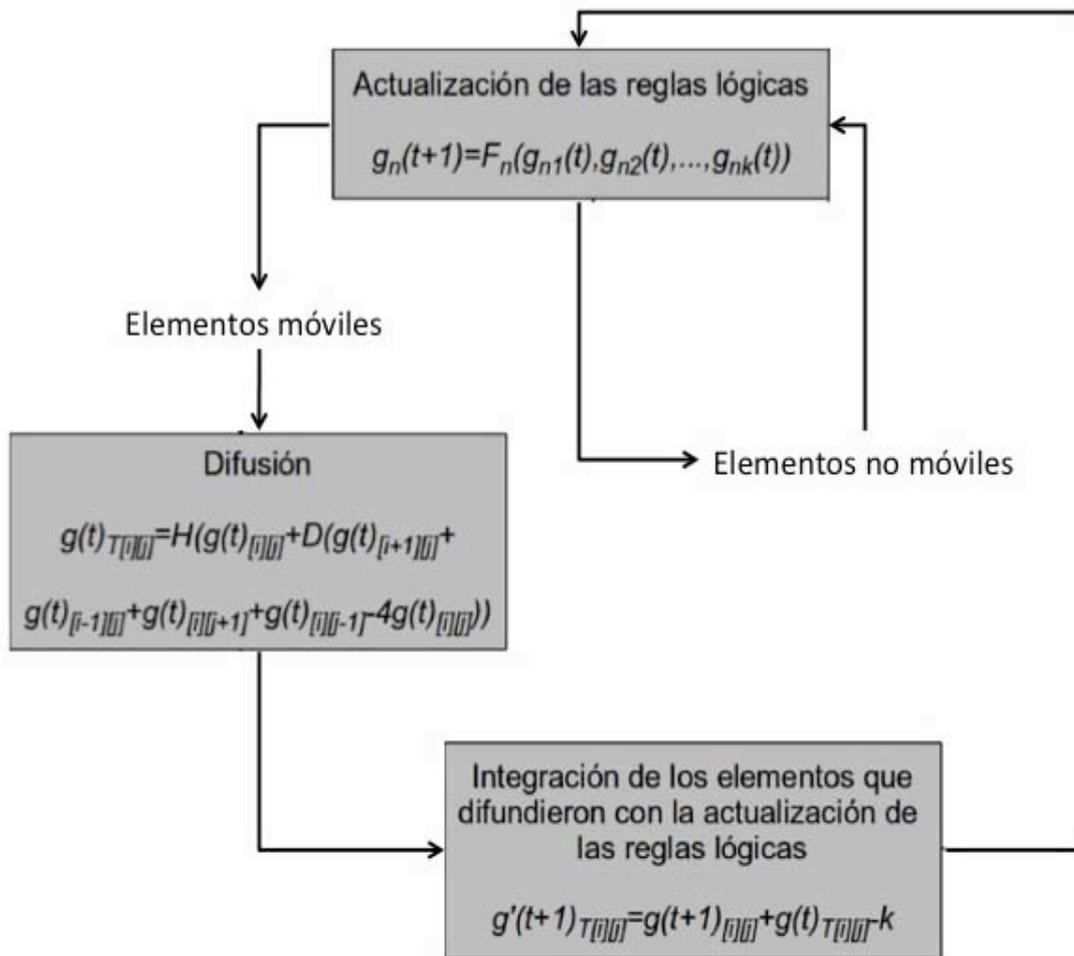


Figura 7. Pasos seguidos para la actualización del estado de expresión de los nodos del modelo. Los elementos no móviles actualizan su perfil de expresión a través de las reglas lógicas (Ecuación 2); mientras que los elementos móviles se actualizan utilizando las reglas lógicas y las funciones de difusión (Ecuaciones 1 y 3).

La red dentro de cada celda está compuesta por los genes *GL1*, *GL3*, *EGL3*, *TTG1*, *CPC*, *TRY*, *ETC1*, 2 Y 3, *TCL1*, *TCL2*, *ATMYC1*, *MYB23*, *GIS*, *SPY*, *TTG2*, *ZFP5*, *ZFP6*, *ZFP8*, *GIS2*, *GIS3*, *SPL9*, *UPL3*, las proteínas *DELLA* y *JAZ*; las vías de señalización hormonal por giberelinas, citoquininas, ácido jasmónico; y el estímulo o factor ambiental de herbivoría.

GI1, *GL3*, *EGL3*, *ATMYC1*, *TTG1* y *MYB23* forman un complejo (complejo activador CA) que regula positivamente la expresión de *GL2*, el cual a su vez, determina el desarrollo de tricomas. *TRY*, *CPC*, *ETC1*, 2 y 3, *TCL1* Y *TCL2* reprimen de forma parcialmente redundante a los activadores del desarrollo de tricomas y, a su vez, estos inhibidores son regulados positivamente por los activadores. Los genes *ETC1*, 2 y 3 se condensaron en un sólo nodo llamado ETC debido a que presentan una gran similitud en su estructura genética y presentan una gran redundancia en su actividad. De la misma forma *TCL1* y *TCL2* se condensaron en un sólo nodo llamado TCL. *TTG1*, *TRY* y *CPC* corresponden a los elementos móviles de la red.

Los genes *GIS*, *SPY*, *TTG2*, *ZFP5*, *ZFP6*, *ZFP8*, *GIS2*, *GIS3*, *SPL9*, *UPL3*, las proteínas *DELLA* y *JAZ* y miR156, corresponden a los nuevos nodos en la red actualizada. *GIS*, *SPY*, *ZFP5*, *ZFP6*, *ZFP8* y *GIS2* pueden regular el efecto de las hormonas giberelinas y citoquininas, por lo que se encuentran dentro de la red, regulados por las hormonas y regulando a su vez la expresión de los activadores (ver Anexo I).

7.1.3 SIMULACIÓN DE LÍNEAS MUTANTES Y EFECTO DE CAMBIOS EN LAS VARIABLES AMBIENTALES.

Con el fin de validar el modelo, se simularon las líneas mutantes reportadas experimentalmente. La simulación de la pérdida y/o ganancia de función de un nodo de la red se llevó a cabo al fijar el estado de expresión del gen correspondiente a un valor de 0 ó 2, respectivamente.

Para simular el efecto de las hormonas involucradas en este proceso, éstas se consideraron como nodos dentro de la red y se formalizaron interacciones entre estos y la expresión de los genes de la RRG. De esta forma, se representó la concentración de GA, AJ, y CK, las cuales pueden tomar valores discretos de 0, 1 ó 2, dependiendo de la información experimental reportada, y se probó su efecto sobre la dinámica de la red.

7.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

A través de tratamientos hormonales con citoquininas (6BA) y giberelinas (GA3), se pusieron a prueba algunos resultados del modelo. Como se describirá a continuación, se realizaron aspersiones de CK y GA y la combinación de estas dos a plantas silvestres del ecotipo Columbia y a plantas transgénicas DEX inducibles que sobreexpresan CK (sistema pOp/LhG4) (Craft J., et al., 2005). El efecto de la combinación de estos dos tratamientos hormonales en la determinación de tricomas en la epidermis de las hojas en *Arabidopsis* aún no ha sido reportado, por lo que este trabajo representa un buen inicio para explorar los posibles efectos.

Para todos los análisis fenotípicos, se sembraron 60 plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia Col-0, y 60 plantas transgénicas del sistema pOp/LhG4. Las semillas esterilizadas fueron estratificadas en agua y se sometieron a un proceso de estratificación a 4°C durante 3 días. Posteriormente se sembraron en macetas con suelo comercial (SunGRO Metro-mix 200, Scotts, Inc.) y se trasladaron a un cuarto de crecimiento, donde fueron crecidas a 22±2°C bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad).

Para realizar los experimentos de inducción por las hormonas, las plantas se dejaron crecer hasta que emergiera la cuarta hoja de roseta. Posteriormente, se realizaron aspersiones de las hormonas CK y GA dos veces por semana en las siguientes concentraciones:

- 100 µM y 10µM GA3 (Giberellin, A3; #G-1025, Sigma-Aldrich).
- 100 µM y 10µM 6BA (Cytokinin, 6-benzylamino-purina. BA, Sigma).
- 100 µM y 10µM GA3 y 100 µM y 10µM 6BA en combinación.
- Solución mock (solución con etanol al 0.1%).

Los experimentos con cada concentración hormonal se realizaron por separado.

Por cada tratamiento se utilizaron 15 plantas de la siguiente forma:

- 15 plantas ecotipo Col-0 con 100 μ M y 10 μ M de GA3
- 15 plantas ecotipo Col-0 con 100 μ M y 10 μ M de 6BA
- 15 plantas ecotipo Col-0 con 100 μ M y 10 μ M de GA3 y 100 μ M y 10 μ M de 6BA en combinación
- 15 plantas ecotipo Col-0 con 100 μ M y 10 μ M de solución mock.
- 15 plantas DEX inducibles IPT (sistema pOp/LhG4) con 100 μ M y 10 μ M de GA3.
- 15 plantas DEX inducibles IPT (sistema pOp/LhG4) con 100 μ M y 10 μ M de 6BA
- 15 plantas DEX inducibles IPT (sistema pOp/LhG4) con 100 μ M y 10 μ M de GA3 y 100mM de 6BA en combinación
- 15 plantas DEX inducibles IPT (sistema pOp/LhG4) con 100 μ M y 10 μ M de solución mock.

Una vez que las plantas asperjadas contaban con 10 a 12 hojas se procedió a coleccionar la hoja de roseta número 10 para su análisis.

Las hojas coleccionadas se sometieron a un proceso de aclarado, el cual se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Las hojas coleccionadas se sumergieron en Etanol al 70% por 48 h, posteriormente, se trasladaron a una solución de Ácido láctico, y se dejaron ahí por 15 min.

Las hojas aclaradas se montaron en portaobjetos cuidando que el lado adaxial de cada hoja se encontrara hacia arriba. Posteriormente se colocaron dos filtros polarizados, bajo y sobre el portaobjetos, y se procedió a la toma de fotografías utilizando un microscopio estereoscopio con luz polarizada y una cámara digital. Las imágenes obtenidas muestran a los tricomas en alto contraste y se analizaron utilizando el programa TRICHOMENET (<http://www.trichomenet.com> Pomeranz et al., 2013), el cual permite la cuantificación del número y densidad de tricomas.

8. RESULTADOS

Como resultado de la información experimental revisada se amplió el modelo de Benítez et al., 2008, y se integraron 16 nuevos genes a la red. Los genes incluidos fueron: *AtMYC1*, *atMYB23* (*MYB23*), *TRICHOMELESS1*, *TRICHOMELESS 2*, *TRICHOMELESS 3*, (*TCL1*, 2 y 3), *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS* (*GIS*) *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS 3* (*GIS3*), *ZINC FINGER PROTEIN 5* (*ZFP5*), *ZINC FINGER PROTEIN 6* (*ZFP6*), *ZINC FINGER PROTEIN 8* (*ZFP8*), *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS 2* (*GIS2*), *SPINDLY* (*SPY*), *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE* (*SPL9*), *UBIQUITIN PROTEIN LIGASE 3* (*UPL3*), DELLA PROTEINS (DELLAs), y JASMONATE-ZIM PROTEINS (JAZ). El modelo incluye también a los genes considerados en el modelo de Benítez et al., 2008, los cuales son *GL2*, *GL1*, *GL3*, *EGL3*, *TTG1*, *CPC*, *TRY* y *ETC*, el cual condensa parcialmente la actividad redundante de los genes *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE 1*, 2 y 3 (*ETC1*, 2 y 3). En el modelo actualizado, los genes *TCL1*, 2 y 3 debido a la redundancia en sus funciones se condensaron también en un solo nodo llamado *TCLs*. Con esto, la red presenta en total 21 nodos que representan genes. Se incluyó también un nodo que representa al Complejo Activador (CA), tres nodos para las vías de señalización hormonales, que representan a las Giberelinas, Citoquininas y Ácido Jasmónico, y un nodo que representa la señal ambiental de la herbivoría y el cambio de fase de la planta (edad). En total, la red cuenta con 27 nodos, que incluyen genes, señales hormonales y ambientales (Figura 8).

Esta red contiene además los elementos móviles descritos en el modelo de Benítez et al., 2008. La difusión de las proteínas *TTG1*, *CPC* y *TRY* desde una célula hacia las células vecinas conecta a las redes de todo el sistema y modifica la dinámica en cada célula. Este acoplamiento de las redes es conocido como meta-red (figura 9).

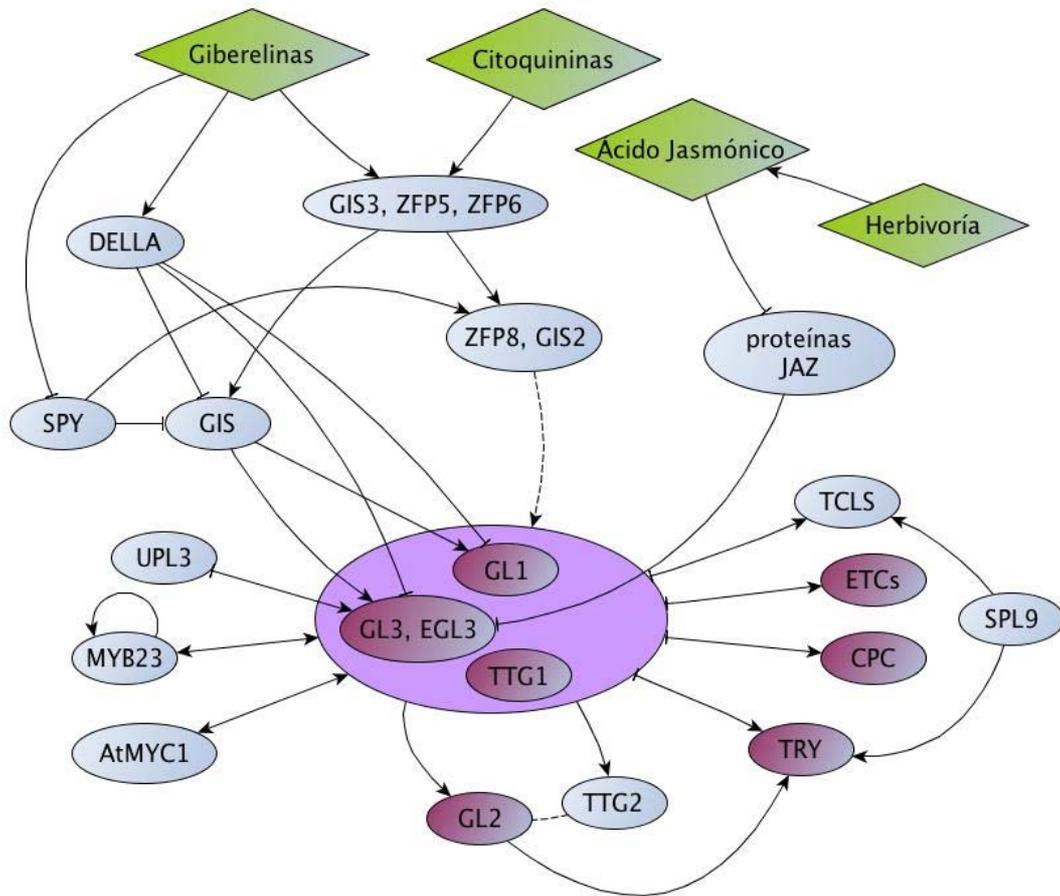


Figura 8. Red actualizada con la información experimental disponible hasta enero del 2016. Los nodos en color morado corresponden a los elementos considerados en la red propuesta por Benítez, et al., 2008. Los nodos en color azul corresponden a los nuevos genes, factores de transcripción y proteínas incorporados a partir de la búsqueda en la literatura. Los nodos en color verde corresponden a las hormonas y señales ambientales involucrados en el desarrollo de tricomas e incorporados a esta nueva red.

