



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS FUNCIONAL DE ORTÓLOGOS DE LOS GENES
MADS-BOX DE FUNCIÓN "B" DE LACANDONIA SCHISMATICA
EN LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS THALIANA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

JOSÉ EDUARDO DE LA TORRE BÁRCENA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
MÉXICO, D.F. 2000
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

202972



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
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Análisis funcional de ortólogos de los genes MADS-box de función 'B' de
Lacandonia schismatica en líneas transgénicas de Arabidopsis thaliana".

realizado por José Eduardo de la Torre Bárcena

con número de cuenta 9455597-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. María Elena Alvarez-Buylla Roces

Propietario

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Propietario

Dra. Alicia Gamboa de Buen

Suplente

M. en C. Rosalinda Tapia López

Suplente

Biol. Miguel Angel Soto Arenas

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

It was the best of times, it was the worst of times, it was the age of wisdom, it was the age of foolishness, it was the epoch of belief, it was the epoch of incredulity, it was the season of Light, it was the season of Darkness, it was the spring of hope, it was the winter of despair, we had everything before us, we had nothing before us, we were all going direct to Heaven, we were all going direct the other way—

Charles Dickens (1812-1870)

A Tale of Two Cities

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
<i>La flor: estructura y sistemas reproductivos</i>	1
Evolución: patrones y procesos	7
Los genes MADS-box	11
Homología	14
Homología en plantas	15
Niveles y Conflictos	16
El estudio del desarrollo	21
<i>Sistemas modelo</i>	21
<i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo	21
Bases genéticas del patrón estructural básico de la flor: el estudio a profundidad de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
<i>Genes del desarrollo floral caracterizados</i>	24
Genes de identidad del meristemo	25
Genes homeóticos florales	26
<i>El Modelo ABC</i>	30
Diversidad: visiones y estudios	32
<i>Estudios particulares</i>	33
<u>Lacandonia schismatica</u>	36
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	40
MATERIALES Y METODOS	41
Antecedentes Técnicos: La introducción de DNA exógeno en sistemas vegetales	42
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
Características generales	42
Aplicaciones	43

<i>Promotores constitutivos: el CaMV35S</i>	44
<i>Transformación de células de Agrobacterium spp</i>	45
<i>Transformación de Células Vegetales</i>	46
MATERIALES Y METODOS	49
<i>Generación de plantas mutantes de Arabidopsis thaliana</i>	49
<i>Diseño de las construcciones</i>	51
<i>Preparación de los genes de <u>Lacandonia schismatica</u></i>	51
Introducción de sitios de restricción	52
Introducción en vectores binarios	53
Cultivo de plantas de A thaliana para infiltración	56
RESULTADOS	57
DISCUSION	66
Consideraciones Técnicas	67
Procesamiento de los genes y diseño de construcciones	67
Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> : generación de líneas transgénicas	68
<i>Condiciones Experimentales</i>	70
Consideraciones Teóricas: especulaciones sobre un resultado por venir	71
<i>Importancia de los promotores</i>	71
<i>Genes reguladores y evolución</i>	73
Escenarios alternativos	75
Deducciones a partir de integraciones y modelos	75
Enhancers	76
Perspectivas	77
CONCLUSIONES	78
APÉNDICES	80
LITERATURA CONSULTADA	95

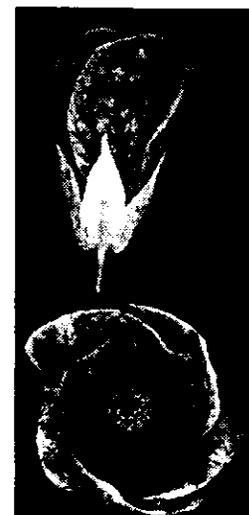
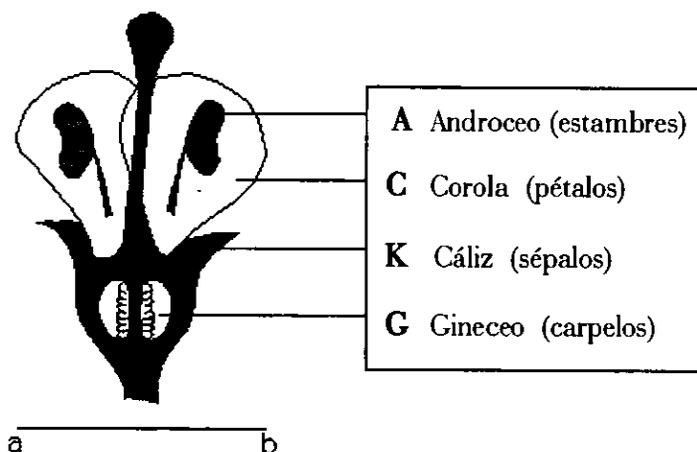
INTRODUCCIÓN