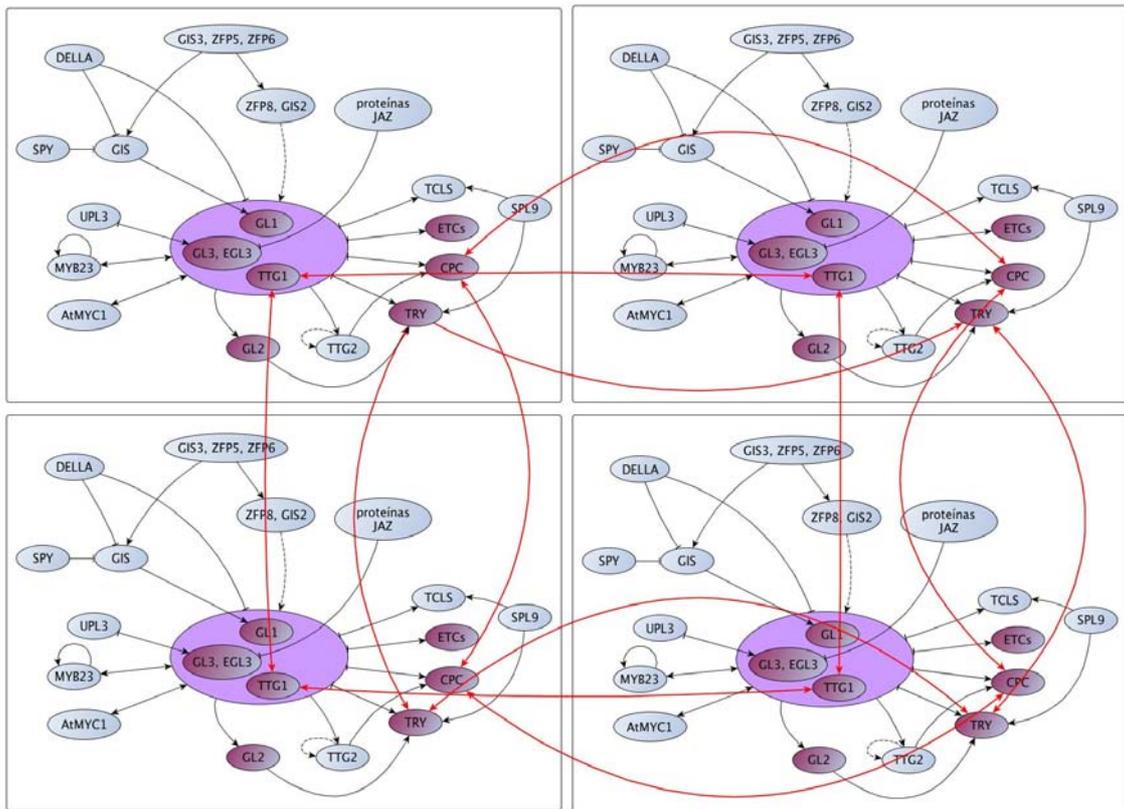


Figura 9. Las redes de regulación de las células se conectan con las redes de las células vecinas por medio de los elementos que difunden formando una Meta-red. Las flechas rojas indican la difusión de los elementos móviles. En esta imagen no se muestran las señales ambientales y hormonales.

8.1 DEFINICIÓN DE LOS NODOS Y LA REGLAS LÓGICAS DE LA RED DE REGULACIÓN (RR).

8.1.1 FORMACIÓN DEL COMPLEJO ACTIVADOR (CA).

Se ha propuesto que los factores de transcripción, GL1, GL3 y EGL3, se unen junto a TTG1 y forman un complejo capaz de activar la transcripción de genes río abajo que promueven el desarrollo de tricomas. La proteína atMYB23 (MYB23) pertenece a la misma familia MYB que GL1, y comparte con ésta un 57% de la secuencia de aminoácidos, incluyendo un 97% de identidad en el dominio N-terminal R2R3 y un 68% en el dominio de activación de la

transcripción C-terminal (Lee y Schiefelbein 1999, 2001). Estudios de sobre expresión y análisis de patrón de expresión sugieren que *MYB23* podría tener una función similar a *GL1* (Kirik et al., 2001). La doble mutante de *gl1 myb23* muestra un fenotipo completamente glabro, desprovista totalmente de tricomas en las orillas de la hoja, a diferencia de la mutante *gl1*, la cual si llega a presentar tricomas en las orillas, indicando que existe una redundancia funcional entre *GL1* y *MYB23* (Kirik et al., 2005). Por otra parte, un experimento realizado con las plantas transgénicas *GL1::MYB23 gl1 gl1* y *GL1::MYB23 gl1 myb23-2*, mostró que el patrón y el número de tricomas era similar al de una planta silvestre, indicando que la proteína de *MYB23* posee la misma actividad bioquímica necesaria para el inicio del desarrollo de tricomas al igual que la proteína de *GL1*, por lo tanto durante este proceso las proteínas de *GL1* y *MYB23* son funcionalmente intercambiables y las diferencias en la función de estos genes durante la formación del patrón de tricomas es debida a diferencias en la regulación transcripcional (Kirik et al., 2005). Ensayos de dos híbridos también demostraron que *MYB23* interactúa con *GL3* pero no con *TTG1*, e interactúa con a través del mismo dominio que *GL1* (Payne et al., 2000). Por otra parte, al analizar temporal y espacialmente la expresión de *GL1* y *MYB23* se encontraron dos diferencias. Primero, *GL1* se expresa inicialmente en hojas jóvenes, mientras que *MYB23* no, y segundo, *MYB23* se expresa en todas las etapas del desarrollo de tricomas, mientras que la expresión de *GL1* se detiene antes de que el desarrollo de tricomas esté completado (Kirik et al., 2005).

Con base en estos resultados, se propone que *GL1* tiene un papel primario en el desarrollo de tricomas a través de la formación del CA, mientras que *MYB23* tiene un papel secundario y puede formar también parte del CA, siendo así funcionalmente equivalente en el complejo formado por *GL1*. Esto podría a su vez proporcionar robustez al sistema de diferenciación celular de tricomas en *Arabidopsis*.

AtMYC1, es el cuarto miembro de la subfamilia R/B-like IIIf de los factores de transcripción bHLH en *Arabidopsis* (Urao et al., 1996). Es un blanco directo de *GL3* (Morohashi & Grotewold 2009) y se ha observado que interactúa con *GL1*

a través de ensayos de dos híbridos (Zimmermann et al., 2004). Por otra parte también se ha demostrado que *AtMYC1* es una importante fuente de variación para la determinación de tricomas en diferentes ecotipos de *Arabidopsis* (Symonds et al., 2011, Zhao et al., 2012). *AtMYC1* participa en la formación de patrones en la epidermis, específicamente como un regulador positivo del desarrollo de tricomas ya que la mutante *atmyc1* presenta una disminución en el número de éstos (Symonds et al., 2011; Zhao et al., 2012). Experimentos de intercambio de promotor han mostrado que *GL3/EGL3* pueden reemplazar la función de *AtMYC1*, mientras que *AtMYC1* no es capaz de recuperar la mutante *gl3 egl3*, lo cual sugiere una redundancia pero también una divergencia en sus funciones (Zhao et al., 2012, Pesch et al., 2013). Como se mencionó anteriormente, *AtMYC1* ha sido agrupada filogenéticamente junto a *GL3* y *EGL3* en el subgrupo IIIf de las proteínas bHLH (Heim et al., 2013). Análisis de dos híbridos han mostrado que *AtMYC1* además de interactuar con *GL3* también puede interactuar con *CPC*, *TRY*, *TTG1*, *GL1* y *MYB23* (Zimmermann et al., 2004; Tomiaga et al., 2008; Zhao et al., 2012).

Con base en lo anterior, *AtMYC1* puede ser parcialmente redundante aunque también con funciones distintas a *GL3/EGL3* durante el desarrollo de tricomas, probablemente a través de la regulación de la expresión de *GL2*. Al igual que *MYB23*, tiene un papel secundario comparado con el de *GL3/EGL3* y podría también formar parte del CA, proporcionando variación durante la determinación de tricomas. Así, en este modelo proponemos que el CA está conformado por *GL1* y *MYB23*, el cual tiene una función redundante con éste, *GL3/EGL3* y *AtMYC1*, el cual también presenta una función redundante y distinta con *GL3/EGL3*, y por *TTG1* (Figura 10).

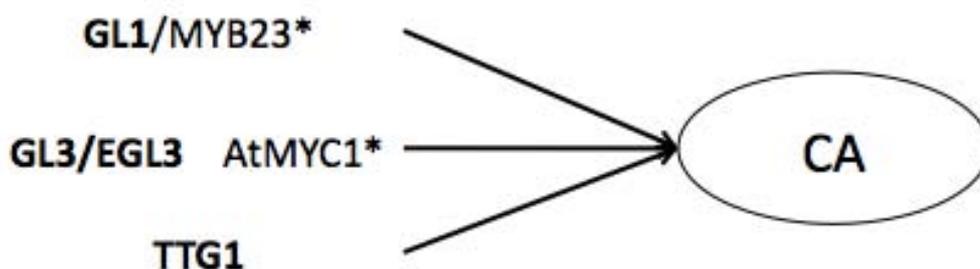


Figura 10. Factores que contribuyen a la formación y función de CA. El asterisco indica un supuesto del modelo basado en la evidencia experimental. En negritas se señalan los elementos que son más importantes en la regulación.

8.2 REGULACIÓN DE LOS INHIBIDORES Y SU PARTICIPACIÓN EN LA RED DE REGULACIÓN.

Los factores de transcripción R3 MYB son proteínas pequeñas de aproximadamente 100 aminoácidos, contienen un dominio MYB de unión a ADN, y han sido caracterizados como reguladores del desarrollo de tricomas y tricoblastos (Wang & Chen, 2014). En *Arabidopsis*, existen un total de siete genes que codifican factores R3MYBs, entre los cuales están *TRY*, *CPC*, *TCL1*, *TCL2*, *ETC1*, *ETC2* y *ETC3* (Wada et al., 1997, Kirik et al., 2004, Wang et al., 2007, Tomiaga et al., 2008). Todos estos factores contienen un dominio conservado ([D/E]L×2[R/K]×3L×6L×3R) necesario para la interacción de los R3 MYBs con los factores de transcripción bHLH (Zimmerman et al., 2004), y una secuencia motivo (WxM), la cual es necesaria para el movimiento intracelular de CPC (Kurata et al., 2005). Como se mencionó anteriormente, la formación de tricomas es controlada por la interacción entre estos factores R3 MYB y los diferentes factores de transcripción que forman el CA. En este modelo se propone, basados en la información experimental, que *TCL1*, *TCL2*, *ETC2* y *ETC3* juegan un papel redundante y secundario durante el desarrollo de tricomas, ya que *CPC* y *TRY* son los que presentan los fenotipos más drásticos. Sin embargo, ya que las mutantes dobles, triples y cuádruples de estos factores llegan a presentar fenotipos más drásticos y aditivos en cuanto a un aumento en el número de tricomas (Ver anexo A) se integraron al modelo formando parte de los inhibidores. En este modelo, la acción de los factores inhibidores se representó como un solo nodo llamado Complejo Inactivador (CI) (Figura 11).

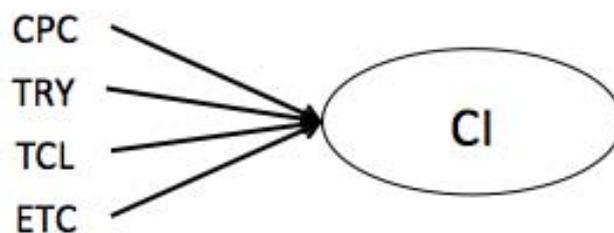


Figura 11. Los factores R3 MYBs regulan negativamente el desarrollo de tricomas y dada la redundancia en sus funciones su mecanismo de acción se representó en un solo nodo (CI).

8.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS NUEVOS NODOS INCORPORADOS A LA RED.

Al incorporar los demás nodos a la red, la mayoría de las relaciones nuevas que se proponen son lineales o de cascada, esto debido al tipo de evidencia experimental con la que se cuenta, la cual en algunos casos es poca y por otro lado, corresponde principalmente a experimentos de expresión genética, análisis de mutantes dobles, triples, (etc.) interacción proteína-proteína, entre otras.

8.3.1 ZINC FINGER PROTEIN6/ ZINC FINGER PROTEIN5/ GLABROUS INFLORESCENCE STEMS3

Las proteínas Zinc finger, son factores de transcripción importantes que controlan el desarrollo de las células vegetales (Zhou et al., 2013). Regulan la expresión de genes al unirse específicamente a proteínas blancas, ADNs y ARNs (Englbrecht et al., 2014). Se ha encontrado que ZFP5, ZFP6 y GIS3 son importantes factores que regulan el inicio del desarrollo de tricomas al integrar la señalización de las giberelinas y citoquininas (Gan et al., 2006, 2007, Zhou et al., 2011). Al analizar la producción de tricomas en las ramas laterales y hojas caulinares en las mutantes de *gis3*, *gis3zfp5*, *gis3zfp6* y *gis3zfp5zfp6* se

observó que el número de tricomas disminuyó en comparación con las plantas Wt en respuesta a un tratamiento con citoquininas (Sun et al., 2014). Por otro lado, las líneas de sobre expresión de *GIS3*, *ZFP5* y *ZFP6* muestran fenotipos similares, un aumento en la densidad de tricomas, principalmente en el tallo de inflorescencia y los órganos florales internos (Zhou et al., 2011, 2013). Al analizar la expresión de estos genes en un tratamiento con GA y CK, se observó que la expresión de estos aumenta, sugiriendo que la expresión de *GIS3*, *ZFP5* y *ZFP6* es inducida por GA y CK (Sun et al., 2014). Al analizar la actividad de la proteína GUS en las plantas *pGIS3:GIS*, se observó que la actividad de éste aumenta significativamente después de un tratamiento con GA y CK, indicando que la señalización de estas hormonas puede inducir la expresión de *GIS3* al nivel de proteína (Sun et al., 2014). Al analizar la expresión de *ZFP5* y *ZFP6* en las mutantes *gis3* y *35S:GIS3*, los resultados mostraron que la expresión de estos genes no es significativamente diferente del control Wt. De forma similar, la expresión de *GIS3* permanece en niveles similares en las mutantes *zfp5*, *zfp6*, *35S:ZFP5*, *35S:ZFP6*, lo cual podría indicar que estos genes funcionan en una jerarquía genética lineal (Sun et al., 2014). Al analizar la expresión de *GL1* y *GL3* en los órganos de inflorescencia de *gis3*, *zfp5* y *zfp6* y *35S:GIS3*, *35S:ZFP5*, y *35S:ZFP6*, se observó que su expresión disminuye en las mutantes de pérdida de función, mientras que en las mutantes de sobre expresión, la expresión de *GL1* y *GL3* aumenta significativamente. Estos resultados indican que estos genes actúan río arriba del complejo activador del inicio de desarrollo de tricomas. Por otro lado, al analizar la expresión de *GIS*, *GIS2* y *ZFP8* en estas mismas líneas, se observaron resultados similares, indicando que *GIS3*, *ZFP5* y *ZFP6* actúan río arriba de *GIS*, *GIS2* y *ZFP8* (Sun et al., 2014). También se observó que *GIS* y *GIS2*, son blancos directos de *GIS3* (Sun et al., 2014).

8.3.2 SPINDLY

SPY codifica una transferasa β -*N*-acetilglucosamina O-linked y juega un papel represivo en la señalización de Giberelinas (Jacobsen et al., 1996). Las mutantes de *spy* muestran un fenotipo de floración temprana y un crecimiento

acelerado, el cual es altamente similar al fenotipo observado en plantas tratadas con GAs (Jacobsen & Olsen, 1993). Además, la mutante produce más tricomas en las hojas de roseta e inflorescencias (Chien Sussex, 1996; Perazza et al., 1998). Al analizar el efecto de las GAs sobre *SPY* se observó que, las GAs no afectan los niveles de ARNm de *SPY*, sin embargo, las GAs pueden reprimir la actividad de *SPY*, ya que la aplicación exógena de GA suprime las respuestas observadas causadas por la sobre expresión de *SPY* (Greenboim-Wainberg et al., 2005). Esta información sugiere que a bajos niveles de GA, las respuestas a esta hormona son reprimidas, entre otros factores, por *SPY*. Cuando los niveles de GA aumentan, la actividad de *SPY* es reprimida, y las respuestas de la planta a las GA se promueven (Greenboim-Wainberg et al., 2005).

8.3.3 GLABROUS INFLORESCENCE STEMS

GIS es un gen que codifica un factor de transcripción C2H2, el cual regula diferentes aspectos de la maduración del tallo en *Arabidopsis*. Análisis de mutantes de pérdida y ganancia de función indican que *GIS* juega un papel central en el control del inicio del desarrollo de tricomas durante el desarrollo de inflorescencias. Por otra parte, *GIS* también juega un papel importante en la regulación de la diferenciación de la epidermis durante la fase vegetativa, y esta función es aún más clara cuando la señalización por Giberelinas es alterada. Múltiples líneas que sobre expresan a *GIS* (*35S:GIS*) muestran una densidad alta de tricomas en los órganos de inflorescencia y hojas caulinares (Gan et al., 2006). Al estudiar la posición de *GIS* en el proceso del desarrollo de tricomas, y sobre expresan a *GIS* en los mutantes *gl1*, *gl3* y *ttg1*, se observó que la sobre expresión de *GIS* no es suficiente para rescatar el inicio del desarrollo de tricomas en estas mutantes, por lo cual se propone que *GIS* actúa río arriba del complejo activador del inicio de tricomas (CA) (Gan et al., 2006). Al analizar como las fluctuaciones en los niveles de giberelinas afectan el fenotipo de *gis* se observó que la diferenciación de las células de la epidermis es menos sensible a la aplicación de GAs en la mutante, indicando

que la mutante presenta una sensibilidad alterada a las GAs (Gan et al., 2006). Por otra parte se ha demostrado también que la pérdida de GAI y otras proteínas DELLA, las cuales son reguladores negativos de la señalización de Giberelinas, restaura la expresión de *GIS* a los niveles de la planta silvestre (Gan et al., 2007). Al analizar la interacción entre *GIS* y los componentes de la vía de señalización de GAs, se observó que en la doble mutante *gis spy* la producción de tricomas en las hojas de roseta es similar a la observada en la mutante *spy*. Por otra parte, al analizar la expresión de *GIS* en la mutante *spy*, se encontró que ésta aumenta, mientras que la expresión de la expresión de *SPY* no se ve afectada en la mutante de *gis*. Esto indica que *SPY* puede estar involucrado, directa o indirectamente, en la represión de *GIS*, sugiriendo que *GIS* actúa río abajo de *SPY*. (Perazza et al., 1998; Gan et al., 2006). Por otra parte, se ha observado que en la mutante *zfp5*, *zfp6* y *gis3* la expresión de *GIS* disminuye, mientras que al sobre expresar cada uno de estos tres genes, la expresión de *GIS* aumenta, además, análisis moleculares han demostrado que *ZFP5*, *ZFP6* y *GIS3* actúan río arriba de *GIS* (Zhou et al. 2011, Zhongjing et al., 2012).

8.3.4 ZINC FINGER PROTEIN8/GLABROUS INFLORESCENCE STEMS2

La pérdida de la función de *ZFP8* muestra una significativa reducción en el número de tricomas principalmente en hojas caulinares y ramas, por otro lado, la mutante *gis2* muestra un fenotipo similar, aunque se observa una disminución menor en el número de tricomas en las ramas y hojas caulinares. Al analizar el papel de *GIS2* y *ZFP8* en la vía de señalización de CK, se observó que las mutantes afectan a diferentes grados la respuesta de las citoquininas en el desarrollo de tricomas. Estas observaciones indican que *GIS* y en un menor grado *ZFP8*, son requeridos para la inducción del desarrollo de tricomas por las CK, principalmente en los órganos de inflorescencia (Gan et al., 2007). De la misma forma, al analizar la respuesta del efecto de las GA en las mutantes *zfp8*, *gis2*, se observó que estas mutantes responden en menor

grado a la aplicación de GA, comparada con el control WT, mostrando un fenotipo de tricomas similar al de las mutantes en respuesta al tratamiento hormonal (Gan et al., 2007). Al analizar la expresión de *GL1* y *GL3* en las mutantes *gis2*, *zfp8* y *35S:GIS2* y *35S:ZFP8* se observó que la expresión de estos disminuye en las mutantes, mientras que en la sobre expresión, la expresión de estos genes aumenta, indicando que tanto *ZFP8* y *GIS2*, actúan río arriba del complejo activador del desarrollo de tricomas (Gan et al., 2007). Por otra parte, al analizar la expresión de *ZFP8* y *GIS2* en otros miembros de la familia de factores C2H2 se observó que la expresión de *ZFP8* y *GIS2* disminuye en la mutante *gis3*, mientras que en la línea que sobreexpresa a *GIS3*, la expresión de *ZFP8* y *GIS2* aumenta. En la mutante *zfp5* y *zafp6* la expresión de *GIS2* y *ZFP8* disminuye, mientras que en la sobre expresión de estos aumenta, especialmente la de *ZFP8* (Sun et al., 2014 Zhou et al. 2011, Zhongjing et al., 2012).

8.3.5 TRANSPARENT TESTA GLABRA2

TTG2 codifica un factor de transcripción WRKY y se expresa en hojas jóvenes, tricomas, semillas y tricoblastos en la raíz. LA mutante de *ttg2* muestra entre otros efectos, un fenotipo con defectos en el desarrollo de tricomas (Johnson et al., 2002; García et al., 2005). Al analizar la expresión de *TTG2* en otros reguladores del desarrollo de tricomas se observó que los factores de transcripción R2R3 MYB promueven directamente la transcripción de *TTG2* (Ishida et al., 2007). Se observó que el fenotipo de las mutantes *ttg1-1 ttg2-1* y *gl1-1 ttg2-1* es similar al observado en las mutantes *ttg1-1* y *gl1-1*. Por otro lado en la mutante *gl2 ttg2-1* el fenotipo del desarrollo de tricomas muestra más defectos comparado con la mutante *gl2*. Esto sugiere que *TTG2* funciona río debajo de *TTG1* y *GL1* y que probablemente comparte funciones con *GL2* (Ishida et al., 2007). La expresión de *TTG2* en tricomas y la lámina de las hojas parece ser regulada directamente por los miembros del complejo R2R3 MYB-BHLH *TTG1*. En los tricomas, *GL1-GL3/EGL3-TTG1* puede promover la expresión de *TTG2*, como lo muestra la unión de *GL1* a la región MST de *TTG1* en ensayos de dos híbridos (Payne et al., 2000). Por otro lado, la expresión de

TTG2 disminuye en las mutantes de *gl3*, *egl3*, *gl3 egl3* y *ttg1* (Johnson et al., 2002). Esto sugiere que el complejo activador del desarrollo de tricomas puede regular la expresión de *TTG2*, el cual podría estar involucrado a su vez en la regulación del factor de transcripción GL2 durante la diferenciación de las células de tricoma (Ishida et al., 2007).

8.3.6 SPL9/mir156

Se ha demostrado que miR156 y sus genes blanco, *SQUAMOSA BINDING PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*, participan en la vía de regulación del tiempo de floración. SPL promueve la floración al activar directamente a *LFY* y a un grupo de genes MAD-box (Yamaguchi et al., 2009). Más recientemente se ha observado que los genes *SPL* regulados por miR156, también controlan el desarrollo de tricomas, principalmente en órganos de inflorescencia (Shikata et al., 2009, Yu et al., 2010). Los factores de transcripción SPL suprimen la formación de tricomas al activar directamente la expresión de *TCL1* y *TRY*, posteriormente, el incremento en la expresión de estos genes esta relacionada con una disminución en el número de tricomas en *Arabidopsis* (Yu et al., 2010). Experimentos con análisis CHIP muestran que SPL9 (y probablemente otros genes SPL) regulan positivamente la expresión de *TCL1* y *TRY*, al unirse y activar sus promotores (Yu et al., 2010). Además, al analizar el fenotipo de tricomas en la planta transgénica *Pro35S:MIR156f*, la cual sobre expresa a MIR1156, se observó una producción de tricomas ectópica en el tallo de inflorescencia y en los órganos florales. Por otra parte, un aumento en la expresión de los niveles de *SPL* presenta una disminución en el número de tricomas (Yu et al., 2010).

8.3.7 UPL3

El proteosoma Ubiquitin/26S, proteólisis (UPS)-dependiente juega un papel importante en la regulación de diversos procesos celulares, al regula diversos factores de transcripción (Thomas & Tyers, 2000, Patra et al., 2013). Las UPS

comprende a las enzimas E1, E2 y E3, las cuales son responsables de la poli ubiquitinación de cadenas blanco, las cuales posteriormente son degradadas a través del proteosoma 26S (Stone., 2012, Patra et al., 2013). Al analizar si algunos de los factores de transcripción involucrados en el desarrollo de tricomas son blancos del proteosoma 26S, se observó que GL3 y EGL3 son blancos del proteosoma. Al analizar la expresión de *UPL3* se observó que ésta es similar a la expresión de *GL3* y *EGL3*, por otro lado, se observó que las proteínas recombinantes *GL3* y *EGL3* son más estables en extracto de plantas *upl3-3* comparados con el control Wt, además de que la expresión ectópica de *GL3* y *EGL3* en la mutante *upl3-2* resulta en una formación aberrante de tricomas, lo cual podría deberse a una acumulación muy alta de estas dos proteínas (Patra et al., 2013). Estos resultados sugieren que UPL3 media la degradación protosomal de GL3 y EGL3 (Patra et al., 2013). Por otra parte a través de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se mostró que GL3 es capaz de unirse al promotor de UPL3 (Morohashi & Grotewold, 2009). Además se observó que GL3 activa parcialmente la expresión de UPL3, ya que en la mutante de *g/3* se inhibe la expresión de *UPL3* mientras que en la sobre expresión de *GL3* la expresión de *UPL3* aumenta. Estos resultados sugieren la presencia de un *loop* de regulación que involucra a *GL3* y *UPL3*, aunque *GL3* no sea el único regulador de *UPL3* (Patra et al., 2013).

8.3.8 DELLA PROTEINS

Su ha observado que las giberelinas controlan el desarrollo de tricomas (Chien & Sussex, 1996). En la vía de señalización de las GA, los receptores de GA GA-INSENSITIVE DWARF1a/b/c, perciben la señal de las GA y reclutan a las proteínas DELLA las cuales incluyen a RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3 (Griffiths et al., 2006; Murase et al., 2008, Silverstone et al., 1997, Wen and Chang, 2002), para su ubiquitinación y posterior degradación (Qi et al., 2014) La degradación de estas proteínas DELLA en presencia de las giberelinas libera varios factores de transcripción que interactúan con estas proteínas y de esta forma se activan las respuestas de la planta a las GA, (Zhang et al., 2011, Qi et al., 2014).

8.3.9 JASMONATO ZIM PROTEINS

El ácido jasmónico son una clase de hormonas derivadas de lípidos que controlan diversos procesos en el desarrollo, entre los cuales se encuentra la formación de tricomas (Yosida et al., 2009; Qi et al., 2011) y la regulación de diferentes respuestas de defensa en contra de infecciones por patógenos y herbívoros (Yang et al., 2008). La proteína F-box CORONATINE INSENSITIVE (COI1), percibe la señal del AJ y recluta a las proteínas Jasmonate ZIM-domain (JAZ) para su ubiquitinación y subsecuente degradación a través del proteosoma 26S (Yan et al., 2007, Qi et al., 2011, Yosida et al., 2009). Esto ocasiona que la cascada de señalización de AJ se libere y se activen las diversas respuestas derivadas del AJ (Cheng et al., 2011; Song et al., 2011; Zhu et al., 2011; Shan et al., 2012; Nakata et al., 2013, Qi et al., 2014).

La información experimental y las reglas lógicas de todos los nodos de la red puede ser consultada con más detalle en el Anexo I.

8.4. PERFIL DE ACTIVACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE LA RED DE REGULACIÓN

Con el fin de determinar si la red de regulación alcanza un estado estable, se procedió a observar si los perfiles de expresión de los genes GL1, MYB23, GL3, EGL3, AtMYC1, TTG1, CPC, TRY, ETC y TCL, se mantienen estables durante las últimas diez iteraciones en las simulaciones de los ecotipos silvestres en todas las células del sistema. Todos los genes observados mantienen un estado de expresión estable durante las simulaciones (Tabla 2). Al analizarlos, se puede observar que los dos perfiles que se alcanzan un estado estable corresponden con los perfiles de expresión genética característicos de las células de tricoma y no tricoma.

Tabla 2. Perfiles de expresión de los genes de la red durante las simulaciones.

Estado de los elementos										Tipo celular
GL1	MYB23	GL3	EGL3	AtMYC1	TTG1	CPC	TRY	ETC	TCL	
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	TRICOMA
2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	NO TRICOMA

Al observar que la red de regulación génica alcanza estados estables al final de las simulaciones, los cuales corresponden a los perfiles de expresión génica de las células de tricoma y no tricoma, se procedió a analizar si la simulación de genes y tratamientos hormonales en la red lograban reproducir los fenotipos reportados en la literatura

8.5 PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE TRICOMAS OBTENIDOS DE LAS SIMULACIONES.

Las simulaciones de la diferenciación celular de tricomas en el modelo dan lugar a un patrón de distribución espacial similar al observado en las plantas silvestres, es decir, presentan una distribución de tricomas espaciada, sin desarrollar un tricoma adyacente a otro y sin llegar a formar cúmulos. Este patrón de distribución puede ser descrito y analizado a través de un parámetro conocido como, Parámetro R, el cual es el radio de las distancias promedio entre los vecinos más cercanos. Es una medida estándar del grado de aleatoriedad presente en un patrón espacial, cuando, $R=1$, corresponde a una distribución azarosa, mientras que si $R=2.15$, corresponde a una distribución completamente ordenada. Para la planta silvestre de *Arabidopsis* ecotipo Columbia, se ha descrito una $R=1.40$ o mayor a 1, con una desviación significativa a lo esperado por una distribución al azar (Clark & Evans, 1954).

En las simulaciones realizadas, se analizó el patrón de distribución obtenido, y se comparó con los fenotipos que se han reportado en la literatura, se verificó que no se formaran cúmulos y se analizó el valor de R, de manera general, el modelo logró reproducir los fenotipos observados (Tabla1, Figura 12). Esta tabla sólo incluye las simulaciones de los genes incluidos en el modelo de Benítez et al., 2008. En la figura 13, se describe el código de colores utilizado y su significado.

Código de colores

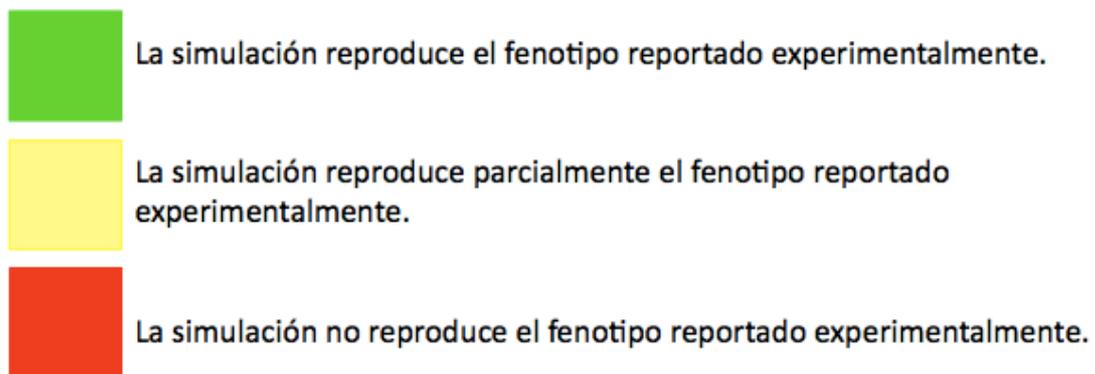


Figura 12. Código de colores utilizado para comparar los fenotipos generados por las simulaciones y los fenotipos reportados en la literatura

Tabla 1. Resultados de las simulaciones y su comparación con los fenotipos reportados en la literatura.

Patrones celulares en la epidermis de hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i>		
Genotipo	Fenotipo reportado	Fenotipo simulado
WT	Tricomas espaciados, no hay cúmulos	Tricomas espaciados, no hay cúmulos
<i>gl1</i>	Glabra	Glabra
<i>bhlh</i>	No hay tricomas	No hay tricomas
<i>ttg1</i>	No hay tricomas	No hay tricomas
<i>cpc</i>	Más tricomas que en el WT	Más tricomas que en el WT, forma cúmulos
<i>try</i>	Más tricomas que en el WT, presenta cúmulos	Más tricomas que en el WT, con cúmulos
<i>etc</i>	No hay fenotipo aparente	Aumento ligero en el número de tricomas
<i>cpc try</i>	Alto número de tricomas con cúmulos	Alto número de tricomas con cúmulos
<i>cpc etc try tcl</i>	Alto número de tricomas con cúmulos	Alto número de tricomas con cúmulos
<i>bHLH (+)</i>	Más tricomas que en el Wt	Llena 100% de tricomas
<i>ttg bHLH (+)</i>	Fenotipo Wt	Fenotipo Wt
<i>ttg GL1(+)</i>	No hay tricomas	No hay tricomas
<i>GL1(+)</i> <i>bHLH(+)</i>	Aumento en el número de tricomas, pero aún se observan células sementadas	Aumento en el número de tricomas, con células sementadas