Wearing all that weight
Of learning lightly like a flower.
TENNYSON
Conclusion

La flor: Estructura y sistemas reproductivos

La flor es un conjunto de estructuras especializadas en la reproducción. Constituye el rasgo más distintivo del grupo de plantas terrestres conocido como *angiospermas*. El arreglo general de la flor denominada 'perfecta' consta de cuatro verticilos, ejes concéntricos a partir de los cuáles surgen las estructuras u órganos reproductivos. El más externo (primer verticilo) se compone de *sépalos*, estructuras foliosas de color verde que sirven de protección al resto de la flor durante su desarrollo temprano. Se le conoce como *cáliz*. El segundo verticilo se compone de *pétalos*, los órganos más evidentes, coloridos y diversificados morfológicamente, asociados a funciones de protección de los órganos sexuales maduros, y de atracción a polinizadores. Al conjunto de pétalos también se le conoce como *corola*. Estos dos primeros verticilos forman el *perianto*, el cual es estéril. En el tercer verticilo se desarrolla el *androceo*, formado por *estambres* (los órganos sexuales masculinos, en cuyas anteras se origina, por meiosis, el pólen). El cuarto verticilo -el más interno- es el *gineceo*. Se compone de *carpelos*, estructuras en cuyo interior (ovarios) maduran los óvulos, hasta convertirse en semillas (**Fig 1**).

Figura 1. Esquema y ejemplo de la flor 'perfecta' (*Abutilon sp.*)



Aunque la polinización cruzada confiere distintas ventajas (heterocigosis, variabilidad e intercambio genéticos y mayor probabilidad de supervivencia a largo plazo), la enorme mayoría de las plantas con flor (~72%) son hermafroditas.

La baja proporción de plantas estrictamente monoicas (1%) o estrictamente dioicas (7%) (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993) puede obedecer a algunas de las siguientes causas:

- que sea un mecanismo relativamente nuevo (cf. hermafroditismo);
- que sea un estilo reproductivo relativamente más costoso;
- que las ventajas de la polinización cruzada no se asocien directamente a la adecuación individual inmediata,
- que la polinización cruzada pueda garantizarse por estrategias ajenas a la sexualidad (mecanismos de autoincompatibilidad), y por tanto sea posible aún en flores hermafroditas.
ó
- por razones ajenas a su valor selectivo, más ligadas a cuestiones aleatorias (e.g. evolución por deriva génica).

El resto de las plantas presentan fenotipos considerados como intermedios, tanto en términos morfológicos, como evolutivos. La proporción de los distintos tipos de sexualidad se mantiene entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, y se ha observado que el dioicismo es más frecuente en ecosistemas tropicales (e.g. Ashton, 1969).

La opinión de que todas las angiospermas surgieron de un ancestro hermafrodita (Cronquist, 1988, *in*: Dellaporta y Calderón Urrea, 1993) sugiere que al menos una parte considerable de los mecanismos de desarrollo se encontraría presente en todas las especies, y que las variaciones observables serían modificaciones a este plan básico de desarrollo (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993). Por otro lado, no todas las modificaciones que promueven la polinización cruzada se circunscriben a la anatomía (ver **tabla 2**, de modificaciones florales asociadas a la reproducción). La distribución taxonómica tan aleatoria del monoicismo y el dioicismo sugiere orígenes independientes (y a veces muy recientes) de la determinación del sexo en las plantas, lo cual es confirmado por la gran diversidad de mecanismos y estrategias, aparentemente independientes, que las plantas no hermafroditas utilizan para la determinación de su sexualidad (Charlesworth y Gilmartin, 1998).