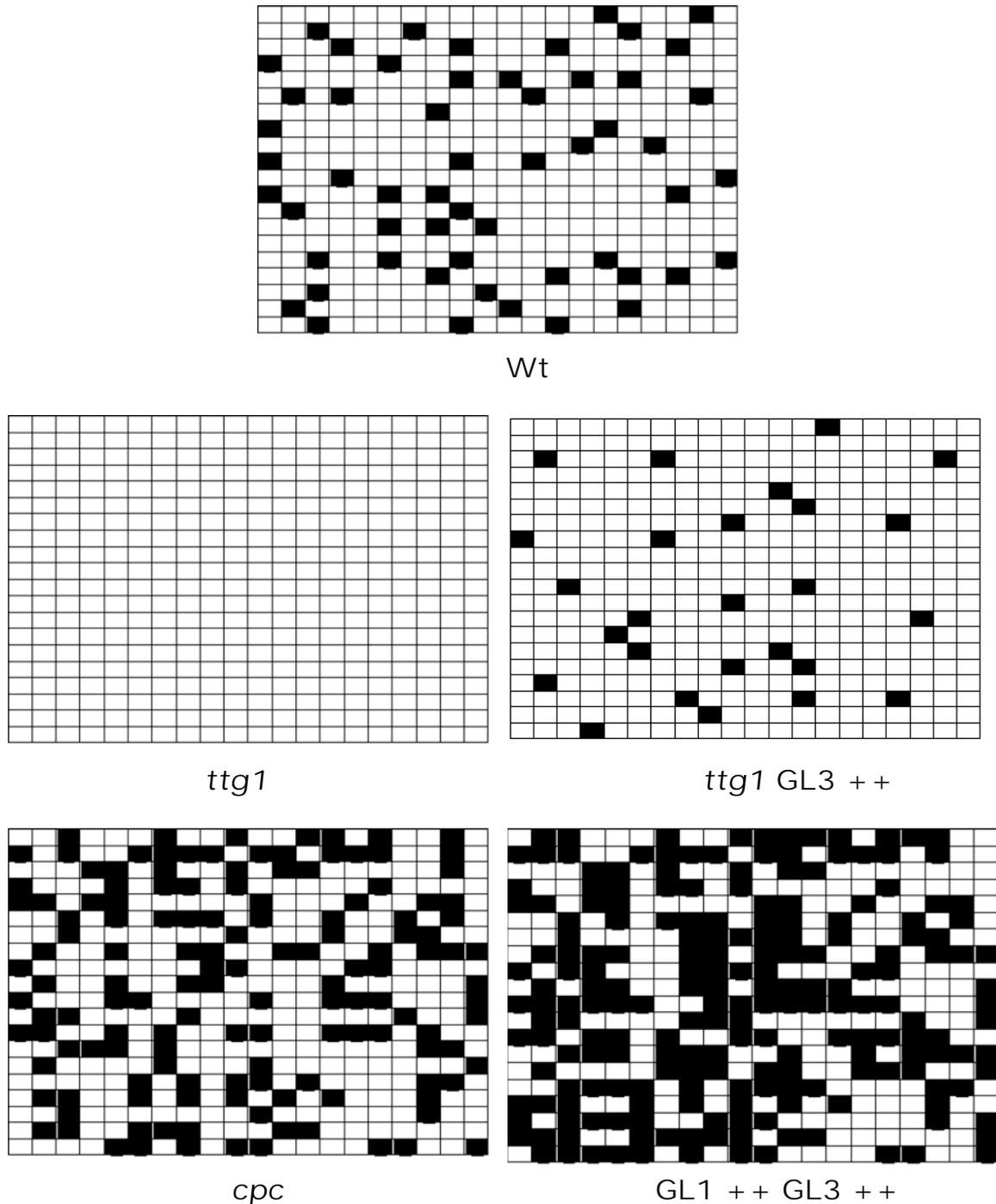


Figura 13. Simulaciones de la diferenciación celular de tricomas como resultado de la dinámica de la RR en el genotipo Silvestre (Wt) y en algunas mutantes de la red. Las celdas negras representan a los tricomas, mientras que las celdas blancas representan a los no-tricomas. La mayoría de los fenotipos mutantes obtenidos en las simulaciones son cualitativamente similares a los reportados en la literatura.

En la tabla 2 se presentan los resultados de las simulaciones de 14 mutantes de la red los cuales corresponden a los nuevos nodos integrados a la RR y seis tratamientos hormonales con GA, CK y AJ, en éstos se simula un aumento (+) y una disminución (-) en la concentración de las hormonas. En esta tabla se compararon los resultados de las simulaciones con los fenotipos reportados y los resultados se representaron en forma de colores (Figura 12). Además de esto, en la tabla 2 se presentan los valores de R correspondientes a cada línea mutante simulada, además de si se presentaron cúmulos o no.

Tabla 2. Simulaciones de mutantes y tratamientos hormonales comparados con los fenotipos reportados en la literatura.

Linea	Modelo vs experimento	R	Número de tricomas	Clustering
WT		1.22	29	no
<i>myb23</i>		1.14	23	no
<i>atmyc1</i>		1.18	21	no
<i>gl1 myb23</i>		0	0	NA
<i>gl1 MYB23(+)</i>		0	0	NA
<i>tcl</i>		1.17	33	no
<i>spy</i>		1.16	28	no
<i>gis</i>		1.13	24	no
<i>zfp6gis</i>		1.17	24	no
<i>zfp5</i>		1.24	28	no
<i>zfp6</i>		1.16	27	no
<i>spl9</i>		1.19	70	si
<i>upl3</i>		1.17	28	no
<i>ttg2</i>		1.18	58	si
<i>gis+</i>		1.21	30	no
GA(-)		0	0	NA
CK(-)		1.23	36	no
JA(+)		1.23	36	no
GA(+)		1.25	46	no
CK(+)		0	0	NA
GA(+) CK(+)		1.25	46	no

De manera general se observa que el modelo reproduce cualitativamente en su mayoría los fenotipos reportados en la literatura para mutantes de pérdida o ganancia de función, a pero no los fenotipos reportados para los tratamientos hormonales simulados.

Como se mencionó anteriormente, en *Arabidopsis*, el inicio en la formación de los tricomas es promovido por la señalización de giberelinas y se ha demostrado que la respuesta a los niveles de GA se relaciona con un aumento en el número de tricomas; el tratamiento con citoquininas a plantas silvestres también produce un aumento en el número de tricomas, así como un tratamiento con ácido jasmónico. Los resultados de las simulaciones no reproducen los fenotipos reportados. Para el caso de la regulación mediada por GA en el desarrollo de tricomas, se ha reportado que en la vía de señalización un factor que podría estar siendo regulado positivamente es el factor de transcripción *GL1*, por otra parte, también se ha observado que las proteínas *DELLA*, reguladores negativos de la señalización de GA, interactúan además con los factores de transcripción *BHLH* así como con *GL1*, para reprimir así la formación de tricomas mediada por esta hormona. Hasta ahora no se conoce si esta regulación es directa o indirecta y si el efecto observado podría corresponder a un tipo de regulación hecha sobre cada uno de estos elementos o ya que estos factores forman parte del AC, si podría ser una regulación de las proteínas *DELLA* sobre el AC en conjunto.

Por otra parte, se ha reportado que la expresión tanto de *GL1* como *GL3* se modifica en la mutante de *gis*, pero esto podría deberse a una regulación de *GIS* sobre ambos factores, o a que la regulación sobre uno de ellos afecte el estado del otro, ya que ambos forman parte de AC.

El modelo dinámico de la red de regulación permite evaluar estos diferentes escenarios a través del cambio en las reglas lógicas de los nodos y postular las interacciones no reportadas que mejor reproduzcan los fenotipos asociados a tratamientos hormonales. Entonces, se modelaron las diferentes posibilidades para las interacciones mencionadas arriba y se probó cuál de los seis escenarios respectivos eran más consistentes con los fenotipos observados en

los tratamientos hormonales. También se evaluó si el cambio en la regulación de GIS sobre estos dos factores producía cambios en los fenotipos observados en las simulaciones y si éstos mostraban más o menos diferencias con los fenotipos reportados en la literatura.

8.6 EVALUACIÓN TEÓRICA DE DIFERENTES ESCENARIOS DE INTERACCIONES POSIBLES DENTRO DE LA RED PERO NO VERIFICADAS EXPERIMENTALMENTE.

Con base en la información anterior se evaluaron dentro de la red de regulación genética seis escenarios posibles de regulación de algunos nodos con el fin de explorar cuales combinaciones reproducen mejor la evidencia experimental reportada (Figura 14). En el escenario 1, se propuso que las proteínas DELLA regulan el estado final del AC, por otra parte, en este mismo escenario se consideró que GIS regula la expresión tanto de GL1 como de GL3. En el escenario 2 las proteínas DELLA inhiben la expresión del AC, mientras que GIS sólo regula la expresión de GL3. El escenario 3 muestra un cambio en la regulación que ejerce GIS, en este escenario solamente afecta la expresión de GL1. En el escenario 4 las proteínas DELLA regulan a GL1 y a GL3 mientras que GIS sólo afecta la expresión de GL1. En el escenario 5 nuevamente las proteínas DELLA regulan a GL1 y a GL3, y sólo la expresión de GL3 depende de GIS. Por último, en el escenario 6 tanto GL1 como GL3 son regulados por las proteínas DELLA y por GIS de manera individual. Los resultados de las simulaciones de mutantes de la red y de los tratamientos hormonales se muestran resumidos en la tabla 3.

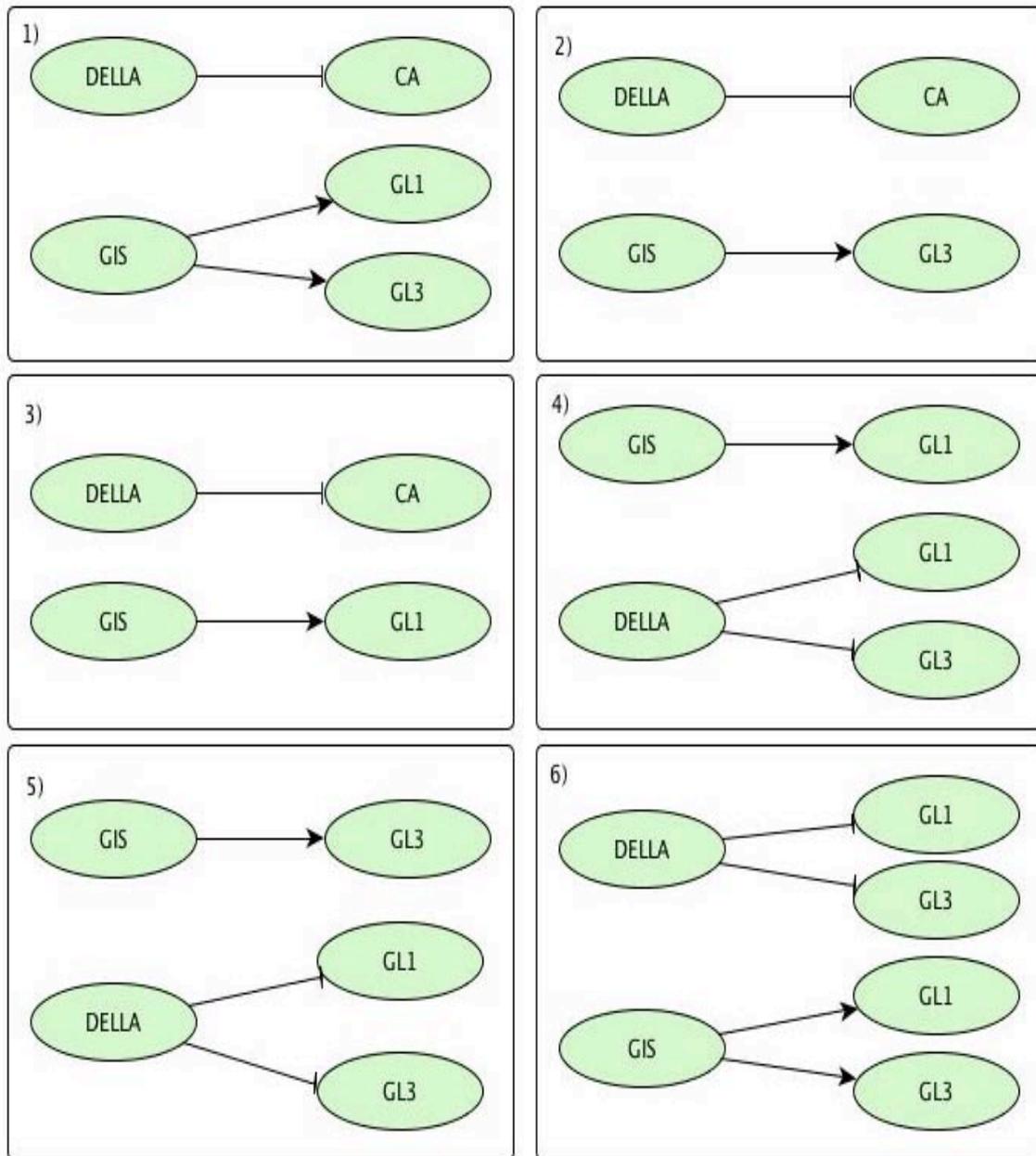


Figura 14. Esquema que representa los seis escenarios que se evaluaron dentro de la red de regulación. Estos escenarios fueron propuestos con base en los datos experimentales disponibles y representan el total de combinaciones posibles para el número de nodos que se están evaluando.

Tabla 3. Resultados de las simulaciones de las mutantes de la Red de Regulación comparados con los fenotipos reportados en la literatura en cada uno de los seis escenarios estudiados.

LÍNEA/ESCENARIO	1	2	3	4	5	6
WT	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>gl1</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>gl3</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>egl3</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>ttg1</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>atmyc1</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>myb23</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>gl3egl3</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>gl1myb23</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
35S::MYB23gl1	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
35S::GL1ttg1	Green	Green	Green	Green	Green	Green
35S::GL3EGL3	Green	Green	Green	Green	Green	Green
35S::GL3ttg1	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>cpc</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>try</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>etc</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>tcl</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>cpctry</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>cpctryetc</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>cpctryetctcl</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>gis</i>	Green	Red	Yellow	Red	Yellow	Yellow
<i>zfp8gis2</i>	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow
<i>zfp5</i>	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
<i>zfp6</i>	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow
<i>spl9</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>upl3</i>	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
<i>ttg2</i>	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
<i>spy</i>	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
35S::GIS	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
GA(+)<i>gis</i>	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow

Como se puede ver en la tabla, al simular diferentes mutantes de la red en cada uno de los escenarios y compararlos con los fenotipos reportados, se observan diferencias en el número de fenotipos que se logran reproducir en cada escenario. De manera general, el escenario que logra reproducir cualitativamente la mayoría de las líneas mutantes simuladas corresponde al escenario 1; en el cual, el AC es regulado por las proteínas DELLA y *GL1* y *GL3* son regulados por *G/S*. Aunque los cambios en las reglas lógicas son sutiles y sólo corresponden a un par de nodos, se puede observar que es suficiente para producir diferencias en el número de fenotipos que se logran reproducir; además, al evaluar teóricamente diferentes vías de regulación e interacción de los nodos, se puede llegar a proponer un mecanismo de regulación hormonal que explique en mayor grado el cambio en los fenotipos que observamos y que no ha sido verificado experimentalmente.

Una vez que se observó que al menos una de las redes propuestas era capaz de reproducir los fenotipos reportados se procedió a evaluar si también eran suficientes para estudiar los cambios en los fenotipos relacionados con los tratamientos hormonales (ver tabla 3 más adelante).

8.7 COMPARACIÓN DEL MODELO CON EVIDENCIA EXPERIMENTAL

Este tipo de modelos representa una buena herramienta para proponer evaluaciones experimentales que, por una parte, permitan poner a prueba los resultados teóricos y por otra, retroalimenten el trabajo experimental al proveer de predicciones novedosas que puedan ser estudiadas a través del análisis de la dinámica y de las interacciones de los nodos en las redes de regulación.

Con base en estos resultados, en este trabajo se propuso estudiar experimentalmente el efecto de las hormonas giberelinas y citoquininas en el desarrollo de tricomas; a través de tratamientos hormonales con CK y GA se pusieron a prueba algunos resultados del modelo. Se analizó el efecto de las GA, CK y la combinación de estas dos hormonas en el desarrollo de los tricomas en plantas silvestres de *Arabidopsis* y en una línea de sobre expresión de CK (IPT-dex) y se comparó con los resultados del modelo. El efecto de la

combinación de estos dos tratamientos hormonales (GA+CK) en la determinación de tricomas en la epidermis de las hojas en *Arabidopsis* aún no ha sido reportado experimentalmente, por lo que este trabajo representa un buen inicio para explorar los posibles efectos en el desarrollo de tricomas, compararlo con los resultados del modelo y tratar de entender el o los mecanismos de regulación detrás de los cambios en los fenotipos observados.

8.8 RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES

En la siguiente figura (Figura 15) se muestra el análisis de los tricomas en las hojas sometidas a los tratamientos hormonales. Los tricomas de las hojas fueron resaltados a través de un proceso de aclarado y posteriormente analizados con ayuda del programa TRICHOMENET (<http://www.trichomenet.com>). Se analizó el cambio en el número de tricomas en dos tratamientos hormonales a diferentes concentraciones (100 μ M y 10 μ M) y se compararon con los resultados del grupo control (Figuras 16 a la 19), posteriormente estos resultados se compararon con las simulaciones (Tabla 3).

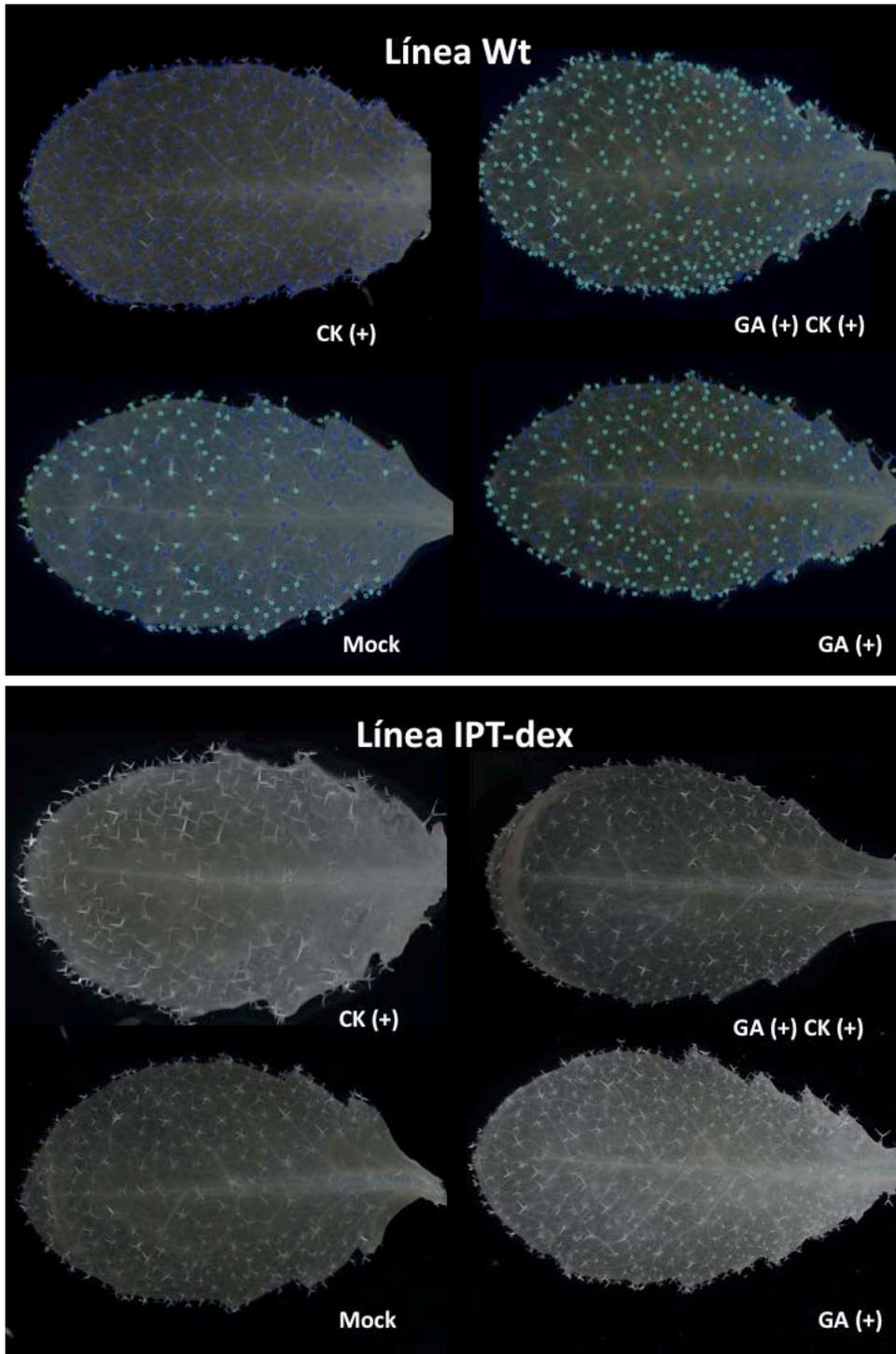


Figura 15. Tricomas resaltados en las hojas silvestres de *Arabidopsis* (arriba) y en una línea que sobre expresa citoquininas (abajo). En la figura de arriba se muestran los tricomas marcados con el programa TRICHOMENET (Pomeranz et al., 2013) para su análisis.

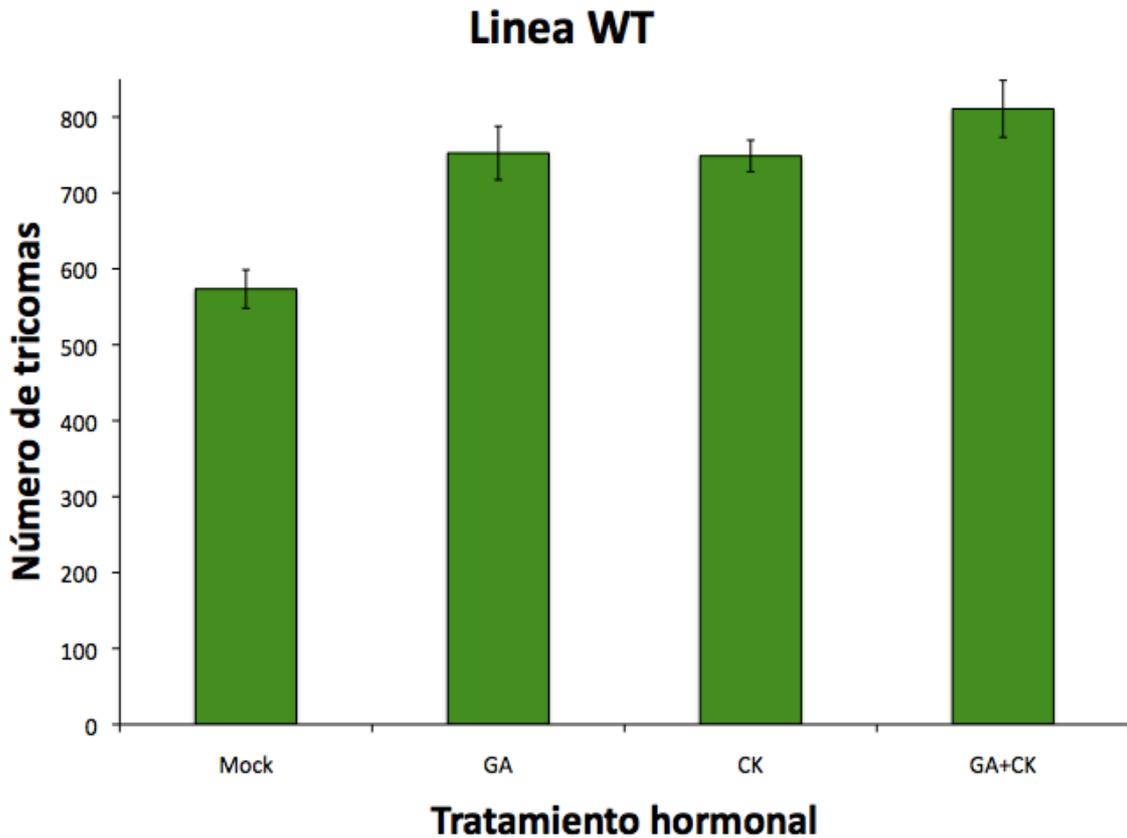


Figura 16. Análisis del cambio en el número de tricomas en un tratamiento hormonal (concentración de las hormonas, 100 μM) en una línea de plantas silvestres (Wt), en una muestra de 15 plantas. Se puede observar que el tratamiento con GA y CK produce un aumento en el número de tricomas comparado con el tratamiento control. Por otra parte, en el tratamiento que combina las hormonas GA y CK se observa que el número de tricomas aumenta y es mayor al número de tricomas observado en el tratamiento con CK, al compararlo con el tratamiento con GA se observa que el número de tricomas no es significativamente distinto. Las barras representan el error estándar.

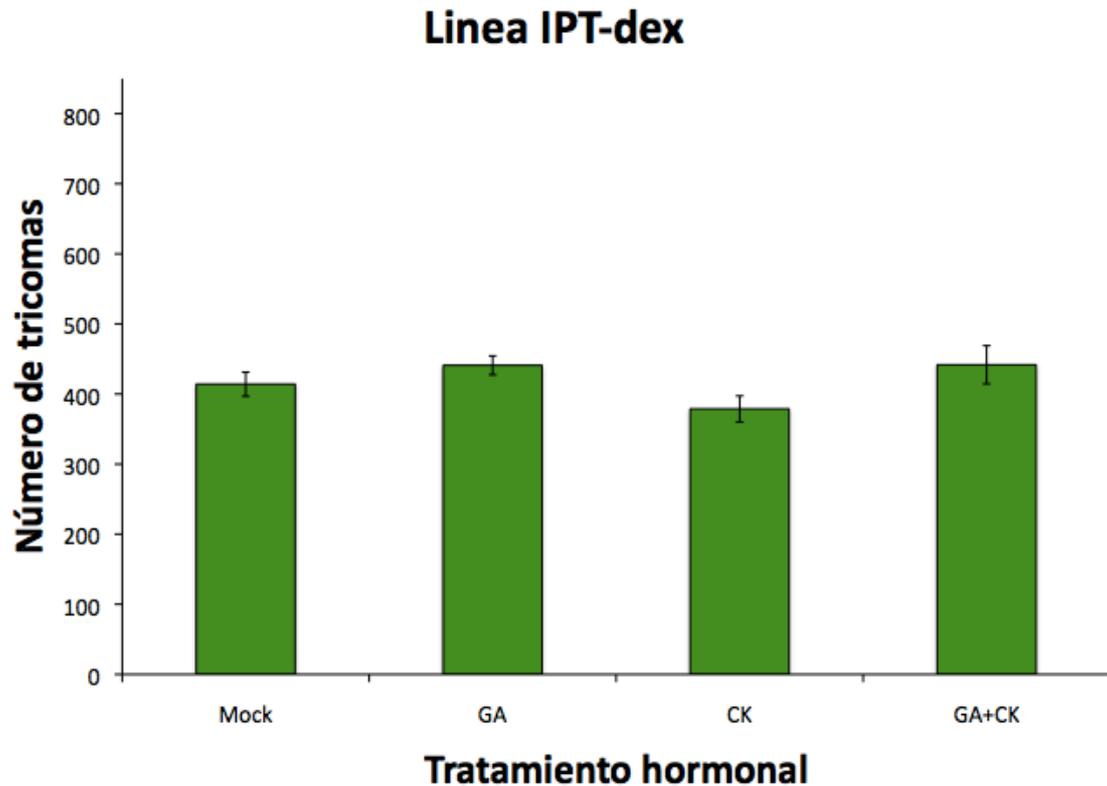


Figura 17. Análisis del cambio en el número de tricomas en un tratamiento hormonal (concentración de las hormonas, 100 μ M) en una línea de plantas que sobre expresa citoquininas (IPT-dex), en una muestra de 15 plantas. Se puede observar que el tratamiento con GA produce un ligero aumento en el número de tricomas comparado con el tratamiento control. Por otra parte, el tratamiento con CK ocasiona una disminución en el número de tricomas comparado con el control. Al analizar el número de tricomas en el tratamiento combinado se observa que el efecto es similar al del tratamiento únicamente con GA, sin llegar a producir un aumento significativamente distinto del tratamiento control. Las barras representan el error estándar.

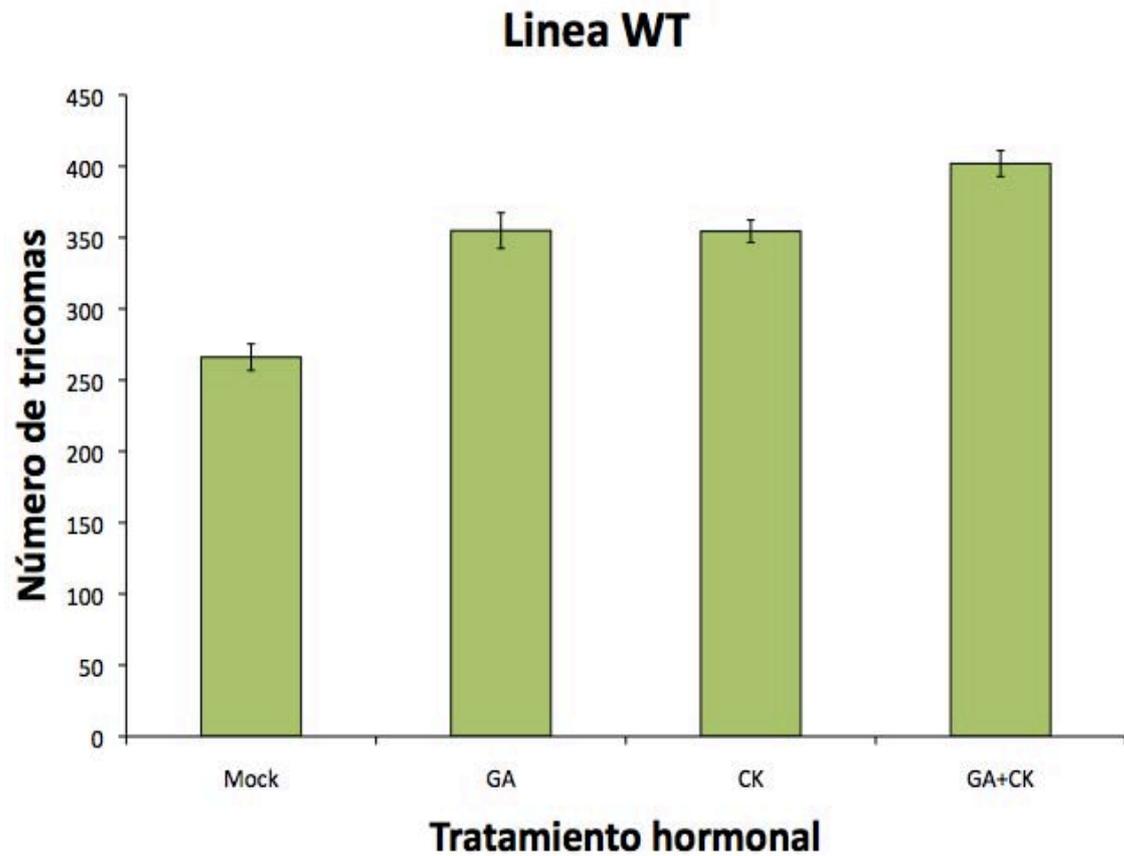


Figura 18. Análisis del cambio en el número de tricomas en un tratamiento hormonal (concentración de las hormonas, $10 \mu\text{M}$) en una línea de plantas silvestres (Wt), en una muestra de 15 plantas. Se puede observar que el tratamiento con GA y CK produce un aumento en el número de tricomas comparado con el tratamiento control, el efecto en el aumento del número de tricomas en cada uno de estos tratamientos no es significativamente distinto. Por otra parte, en el tratamiento que combina las hormonas GA y CK se observa que el efecto en el cambio del número de tricomas es aditivo o sumatorio, es decir, el número de tricomas es mayor al observado en cada tratamiento por separado. Las barras representan el error estándar.

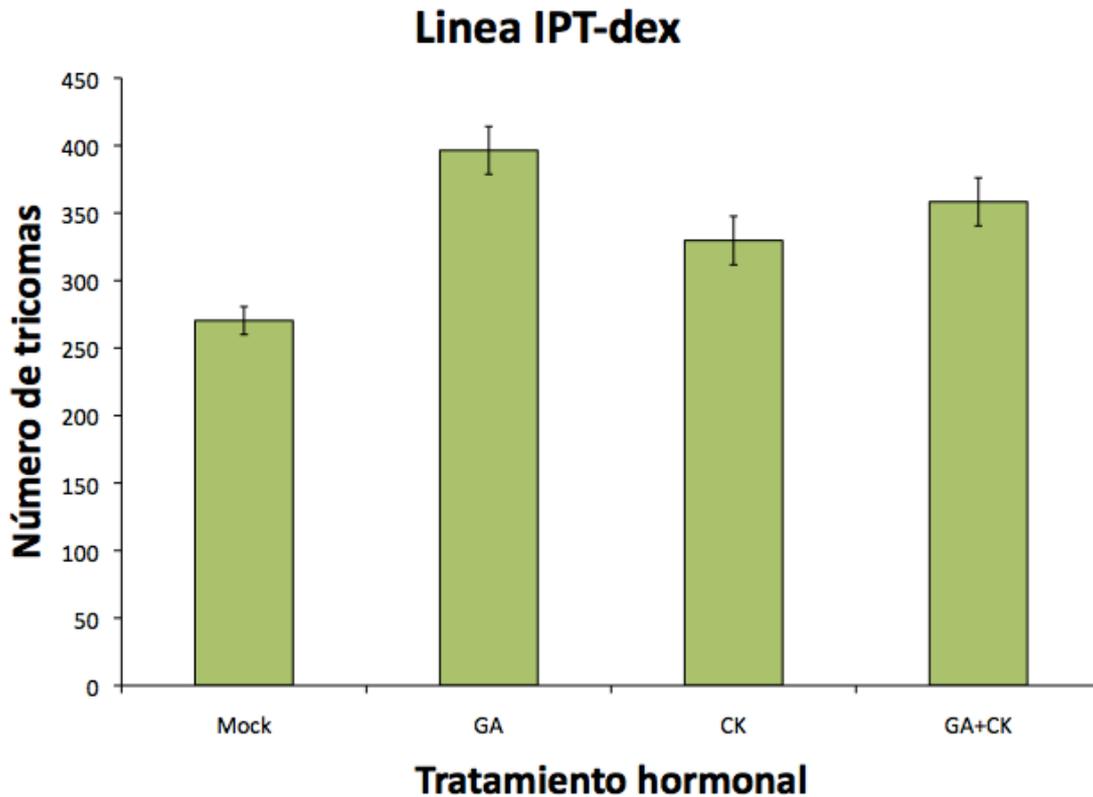


Figura 19. Análisis del cambio en el número de tricomas en un tratamiento hormonal (concentración de las hormonas, 10 μ M) en una línea de plantas que sobre expresa citoquininas (IPT-dex), en una muestra de 15 plantas. Se puede observar que el tratamiento con GA produce un aumento en el número de tricomas comparado con el tratamiento control. El tratamiento con CK también produce un aumento en el número de tricomas, aunque en este caso, el efecto es menor al que se genera en el tratamiento por GA. Por otra parte, en el tratamiento que combina las hormonas GA y CK se observa que el número de tricomas aumenta comparado con el tratamiento control, sin embargo, en este caso el efecto es menor comparado con el tratamiento con GA, aunque mayor comparado con el tratamiento con CK. Las barras representan el error estándar.