La **tabla 1** muestra la diversidad en modos de sexualidad. En las especies dioicas, cada flor presenta un arreglo en el que sólo está presente el androceo o el gineceo. En estas flores, parece haber controles a nivel embriológico, manifestados a través de la reducción, o el aborto de los primordios de aquéllos órganos sexuales que no se observan en la flor adulta. En casi todas las especies analizadas es posible observar vestigios de los órganos sexuales abortados (dos excepciones estudiadas son *Cannabis* spp. y *Mercurialis* spp.).

La regulación genética del sexo, al menos en algunas especies dioicas, parece encontrarse en genes específicos de la determinación del sexo. Todas las flores pasarían entonces por un estadio bisexual temprano, en el que todos los órganos inician su desarrollo de manera normal. En determinado momento a partir de este estado, la activación de los genes sexuales determinarían el destino de los órganos, y en consecuencia la sexualidad de la flor (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993), muy al estilo de lo que ocurre en algunos animales.

La existencia de genes de la determinación sexual no implica una especificación de la sexualidad sólo por estos factores. Existen casos documentados en los que la abundancia de recursos en el ambiente (e.g. intensidad de luz y fotoperíodo) influyen directamente en la expresión del sexo de los individuos de una especie (e.g. Gregg, 1975). Una forma de explicar observaciones como estas, es que la expresión de estos genes pudiera estar controlada a algún nivel por factores ambientales, o inherentes a la planta, como la edad.

Los mecanismos genéticos de la determinación del sexo en las plantas se encuentran actualmente bajo la lupa. Algunas especies dioicas no parecen tener cromosomas sexuales citológicamente distinguibles, pero muchas más presentan sistemas X/Y, donde el cromosoma Y determina la masculinidad (e.g. la vid –*Vitis vinifera*- y *Silene latifolia*). Algunos grupos de investigación exploran el cromosoma X de varias especies en busca de genes determinantes del sexo. Diversos estudios se han realizado en plantas de maíz y en el helecho *Ceratopteris* sp., que ayudan a entender mejor ciertas estrategias de especificación sexual. Otras variantes incluyen especies con sistemas X/Y1/Y2 (e.g. *Rumex acetosa*); Z/W, o sistemas balanceados, con un cromosoma X-autosómico, en los que los heterócigos son machos (e.g., el kiwi y el espárrago). En plantas como *Silene latifolia*, se han realizado análisis moleculares, en los que la supresión de la ‘femineidad’ en plantas masculinas es reversible a través de procesos de desmetilación del DNA. Esto, además de demostrar la variedad de mecanismos independientes, sugiere que el sexo podría ser determinado muy temprano, o incluso antes del desarrollo floral (Parker, Lu, Vyskot, Banks y Perl-Treves, *in*: Charlesworth y Gilmartin, 1998).

Tabla 1 . Diversidad en la sexualidad de Flores, Plantas y Poblaciones Vegetales.