De manera general se observa que en cada tratamiento hormonal se produce un efecto en el cambio en el número de tricomas. Sin embargo, en los tratamientos con una concentración hormonal de 100 μ M, el cambio en el número de tricomas en la línea IPT-dex no es significativamente distinto del tratamiento control, para el caso de la línea silvestre el efecto de los tratamientos hormonales si causó un cambio comparado con el tratamiento control, aunque al comparar el efecto de los tres tratamientos se observa que

éste es similar entre ellos. Para el caso del tratamiento donde se utilizó una concentración hormonal de 10 µm, se observan diferencias más claras entre cada tratamiento en la línea silvestre. En la línea que sobre expresa CK se observa que en los tratamientos con CK el efecto en el número de tricomas es menor que el efecto producido por el tratamiento únicamente de GA. El análisis de estos resultados se discute más adelante en la sección de discusión.

Una vez obtenidos los resultados experimentales, se procedió a compararlos con los resultados de las simulaciones (Tabla 4). Se simularon los tratamientos hormonales con GA, CK, AJ, y la combinación de GA+CK en los seis escenarios propuestos. Se observó que existen diferencias en los fenotipos generados en cada escenario, siendo el escenario 1 el que reproduce cualitativamente la mayor cantidad de fenotipos reportados; para el caso de los tratamientos con GA, los resultados de las simulaciones coinciden con los fenotipos reportados, mientras que para los tratamientos con CK y la combinación con GA+CK, los resultados de las simulaciones reproducen parcialmente los fenotipos reportados. Estos resultados se discuten más adelante.

Tabla 4. Resultados de las simulaciones de los tratamientos hormonales realizados y el tratamiento con AJ reportado en la literatura, comparados con los fenotipos reportados en cada uno de los seis escenarios estudiados

Línea/Escenario	1	2	3	4	5	6
GA(-)	■	■	■	■	■	■
CK(-)	■	■	■	■	■	■
JA(-)	■	■	■	■	■	■
GA(+)	■	■	■	■	■	■
CK(+)	■	■	■	■	■	■
JA(+)	■	■	■	■	■	■
GA(+) CK(+)	■	■	■	■	■	■

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se propuso un modelo dinámico de la Red de Regulación Genética asociada al desarrollo de tricomas en la epidermis de hoja de *Arabidopsis thaliana*; el modelo está basado en la evidencia experimental disponible y partió del modelo propuesto por Benítez et al., 2008. A partir de una búsqueda exhaustiva en la literatura se integraron a la RRG 16 nuevos genes y sus correspondientes proteínas. Además, se integró el papel de las hormonas Giberelinas, Citoquininas y Ácido Jasmónico, las cuales no habían sido consideradas en el modelo anterior, pero se ha reportado que su participación es importante en el desarrollo plástico de tricomas; también se integró la señal ambiental de herbivoría, la cual puede estar mediada por señales hormonales y afectar así el cambio en el desarrollo de tricomas. El modelo propuesto es suficiente para reproducir el patrón de distribución de tricomas observado en los ecotipos silvestres de *Arabidopsis*, y es capaz de reproducir cualitativamente la mayoría de los fenotipos de líneas mutantes reportadas experimentalmente. Por otra parte, al analizar los perfiles de expresión genética de los nodos de la red y compararlos con los reportados experimentalmente, se encontró que estos se recuperan y corresponden a los perfiles de expresión genética característicos de las células de tricoma y no tricoma. Ya que el modelo integra señales ambientales y hormonales, permitió simular cambios en estas variables y compararlos con lo que se observa experimentalmente. Los resultados de estas simulaciones recuperaron en su mayoría los cambios fenotípicos reportados. Además se generaron distintas predicciones, algunas de las cuales fueron verificadas experimentalmente en este proyecto.

De manera general, estos resultados muestran que el modelo es suficiente para describir y estudiar la dinámica de la RRG asociada a la diferenciación celular plástica y la formación de patrones celulares en la epidermis de hoja en *Arabidopsis thaliana*.

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo y formación de patrones celulares en la epidermis de hoja es un proceso plástico que responde y se modifica ante cambios en las condiciones ambientales y hormonales. Las hormonas GA, CK y AJ, promueven el aumento en el número de tricomas (Chien & Sussex, 1996; Gan et al., 2006, 2007; Qi et al., 2014; Jacobsen & Olszewski, 1993, 1996; Zhou et al., 2011, 2012; Sun et al., 2014; An et al., 2011; Qi et al., 2011; Traw & Bergelson, 2003). También se ha demostrado que el daño foliar, causado por herbivoría o daño mecánico, es capaz de inducir un aumento en la producción de tricomas y que esta inducción puede ser transmitida transgeneracionalmente (Holeski, 2007). Por lo anterior, entender el proceso por el cual estas señales ambientales y hormonales generan cambios plásticos en el desarrollo a un nivel genético o mecanístico es importante, ya que nos muestra que la variación en el desarrollo de los organismos no es un proceso determinado exclusivamente por el genotipo, y que la plasticidad fenotípica es un proceso importante, el cual puede llegar a tener una importancia adaptativa y evolutiva en la generación de nuevos fenotipos (Pigliucci et al., 2006; Pigliucci & Murren 2003; Scheiner 1993; Schlichting & Smith 2002; Jablonka & Lamb 2005; West-Eberhard 2003, Whitman & Agrawal 2009).

En este modelo las vías de señalización hormonal y ambiental se integraron a partir de una búsqueda en la literatura sobre la forma en que cada tratamiento hormonal y el daño por herbivoría, afecta el patrón de distribución de tricomas y la expresión de los genes que participan en este proceso y forman parte de la RRG. A partir de esta información se propusieron sus interacciones con los demás nodos de la red. De este modo se representaron a las GA, CK, AJ y a la herbivoría como cuatro nodos de la red con sus respectivas interacciones y sus reglas lógicas. Con base en esto, se estudió el efecto de cambios en los valores de estas variables sobre el estado de expresión de los nodos de la RRG. Se observó que las reglas de interacción y regulación propuestas inicialmente en el modelo, no eran suficientes para reproducir los fenotipos reportados experimentalmente y entender los cambios producidos por estas señales.

Una ventaja de este tipo de modelos es que además de que permiten identificar componentes e interacciones cruciales para la dinámica del sistema, pueden utilizarse para realizar predicciones de nuevas interacciones o componentes que no han sido identificados por métodos experimentales. Con esto en mente, se exploraron diferentes escenarios de regulación de algunos nodos, los cuales aún no quedan muy claros en la literatura y por lo tanto, representan un buen ejemplo para proponer y predecir interacciones no verificadas experimentalmente que puedan ser necesarias para explicar y entender de mejor manera el comportamiento global de la red. Se postularon seis escenarios, cada uno de los cuales muestra diferencias en la regulación de los nodos *GL1*, *GL3*, *GIS*, *DELLA* y el *AC*. Se ha reportado que las proteínas *DELLA* pueden interactuar con *GL1* y *GL3* y que en las líneas mutantes de las proteínas *DELLA*, la expresión de estos dos genes aumenta. Este efecto podría explicarse de diferentes formas, podría ser que la expresión de *GL1* y *GL3* se vea afectada de forma individual por estas proteínas, o ya que estos genes forman parte del *AC*, la interacción de estas proteínas afecte la formación de este complejo, ocasionando una disminución en la actividad de estos genes; todos estos posibles escenarios se evaluaron en el modelo. Por otra parte, también se evaluó si la actividad de *GIS*, el cual se ha reportado que podría mediar la actividad de las GA por medio del *AC*, se ve afectada si se produce un cambio en los genes que son considerados sus blancos (*GL1* y *GL3*). Estos escenarios también fueron evaluados en el modelo.

Al analizar los resultados de las simulaciones en cada uno de los escenarios, se encontraron diferencias en cuanto al número de mutantes reportadas que eran capaces de reproducir. De manera general, un escenario logró reproducir cualitativamente una mayor cantidad de los fenotipos reportados experimentalmente. Con estos resultados, podemos sugerir que cambios sutiles en las interacciones de regulación dentro la red, son suficientes para explicar cambios en el desarrollo de estos patrones en la epidermis de hoja. Además, el modelo permite decidir entre varios escenarios posibles de regulación y proponer uno en particular que explique mejor la dinámica del proceso de desarrollo estudiado (escenario 1, ver figura14).

Este tipo de modelos representa una buena herramienta para proponer evaluaciones experimentales que, por una parte, permitan poner a prueba los resultados teóricos y por otra, retroalimenten el trabajo experimental al proveer de predicciones novedosas que puedan ser estudiadas a través del análisis de la dinámica de la red. Se propusieron tres tratamientos experimentales con las hormonas GA, CK y la combinación de estas dos y se analizó su efecto en el desarrollo de los tricomas en plantas silvestres de *Arabidopsis* y en una línea de sobre expresión de CK (IPT-dex). El efecto de la combinación GA+CK en la determinación de tricomas en la epidermis de las hojas en *Arabidopsis* aún no ha sido reportado experimentalmente, por lo que este experimento representa un buen inicio para explorar los posibles efectos en el desarrollo de tricomas, y compararlo con los resultados y las predicciones del modelo.

De los resultados de los experimentos, se observó que, como había sido reportado, el tratamiento con GA y CK causó un aumento en el número de tricomas, este efecto se pudo observar al utilizar una concentración hormonal de 100 μM y 10 μM en las plantas silvestres. En las plantas que sobre expresan CK este efecto no llegó a ser tan claro, aunque si se logró producir un aumento significativo en el número de tricomas utilizando una concentración hormonal de 10 μM . Esto podría ser explicado por un efecto de toxicidad, para el caso de GA, se ha reportado que un aumento drástico en la concentración de GA en la planta produce un efecto negativo en su desarrollo, probablemente este mismo efecto es el que está siendo observado en las líneas que sobre expresan CK. Al analizar el número de tricomas en la combinación de CK+GA, se observó un efecto aditivo en la línea silvestre, es decir, que las GA y CK controlan sinérgicamente el desarrollo de los tricomas. Nuevamente, en las líneas que sobre expresan CK este efecto no fue tan claro, lo cual apoyaría más la hipótesis de que pasado cierto umbral en la concentración de esta hormona, se produciría un efecto de campana y se inhibiría el efecto de las GA. Probablemente exista una regulación cruzada entre estas dos hormonas, la cual por el momento se ha dejado fuera del modelo, pero puede ser incluida al haber más información disponible

De manera general, al comparar los resultados de las simulaciones con los resultados de los experimentos, se observó que aunque uno de los escenarios de regulación es capaz de reproducir un mayor número de los fenotipos reportados y estudiados experimentalmente, aún existen fenotipos que no se pueden recuperar, específicamente en la combinación de GA+CK, en donde el modelo reproduce parcialmente el fenotipo observado experimentalmente. Ya que este es un modelo discreto, no considera una concentración continua de las hormonas, como la que comúnmente se observa a lo largo del ciclo de vida de las plantas y que podría ser importante para entender y reproducir los cambios en los fenotipos observados. Posiblemente, desarrollar un modelo híbrido, que considere concentraciones continuas de las hormonas a lo largo del tiempo en las simulaciones, podría generar información y predicciones más finas acerca de los mecanismos de regulación de las hormonas dentro de la RRG. Por otra parte, se ha reportado que las hormonas pueden mantener una comunicación o “crosstalk” entre ellas a lo largo de diferentes procesos en el desarrollo de las plantas (Depuydt & Hardtke, 2011; Jaillais & Chory, 2010). Este tipo de regulación podría generar diferencias en las respuestas observadas, por lo que evaluar también diferentes escenarios de regulación entre las hormonas es necesario para aproximarse a entender los mecanismos detrás de las respuestas plásticas observadas.

Por otra parte, existen otros factores que no se exploran a detalle en este modelo y que podrían ser importantes dentro de la dinámica de regulación de la red. Por ejemplo, el estado de desarrollo de la planta, o algunos otros factores genéticos que medien la interacción entre las hormonas y los genes del complejo activador.

Para concluir, en este proyecto se propone un modelo dinámico para modelar el desarrollo plástico de los tricomas en *Arabidopsis*. A través de exploraciones y modificaciones en la interacciones y regulaciones de los nodos de la red, se propone un mecanismo (escenario 1, figura 14) por el cual las hormonas GA influyen en la determinación celular de la epidermis. De esta manera, este modelo es un ejemplo del uso de los modelos dinámicos de redes para estudiar la plasticidad fenotípica.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados de este modelo muestran que este es una buena herramienta para estudiar el proceso de diferenciación celular en las hojas de Arabidopsis. Además, permitió analizar cómo variables hormonales y ambientales modifican este proceso haciéndolo plástico a través de su interacción con los factores de la red de regulación genética.

A través de la construcción de modelos de redes de regulación genética en otros sistemas de desarrollo, que incorporen no solo variables genéticas sino señales ambientales y hormonales, sería posible estudiar y analizar el mecanismo por el cual se modifica la dinámica y la respuesta de estos sistemas ante cambios en el ambiente. Así como los mecanismos por los cuales cambios en la regulación genética producen diferentes respuestas fenotípicas en los organismos en respuesta a estas señales. Así, una perspectiva de este trabajo es estudiar la plasticidad fenotípica en otros sistemas biológicos ante cambios en las condiciones en el ambiente donde se desarrollan; esto, a través de la construcción de modelos dinámicos de RRG basados en la evidencia experimental reportada para estos sistemas biológicos.

Por otra parte, estos modelos también podrían ser utilizados para realizar experimentos de norma de reacción, en estos, las simulaciones de líneas silvestres y mutantes podrían ser sometidas a diferentes gradientes y cambios en las variables ambientales consideradas, y posteriormente, comparar los resultados de estas simulaciones con los resultados de experimentos propuestos en el laboratorio. De generar estas predicciones y reproducir los resultados experimentales, este tipo de modelos representaría una herramienta muy útil para estudiar y predecir las respuestas adaptativas plásticas de los organismos ante cambios en el ambiente; además, ayudaría a entender el papel de la plasticidad fenotípica en el desarrollo y en el origen de la variación fenotípica que observamos, aproximándose de este modo a resolver preguntas interesantes dentro de la ecología evolutiva del desarrollo y de la respuesta de las plantas a factores del ambiente.

11. REFERENCIAS

1. Agrawal AA. (2001a). Transgenerational consequences of plant responses to herbivory: an adaptive maternal effect? *The American naturalist*, 157(5), 555-69.
2. Agrawal AA. (2001b). Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5541), 321-6.
3. Alabadí, D., Blázquez, MA., Carbonell, J., Ferrándiz, C., & Pérez-Amador, M. A. (2009). Instructive roles for hormones in plant development. *The International journal of developmental biology*, 53(8-10), 1597-608.
4. Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Dávila, E. B., Chaos, A., Espinosa-Soto, C., & Padilla-Longoria, P. (2007). Gene regulatory network models for plant development. *Current opinion in plant biology*, 10(1), 83-91.
5. Alvarez-Buylla, E., Corvera-Poiré, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., & Pérez-Ruiz, R. V. (2011). A MADS view of plant development and evolution. *tnres.com*, 661(2), 181-220.
6. An, L., Zhou, Z., Yan, A., & Gan, Y. (2011). Progress on trichome development regulated by phytohormone signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12), 1959-1962.
7. Balkunde R, Pesch M, Hülskamp M. (2010). Trichome patterning in *Arabidopsis thaliana* from genetic to molecular models. *Curr Top Dev Biol*, 91:299-321.
8. Benítez et al., (2007) A Gene Regulatory Network Model for Cell-Fate Determination during *Arabidopsis thaliana* Flower Development That Is Robust and Recovers Experimental Gene Expression Profiles. *Int. J. Dev. Biol.* 51: 139–155.
9. Benítez, M., Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P., & Alvarez-Buylla, E. R. (2008). Interlinked nonlinear subnetworks underlie the formation of robust cellular patterns in *Arabidopsis* epidermis: a dynamic spatial model. *BMC systems biology*, 2, 98. DOI: 10.1186/1752-0509-2-98.
10. Benítez, M., Monk, N. a M., & Alvarez-Buylla, E. R. (2011). Epidermal patterning in *Arabidopsis*: models make a difference. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 316(4), 241-53.
11. Benítez et al. (2013) Dynamic models of epidermal patterning as an approach to plant eco-evo-devo. *Current opinion in plant biology* 2013 vol: 16 (1) pp: 11-8.
12. Chien, J. C., & Sussex, I. M. (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant physiology*, 111(4), 1321-8.
13. Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H. K., Jenkins, G. I., & Tonelli, C. (2008). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 165(8), 886-94.
14. DeWitt, T. J., Sih, A., & Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(2), 77-81.

15. Depuydt, S., & Hardtke, C. S. (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current biology : CB*, 21(9), R365-73.
16. Dong-Lei Yanga et al., (2012) Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. PNAS. E1192–E1200.
17. Espinosa-soto, Padilla-longoria, & Alvarez-buylla, (2004) A Gene Regulatory Network Model for Cell-Fate Determination during *Arabidopsis thaliana* Flower Development That Is Robust and Recovers Experimental Gene Expression Profiles. *Plant Cell*, 16: 2923-2939.
18. Fitzpatrick, B. M. (2012). Underappreciated Consequences of Phenotypic Plasticity for Ecological Speciation. *International Journal of Ecology*, 2012, 1-12.
19. Fusco, G., & Minelli, A. (2010). Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. Introduction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365(1540), 547-56.
20. Ghalambor, CK., et al., (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21(3), 394-407.
21. Gan, Y., et al., (2006). GLABROUS INFLORESCENCE STEMS Modulates the Regulation by Gibberellins of Epidermal Differentiation and Shoot Maturation in *Arabidopsis*. *Society*, 18(June), 1383-1395.
22. Gan, Y., et al., (2007). Integration of cytokinin and gibberellin signalling by *Arabidopsis* transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Development (Cambridge, England)*, 134(11), 2073-81.
23. Gibson, MA., & Mjolsness, E. (1999). *Modeling the Activity of Single Genes. ReCALL* (pp. 3-48).
24. Grebe M. (2012). The patterning of epidermal hairs in *Arabidopsis*-updated. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:31–37
25. Gilbert SF & Epel D. (2009). *Ecological developmental biology*. Sinauer Associates, Sunderland
26. Gilbert SF (2003). The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *Int J Dev Biol* 47:467–477
27. Gilbert SF, (2003). The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *Int J Dev Biol*, 47:467-477.
28. Hall, B., Pearson, R., & Müller, G. (2003). *Environment, development, and evolution: toward a synthesis. Synthesis*.
29. Haughn G. and L. Kunst. (2010). *Arabidopsis thaliana: a model organism for molecular genetic studies in plants: How and why was arabidopsis chosen over other plants?. In S.L. Gillies and S. Hewitt (eds.), Biology on the Cutting Edge: Concepts, Issues, and Canadian Research around the Globe (Pearson Canada, Toronto) pp 7-11. (proof).*
30. Holeski, L M. (2007). Within and between generation phenotypic plasticity in trichome density of *Mimulus guttatus*. *Journal of evolutionary biology*, 20(6), 2092-100.

31. Holeski, Liza M, Jander, G., & Agrawal, A. a. (2012). Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends in ecology & evolution*, 27(11), 618-26. Elsevier Ltd.
32. Hopfensitz M. et al., (2010) A short introduction to the BoolNet package. Statistical Computing, Reischensberg.
33. Jaillais Y., and Chory J., (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol*; 17(6): 642–645. doi:10.1038/nsmb0610-642.
34. Tetsuya Ishida, et al., (2008). A Genetic Regulatory Network in the Development of Trichomes and Root Hairs. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 59: 365 -386.
35. Huang, S. (2004). Back to the biology in systems biology: What can we learn from biomolecular networks? *BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS.*, 2(4), 279–297.
36. Jablonka, E., & Lamb., M. J. (2005). Evolution in Four Dimensions: Genetic, Epigenetic, Behavioral, and Symbolic Variation in the History of Life. *MIT Press, Cambridge, MA*.
37. Jablonka E, & Lamb MJ. (2007). Précis of Evolution in Four Dimensions. *Behavioral and Brain Sciences*. 30:353-392.
38. Jacobsen, S. E., & Olszewski, N. E. (1993). Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *The Plant cell*, 5(8), 887-96.
39. Jacobsen, S. E., Binkowski, K. a, & Olszewski, N. E. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17), 9292-6.
40. Jaillais, Y., & Chory, J. (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), 642-5.
41. Kauffman S (1969) Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J Theor Biol* 22:437–467
42. Larkin, J. C., Brown, M. L., & Schiefelbein, J. (2003). How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in Arabidopsis. *Annual review of plant biology*, 54, 403-30.
43. Lillo, C., Lea, U. S., & Ruoff, P. (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, cell & environment*, 31(5), 587-601.
44. Maes, L., & Goossens, A. (2010). Hormone-mediated promotion of trichome initiation in plants is conserved but utilizes species and trichome-specific regulatory mechanisms. *Plant signaling & behavior*, (February), 205-207.
45. Mendoza L, Alvarez-Buylla ER (2000) Genetic regulation of root hair development in Arabidopsis thaliana: a network model. *J Theor Biol* 204:311–326.
46. Meyerowitz, E. (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science*, 295(5559), 1482-5.
47. Morohashi, K., and Grotewold, E. (2009) A systems approach reveals regulatory

- circuitry for Arabidopsis trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors. *PLoS Genet.* 5, e1000396.
48. Müller, G. B. (2007). Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. *Nature reviews. Genetics*, 8(12), 943-9.
 49. Müssel M. et al., (2010). BoolNet – an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* , 26(20):1378 – 1380.
 50. Oliva, M., Farcot, E., & Vernoux, T. (2013). Plant hormone signaling during development: insights from computational models. *Current opinion in plant biology*, 16(1), 19-24.
 51. Olsson L, Hoßfeld U, Breidbach O (2006) From evolutionary morphology to the modern synthesis and “evo-devo”: historical and contemporary perspectives. *Theory Biosci* 124:259–263
 52. Perazza, D., Vachon, G., & Herzog, M. (1998). Gibberellins promote trichome formation by Up-regulating GLABROUS1 in arabidopsis. *Plant physiology*, 117(2), 375-83.
 53. Pesch, M., & Hülskamp, M. (2009). One, two, three...models for trichome patterning in Arabidopsis? *Current opinion in plant biology*, 12(5), 587-92.
 54. Pfennig, D. W., Wund, M. A., Snell-Rood, E. C., Cruickshank, T., Schlichting, C. D., & Moczek, A. P. (2010). Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in ecology & evolution*, 25(8), 459-67.
 55. Pigliucci, M., & Schlichting, C. D. (1998). Reaction norms of Arabidopsis . V. Flowering time controls phenotypic architecture in response to nutrient stress. *Journal of Evolutionary Biology*, 11(3), 285-301.
 56. Pigliucci, Massimo, Murren, C. J., & Schlichting, C. D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of experimental biology*, 209(Pt 12),
 57. Pigliucci, Massimo, & Murren, C. J. (2003). Perspective: Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? *Evolution; international journal of organic evolution*, 57(7), 1455-64.
 58. Pigliucci M., & Müller GB., (2010). *Evolution: the extended synthesis*. MIT, Cambridge.
 59. Pérez-Estrada, L. B., Cano-Santana, Z., & Oyama, K. (2000). Variation in leaf trichomes of *Wigandia urens*: environmental factors and physiological consequences. *Tree physiology*, 20(9), 629-632.
 60. Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., et al. (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 23(5), 1795-814.
 61. Raff R.A., (2000) Evo-devo: the evolution of a new discipline. *Nature Reviews Genetics* 1, 74-79.
 62. Saadatpour A. & Albert R. (2013). Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial, *Methods*, Volume 62, Issue 1, Pages 3-12.

63. Scheiner, S. M. (1993). Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 35-68. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
64. Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science*, 5(12), 537-542.
65. Sun L, et al., GLABROUS INFLORESCENCE STEMS3 (GIS3) regulates trichome initiation and development in Arabidopsis. (2014) *New Phytologist*, doi: 10.1111/nph.13218
66. Schlichting C., and Smith H., (2002). Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology* 16: 189–211.
67. Symonds, VV., et al., (2011) Natural allelic variation defines a role for ATMYC1. Trichome cell fate determination. *PLoS Genetics* 7, e1002069.
68. Tiancong Qi, et al., (2014). Arabidopsis DELLA and JAZ Proteins Bind the WD-Repeat/bHLH/MYB Complex to Modulate Gibberellin and Jasmonate Signaling Synergically. *The Plant Cell*, Vol. 26: 1118–1133.
69. Thaler JS., Agrawal AA:, & Halitschke R., (2010). Salicylate-mediated interactions between pathogens and herbivores. *Ecology*, 91(4), pp. 1075–1082.
70. Traw, MB, Bergelson, J. (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(December), 1367-1375.
71. Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Mitsukawa, N., Shibata, D., and Shinozaki, K. (1996) Molecular cloning and characterization of a gene that encodes a MYC-related protein in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 32, 571–576.
72. von Dassow, et al., (2000) The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* 406, 188-192
73. Voesenek., and Blom., (1996) Plants and hormones: an ecophysiological view on timing and plasticity. *J. Ecol.* 84, 111–119.
74. Waddington, CH., (1953). Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution*, 7(2), 118-126.
75. Waddington, CH., (1956). Genetic assimilation of the bithorax phenotype. *Evolution* 7:1–13.
76. Waddington, C. H. (1961). Genetic assimilation. *Adv. Genet.* 10: 257–290.
77. West-Eberhard, MJ. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. New York, NY: Oxford University Press.
78. West-Eberhard, (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proceedings of the National Academy of Science*. 3;102, 1:6543-9.
79. Wester K, et al., (2009) Functional diversity of R3 single-repeat genes in trichome development. *Development*, 136:1487-1496.

80. Whitman, DW., & Agrawal, AA. (2009). What is Phenotypic Plasticity and Why is it important. Phenotypic Plasticity of Insects Mechanisms and Consequences. Science Publishers 2009. eBook ISBN: 978-1-4398-4296-6. DOI: 10.1201/b10201-2.
81. Xingliang Hou., Lihua Ding & Hao Yu., (2013). Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense. *Plant Cell Rep*, 32:1067–1074
82. Xingliang Hou,et al., (2010).DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Developmental Cell* 19, 884–894.
83. Yan L, Zhai Q, Wei J, Li S, Wang B, et al. (2013) Role of Tomato Lipoxygenase D in Wound-Induced Jasmonate Biosynthesis and Plant Immunity to Insect Herbivores. *PLoS Genet* 9(12): e1003964.
84. Zhou, Z., An, L., Sun, L., & Gan, Y. (2012). ZFP5 encodes a functionally equivalent GIS protein to control trichome initiation. *Plant signaling & behavior*, 7(1), 28-30.
85. Zhou, Z., An, L., Sun, L., Zhu, S., Xi, W., Broun, P., Yu, H., et al. (2011). Zinc finger protein5 is required for the control of trichome initiation by acting upstream of zinc finger protein8 in Arabidopsis. *Plant physiology*, 157(2), 673-82.
86. Zimmermann, I.M., et al., (2004) Comprehensive identification of Arabidopsis thaliana MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J.* 40, 22–34.

11. ANEXO I. REGLAS LÓGICAS

A continuación se muestran la evidencia experimental sintetizada con la cual se generaron las reglas lógicas de cada uno de los nodos considerados en el modelo.

COMPLEJO ACTIVADOR

GL1	GL3	EGL3	TTG1	ATMYC1	MYB23	CA
0	X	X	X	X	X	0
X	0	0	X	X	X	0
X	0	X	0	X	X	0
X	X	0	0	0	X	0
1	1	1	1	0	0	0
1	0	1,2	1	X	X	1
1	1,2	0	1	X	X	1
1	1	1	0	X	X	0
X	0	X	X	0	X	1
X	X	0	X	0	X	1
1	1	2	0	1,2	1,2	1
1	2	1	0	1,2	1,2	1
1	1	2	1	X	X	1
1	2	1	1	X	X	1
2	0	1	1	1,2	1,2	2
2	1	0	1	1,2	1,2	2
2	1	1	0	X	X	0
2	1	1	1	X	X	1
2	2	0	1	X	X	1
2	1,2	1,2	0	X	X	1
2	2	2	0	0	0	1
2	2	2	0	1,2	1,2	2
2	2	2	1,2	X	X	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - GL1 se expresa en las etapas iniciales del desarrollo de tricomas y su expresión disminuye antes de que el desarrollo de los tricomas esté completado. - En la mutante de <i>gl1</i> no se detecta la expresión de MYB23. - La mutante de <i>gl1</i> es glabra y no presenta expresión de <i>GL2</i>. 	<p>Lee y Schiefelbein.,1999, Kirik et al., 2005, Larkin et al., 1993,</p>
<ul style="list-style-type: none"> - La doble mutante <i>gl3 egl3</i> no produce tricomas en las hojas - En la doble mutante <i>gl3 egl3</i> la expresión de <i>GL2</i> disminuye significativamente - La sobre expresión de GL3 en la línea 35S:GL3 y de EGL3 en la línea 35S:EGL3 aumenta la expresión de <i>GL2</i>. 	<p>Bernhardt et al., 2003</p>

<ul style="list-style-type: none"> - El mutante <i>ttg1</i> presenta una reducción significativa en la expresión de GL2. - El mutante <i>ttg1</i> presenta un fenotipo de hojas y tallo glabro, sin tricomas. - En la mutante de <i>ttg1</i> la expresión de <i>GL3</i> no cambia, pero si la distribución de la proteína en la célula, siendo desigual y en parches. 	<p>Walker RA, et al., 1999, Koorneef, 1981, Di Cristina et al., 1996 Zhao et al., 2008</p>
<ul style="list-style-type: none"> - La mutante <i>myb23</i> no muestra defectos en el patrón de tricomas, sin embargo el número de ramas de éstos disminuye. - La doble mutante <i>gl1 myb23</i> es completamente glabra - La sobre expresión de <i>MYB23</i> rescata parcialmente la mutante <i>gl1</i> y es capaz de producir tricomas ectópicos en la mutante de <i>gl1</i>, aunque hay menos tricomas que en el WT y se forman clusters. - La expresión de <i>GL1</i> con el promotor de <i>MYB23</i> (<i>MYB23:GL1</i>), no recupera el mutante <i>gl1</i>. Por otro lado, la construcción <i>GL1::MYB23</i> recupera el fenotipo silvestre de la mutante <i>gl1</i> y la doble mutante <i>gl1 myb23</i>, indicando que durante el desarrollo de los tricomas, las proteínas de <i>GL1</i> y <i>MYB23</i> son funcionalmente equivalentes. 	<p>Kirik et al., 2005, Kirik et al., 2001.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - En la mutante de <i>atmyc1</i> disminuye la expresión de GL2. - La mutante <i>atmyc1</i> muestra un fenotipo en el cual hay una disminución en el número de tricomas en las hojas. - <i>AtMYC1</i> comparte un residuo de Arginina funcionalmente conservado con <i>EGL3</i> y <i>GL3</i> que le permite interactuar con <i>TTG1</i>, <i>GL1</i> y <i>TRY</i>, - A diferencia de <i>EGL3</i> y <i>GL3</i> no forma dímeros. 	<p>Zhao et al., 2011, Pesch M. et al., 2013</p>

INHIBIDORES

Debido a que las proteínas CPC, TRY, ETC, y TCL actúan de forma parcialmente redundante, la acción de estas proteínas fue resumida en un nodo denominado Complejo Inhibidor (CI).

COMPLEJO INHIBIDOR

CPC	TRY	ETC	TCL	CI
0	0	x	x	0
0	1,2	0	0	0
0	2	1,2	1,2	1
1,2	0	0	1	0
1,2	0	1	0	0
1	0	1,2	1,2	1
1	1	0	0	1
1	1	2	2	2
1	2	x	x	2
2	1	x	x	2
2	2	x	x	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La frecuencia de clusters en la mutante de <i>cpc</i> no muestra diferencias con la WT. - El número de tricomas por hoja en la mutante de <i>cpc</i> se incrementó comparada con la WT. - El número de tricomas en la cuarta hoja, es >30% y en todas los estados de desarrollo de las hojas, indicando que el incremento en el número de tricomas es debido a un incremento en la densidad más que al efecto de un periodo extendido de formación de tricomas o a la formación de hojas más grandes - El análisis de plantas que contienen CPC::GUS muestran un patrón de expresión indistinguible del de TRY. La expresión de CPC en hojas maduras se concentra en los tricomas. 	<p>Zhu et al., 2009 Wada et al., 1997, Wada et al., 2002</p>
<ul style="list-style-type: none"> - TRY se expresa no sólo en órganos que desarrollan tricomas, si no también en raíz y silicuas - Aunque TRY se expresa en tricomas, la expresión ubicua de TRY suprime la formación de tricomas - En la doble mutante <i>cpc try</i> hay un aumento de 76% de clusters comparado con <i>try</i>, además de que cada uno contiene de 20 a 30 tricomas. - 35S::TRY producen más tricomas - En la mutant de <i>try</i> no se observa un fenotipo aparente en pelos de raíz, la mutante <i>cpc</i> presenta una disminución en el número de pelos, en la doble mutante <i>cpc try</i>, no se observa ningún pelo. - Resultados genéticos muestran que TRY actúa como un regulador negativo de GL1, ya que la s.e. de GL1 es contrarrestada por TRY. El fenotipo de 35S::GL1 <i>try cpc</i> es aditivo, lo cual es consistente con la hipótesis de que ambos genes actúan como inhibidores de GL1. - La s.e. de GL1 no afecta el fenotipo de la 35S::TRY o 35S::CPC, mientras que la s.e. de un homólogo de GL3 resulta en el completo rescate del fenotipo de 	<p>Schnittger et al., 1999; Schellmann et al., 2002 Simon et al., 2007; Tominaga et al., 2008; Wang et al., 2008; Wester et al., 2009. Gan et al., Gan et al., 2011; Tominaga-Wada and Nukumizu, 2012 Tominaga-Wada and Nukumizu, 2012.</p>

35S::CPC pero no de 35S::TRY, lo cual sugiere diferencias en sus interacciones.	
- La mutante de <i>etc1</i> presenta un fenotipo de tricomas similar al WT, sin embargo la línea 35S::ETC1 muestra una reducción en el número de tricomas.	Esch et al., 2004; Kirik et al., 2004b Wang & Chen, 2014
- Las mutantes sencillas de <i>etc2</i> y <i>etc3</i> presentan un fenotipo de tricomas similar al WT, sin embargo la línea 35S::ETC2 y 35S::ETC23 muestran una reducción en el número de tricomas	Kirik et al., 2004a , Wang & Chen, 2014
- Las mutantes sencillas de <i>tcl1</i> y <i>tcl2</i> muestran un incremento en el número de tricomas de la inflorescencia y el pedicelo, mientras que la sobre expresión de cada una, muestra una disminución en el número de tricomas de las hojas.	Wang et al., 2007
<ul style="list-style-type: none"> - La doble mutante <i>try etc3</i>, presenta un genotipo débil sinérgico, es decir, la densidad de tricomas es similar a <i>etc3</i> y la frecuencia de clusters es significativamente mayor a la de la mutante <i>try</i>. - <i>cpc etc3</i> muestra un genotipo similar al de la mutante <i>cpc</i> - <i>etc3 etc1</i> muestra un aumento significativo en los tricomas, indicando que actúan redundantemente. - <i>etc2 etc3</i> exhibe una densidad de tricomas similar a la de la mutante <i>etc3</i>, sin embargo, una función redundante se encontró en la triple mutante con ETC1. - <i>etc1 etc2 etc3</i> un número significativamente más alto de tricomas se encontró comparado con la mutante <i>etc1 etc3</i>. - <i>etc3 try cpc</i> presenta un efecto mucho más fuerte, donde solamente se observan algunos clusters, los cuales contienen más de 100 tricomas. Éste genotipo se incrementa en la cuádruple mutante <i>etc1 etc3 try cpc</i> y <i>etc1 etc2 try cpc</i>. - <i>trycpcetc1tcl1</i> forma tricomas en casi todas la partes aéreas de la planta. 	Wang & Chen, 2014 Kirik et al., 2004a; Wang et al., 2007; 2008; Wester et al., 2009

GLABRA1

JAZ	GIS	CA	GL1
0	0	X	1
0	1,2	X	2
1	0	X	1
1	1,2	0	1
1	1,2	1,2	2
2	0	2	1
2	0,1	0	0
2	0,1	1	0
2	2	0	1
2	2	1	1
2	2	2	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - En la sobre expresión de GIS la expresión de GL1 aumenta y en la mutante <i>gis</i>, la expresión de GL1 disminuye. 	Gan et al., 2006 Gan et al., 2007
<ul style="list-style-type: none"> - Las proteínas JAZ (JAZ1, JAZ2, JAZ5, JAZ6, JAZ8, JAZ9, JAZ10, y JAZ11) se unan a GL1, esto se probó por Ensayos de dos híbridos. Se observó que interactúan a través del dominio terminal C de GL1, reprimiendo su transcripción. - La inducción de JA en la mutante <i>gl1</i> no se produce 	Qi et al., 2011
<ul style="list-style-type: none"> - La expresión de GL1 disminuye en los mutantes <i>ttg1</i> y <i>gl3 egl3</i> - La expresión de GL1 aumenta en la mutante <i>try</i>. 	Kirik et al., 2005

GLABRA3 y ENHANCER OF GLABRA3

JAZ	UPL3	GIS	AC	GL3/EGL3
X	X	X	0	0
0	0	0	1,2	1
0	0	1,2	1,2	2
0	1,2	0	0	0
0	0	1,2	0	0
0	1	1,2	1,2	2
1	0	1,2	1,2	2
1	1	1,2	1,2	1
1	2	1,2	1,2	1
2	0	1,2	1,2	1
2	1,2	1,2	1,2	1
2	2	0	X	0
2	2	2	0	0
2	2	2	1,2	1

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La mutante de <i>upl3</i> provoca un aumento en el número de tricomas y una disminución en la expresión de EGL3 y GL3 - UPL3 regula negativamente a la proteína de GL3 y EGL3 - GL3 activa parcialmente la expresión de UPL3 - La mutante <i>gl3</i> inhibe la expresión de UPL3 y la sobre expresión de GL3 lo induce. 	Downes et al., 2003 Barunava et al., 2013 Kirik et al., 2005 Payne et al., 2000
<ul style="list-style-type: none"> - En la mutante de <i>ttg1</i> la expresión de GL3 y EGL3 no cambia, pero si su distribución en la 	Kirik et al., 2005 Srinivasan et al., 1992

célula (proteína) siendo desigual y en parches, lo mismo sucede en la mutante de <i>gl1</i> .	Zhao et al., 2008
<ul style="list-style-type: none"> - En la sobre expresión de GIS la expresión de GL3 aumenta y en la mutante disminuye. - Las proteínas JAZ (JAZ1, JAZ2, JAZ5, JAZ6, JAZ8, JAZ9, JAZ10, y JAZ11) se unan a GL3, esto se probó por Ensayos de dos híbridos. EGL3 y GL3 participan en la inducción de tricomas mediados por JA. 	<p>Gan et al., 2006, Gan et al., 2007 Bernhardt et al., 2003. Zhang et al., 2003. Zhao et al., 2008. Qi et al., 2011</p>

atMYB23

AC	atMYB23
0	0
1	1
2	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La expresión de MYB23 depende de los componentes del CA. En la mutante de <i>gl1</i>, (<i>e</i>)<i>gl3</i> y <i>ttg1</i> la expresión de MYB23 se encuentra reducida drásticamente (RT-PCR). - GL1 se une directamente al promotor de MYB23. 	Kang et al., 2009
<ul style="list-style-type: none"> - Interactúa con el mismo dominio en GL3 que GL1 pero no interactúa con TTG1. - La hojas de doble mutante <i>gl1 myb23</i> son completamente glabras. - La sobre expresión de atMYB23 rescata parcialmente la mutante <i>gl1</i> y es capaz de producir tricomas ectopicos en ausencia de GL1, pero hay menos tricomas que en el wt y se forman clusters. 	Kirik et al., 2005

AtMYC1

AC	AtMYC1
0	0
1	1
2	1

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - Comparte un residuo de Arginina funcionalmente conservado con (E)GL3 que le permite interactuar con TTG1, GL1 y TRY. - Funciona redundantemente con <i>gl3</i> en el tallo, mientras que en las hojas es parcialmente redundante. 	<p>Zhao et al., 2011 Pesch M. et al., 2013</p>

CAPRICE

AC	CPC
0	0
1	1
2	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La co-transfección de GL1/WER y GL3/EGL3 fue suficiente para activar la transcripción de CPC. - En las líneas 35S::G1-GL3 los transcritos de CPC fueron detectados mayormente comparada con la WT. - CPC es un blanco directo de GL3/GL1. Puede interactuar físicamente con GL3 o EGL3 y se ha demostrado que compite con GL1 para unirse a GL3 en células de levadura. - La expresión de CPC disminuye drásticamente en las mutante de <i>ttg1</i> y <i>gl1</i>. 	<p>Morohashi & Grotewold, 2009 Morohashi et al., 2007</p>

TRYPTICHON

SPL9	CA	TRY
0	0	0
1	0	0
1	1	1
1	2	2
0	1	1
0	2	1
2	0	0
2	1	2
2	2	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La expresión de TRY depende de los genes del CA. - Los mutantes <i>gl1</i> y <i>ttg1</i> presentan muy poca expresión de TRY. - La expresión de TRY disminuye en la doble mutante <i>gl3/egl3</i>. - GL3 puede unirse a TRY sólo en un estado más tardío de desarrollo, una vez que ya se han comenzado a formar los tricomas, antes no. 	<p>Simon et al., 2007. Morohashi et al., 2007.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Activan la expresión de TLC1 y TRY al unirse a sus promotores. - SPL9 se une directamente al promotor de TRY y activa su expresión de forma independiente a GL1, reduciendo el número de tricomas. Sugiriendo que el control temporal del desarrollo de tricomas es regulado por miR156-blanco SPL TFs. 	<p>Yu N et al., 2010.</p>

ENHANCER OF TRIPTICHON AND CAPRICE

Los genes *ETC1*, 2 y 3 se condensaron en un sólo nodo llamado ETC debido a que presentan una gran similitud en su estructura genética y presentan una gran redundancia en su actividad.

AC	ETC
0	0
1	1
2	1

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La expresión de los ETC disminuye considerablemente en los mutantes en los genes que producen las proteínas que conforman al CA, indicando que el CA activa la expresión de este gen. - En las líneas 35S::G1 y 35S::GL3 los transcritos de ETC1 y ETC3 fueron detectados en mayor cantidad comparados con los transcritos en un planta silvestre, - ETC1 y ETC3 son blancos directos de GL3/GL1. 	<p>Simon et al., 2007.</p> <p>Morohashi & Grotewold, 2009.</p>

TRICHOMELESS

TCL1 y *TCL2* se condensaron en un sólo nodo llamado TCL debido a que presentan una gran similitud en su estructura genética y presentan una gran redundancia en su actividad.

SPL9	TCL
0	1
1	1
2	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - Activan la expresión de TLC al unirse a sus promotores - SPL9 se une directamente al promotor de TCL1 y activa su expresión de forma independiente a GL1, reduciendo el número de tricomas. 	<p>Kirik et al., 2004</p> <p>Yu N et al., 2010</p>

GLABROUS INFLORESCENCE STEMS

DELLA	SPY	ZFP6/GIS3/ZFP5	GIS
0	0	x	2
0	1,2	x	1
1	0	x	2
1	1	0	0
1	1	1,2	1
1	2	x	0
2	2	x	0

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - En la mutante <i>zfp5</i>, <i>zfp6</i> y <i>gis3</i> la expresión de <i>GIS</i> disminuye, mientras que en la sobre expresión de estos tres la expresión de <i>GIS</i> aumenta. - Análisis moleculares han demostrado que ZFP5, ZFP6 y GIS3 actúan río arriba de GIS. 	Zhou et al. 2011, Zhongjing et al., 2012
<ul style="list-style-type: none"> - La expresión de <i>GIS</i> aumenta en la mutante <i>spy</i>. 	Wainberg et al., 2005
<ul style="list-style-type: none"> - La pérdida de GAI y otras proteínas DELLA restaura la expresión de <i>GIS</i> a los niveles de la planta silvestre. 	Gan et al., 2007

ZINC FINGER PROTEIN6/ ZINC FINGER PROTEIN5/ GLABROUS INFLORESCENCE STEMS3

GA	CK	ZFP6/GIS3/ZFP5
0	0,1	0
0	2	1
1	0	0
1	1	1
1	2	2
2	0	1
2	1,2	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La producción de tricomas en las ramas laterales y hojas caulinares en las mutantes de <i>gis3</i>, <i>gis3zfp5</i>, <i>gis3zfp6</i> y <i>gis3zfp5zfp6</i> disminuyó en comparación con las plantas WT en respuesta a un tratamiento con citoquininas. - La expresión de GIS3 incrementó en respuesta a un tratamiento con Giberelinas en plantas silvestres y en la mutante <i>ga1-3</i>. 	Gan et al., 2006, 2007. Sun et al., 2014. Zhou et al., 2011.

ZINC FINGER PROTEIN8/GLABROUS INFLORESCENCE STEMS2

ZFP6/GIS3/ZFP5	ZFP8/GIS2
0	0
1	1
2	2

Evidencia	Referencias
- La expresión de <i>ZFP8</i> y <i>GIS2</i> disminuye en la mutante <i>gis3</i> , mientras que en la línea que sobreexpresa a <i>GIS3</i> , la expresión de <i>ZFP8</i> y <i>GIS2</i> aumenta.	Sun et. al., 2014
- Inmunoprecipitación con cromatina demuestra que <i>ZFP5</i> se une al promotor de <i>ZFP8</i> . - En la mutante <i>zfp5</i> y <i>zfp6</i> la expresión de <i>GIS2</i> y <i>ZFP8</i> disminuye, mientras que en la sobre expresión de <i>ZFP5</i> aumenta, especialmente la de <i>ZFP8</i> .	Zhou et al. 2011, Zhongjing et al., 2012
- La expresión de <i>GIS2</i> y <i>ZFP8</i> disminuye en la mutante <i>zfp6</i> .	Sun et. al., 2013

SPINDLY

GA	SPY
0	2
1	1
2	0

Evidencia	Referencias
- La actividad de <i>SPY</i> disminuye en respuesta a un tratamiento hormonal con giberelinas - En la doble mutante <i>ga1-3 spy</i> se recupera el fenotipo de la mutante sencilla <i>ga1-3</i> .	Greenboim-Wainberg et al., 2005; Jacobsen & Olszewsky, 1993.

TRANSPARENT TESTA GLABRA2

AC	TTG2
0	0
1	1
2	2

Evidencia	Referencias
- La sobre expresión de los genes que conforman al CA aumentan la expresión de <i>TTG2</i> . - La expresión de <i>TTG2</i> disminuye en los mutantes del CA	Bernhard et al., 2003

SPL9/mir156

mir156/edad	SPL9
0	2
1	1
2	0

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La expresión de miRNA156 y SPLs es temporalmente regulada. Los niveles de miR156 son elevados en las plantas jóvenes y disminuyen durante el crecimiento de la planta. Contrariamente, la expresión de SPLs, blancos de miR156 es baja en las plantas jóvenes e incrementa gradualmente durante el estado reproductivo de la planta. - MIR156 marca a las proteínas SPL para reprimirlas. 	Yu N et al., 2010

UPL3

GL3	UPL3
0	0
1	1
2	2

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - GL3 activa parcialmente la expresión de UPL3. - La mutante <i>g/3</i> inhibe la expresión de <i>UPL3</i> y la sobre expresión lo induce. 	Morohashi et al., 2007

DELLA PROTEINS

GA	DELLA
0	2
1	1
2	0

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - La percepción de la señal de las Giberelinas, interrumpe la interacción proteína-proteína entre el CA y las proteínas DELLA. - Éstas son reclutadas por el complejo SCFsly y subsecuentemente degradadas por el proteosoma 26S. 	Gan et al., 2007

JASMONATO ZIM PROTEINS

JA	JAZ
0	2
1	1
2	0

Evidencia	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - Las proteínas JAZ son blancos directos del complejo ACFCOI el cual se une a estas proteínas para degradarlas y es activado en respuesta a un aumento en la señalización del ácido jasmónico. 	Qi et al., 2011

El resto de los nodos conserva un valor predeterminado fijo a lo largo de todas las simulaciones

TRANSPARENT TESTA GLABRA 1.

La información experimental no indica que la expresión de este gen sea regulado por los otros genes de la Red de Regulación, hormonas o factores ambientales considerados. Este gen puede fijarse como 0 ó 1 para simular las líneas mutantes (0) y los ecotipos silvestres (1).

CITOQUININAS.

El modelo no considera genes, hormonas o factores ambientales que regulen la síntesis de citoquininas. El valor puede fijarse a 0, 1 ó 2 para simular la ausencia, las condiciones normales y el tratamiento hormonal (aumento o sobre expresión) respectivamente.

ÁCIDO JASMÓNICO

El modelo no considera genes, hormonas o factores ambientales que regulen la síntesis del ácido jasmónico. El valor puede fijarse a 0, 1 ó 2 para simular la ausencia, las condiciones normales y el tratamiento hormonal (aumento o sobre expresión) respectivamente.

GIBERELINAS

El modelo no considera genes, hormonas o factores ambientales que regulen la síntesis de las giberelinas. El valor puede fijarse a 0, 1 ó 2 para simular la ausencia, las condiciones normales y el tratamiento hormonal (aumento o sobre expresión) respectivamente.

HERBIVORÍA

En el modelo éste valor puede fijarse a 0, 1 ó 2 para simular la ausencia de herbivoría, las condiciones normales (default) y la presencia de herbivoría en la planta.