Categoría	Sexualidad	Fenotipo	Descripción	Ejemplos	
Flores Individuales	Hermafroditas (bisexualadas, monoclinas)	m-f	Flor bisexualada que contiene estambres y carpelos		
	Diclinas (unisexualadas)	m ó f	Flores unisexualadas		
	<i>Pistiladas (carpeladas)</i>	f	Sólo flores unisexualadas femeninas (con carpelos)		
	<i>Estaminadas</i>	m	Sólo flores unisexualadas masculinas (con estambres)		
Plantas Individuales	Hermafroditas	m-f	Sólo flores hermafroditas/bisexualadas	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Antirrhinum majus</i>	
	Monoicas	m y f (sep)	Flores pistiladas y estaminadas en la misma planta	<i>Zea mays</i> (maíz)	
	Dioicas	f ó m	Flores estaminadas y pistiladas en plantas distintas	<i>Asparagus officinalis</i> (espárrago)	
	Ginoicas	f	La planta porta sólo flores pistiladas		
	Androicas	m	La planta porta sólo flores estaminadas	<i>Mangifera indica</i> (mango)	
	Ginomonocicas	m-f y f	La planta porta flores tanto hermafroditas como pistiladas	<i>Fragaria spp</i> (fresa)	
	Andromonocicas	m-f y m	La planta porta flores tanto hermafroditas como estaminadas	<i>Olea europaea</i> (olivo)	
	Trimonocicas (polígamas)	m-f, f y m	Flores hermafroditas, pistiladas y estaminadas en la misma planta	<i>Piper nigrum</i> (pimienta)	
	Poblaciones Vegetales	Hermafroditas 72 %	m-f	Sólo plantas hermafroditas	
Monoicas 7 %		f y m (sep)	Sólo plantas monoicas		
Dioicas 4 %		f y m	Sólo plantas dioicas		
Ginodioicas		7 %	m-f y f	Plantas (individuos) tanto hermafroditas como ginoicas	
Androodioicas			m-f y m	Plantas tanto hermafroditas como androicas	
Trioicas (subdioicas) 10 %		m-f, y f, y m	Poblaciones con plantas hermafroditas, pistiladas y estaminadas.		

Fuente: Dellaporta S. y A. Calderón-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1241-1251.

Existe la posibilidad de que la unisexualidad de las flores estuviera controlada por la activación selectiva o la expresión diferencial de genes homeóticos florales, aunque ésta aparece como una opción poco plausible. Los cambios producidos por la inactivación de estos genes, por lo general no producen fenotipos comparables a los observados formando al grueso de las plantas con flor que parten del esquema de la flor perfecta. Ejemplos de exploraciones al respecto involucran a especies/sistemas modelo. Las mutaciones homeóticas por lo general producen fenotipos en los cuales son dos los verticilos afectados (las plantas *ap3* o *pi* de *A. thaliana* muestran cambios en pétalos y estambres; plantas *ag*, en estambres y carpelos) lo cual no corresponde a lo observado en la naturaleza, salvo en los contados casos conocidos de mutantes homeóticos naturales. Pero aún en los contados casos en los que se conozca de genes homeóticos florales que actúen sobre un solo verticilo (el reemplazo de carpelos por estambres en plantas *Flo10/superman* de *Arabidopsis thaliana*; cambios en el 2° verticilo en *heptandra* de *Digitalis* sp. y los mutantes *green petal* ó *ph3* en *Petunia* híbrida), no se considera que éstos sean responsables de las distintas variantes sexuales presentes en la naturaleza (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993).

Entre las razones para afirmar lo anterior, se encuentra el análisis genético de algunas de las variantes, pero también debe considerarse lo robusto de la hipótesis alterna, que implica a genes específicos para la determinación sexual. Igual atención debe prestarse a las observaciones sobre el aborto de los órganos sexuales previo a la determinación de su identidad. Sobre todo, es menester recordar que los genes homeóticos determinan la identidad de las estructuras, pero no siempre los mecanismos de proliferación celular (*que ocurra* esta proliferación, más allá de *cómo* sobrevenga). En la mayoría de los casos, en las flores unisexuadas se suscita el arresto de estos procesos proliferativos, y no la substitución de identidades en regiones que continúen creciendo, como se esperaría para los genes homeóticos. Como resultado, las flores unisexuadas maduras presentan ‘huecos’ en donde habría de estar el órgano abortado; más que regiones continuas de un solo tipo de órgano.

Otros ejemplos de flores no hermafroditas, son: las que no poseen pétalos (e.g. las flores de las Fagales y demás plantas amentíferas, o las flores liguladas, -flósculos de disco- en las *Asteraceae*); y las que sólo contienen pétalos (e.g. los flósculos centrales, o de rayo, también en las *Asteraceae*). Las inflorescencias de las plantas de esta familia (llamadas *capítulos*) se encuentra formadas por flores especializadas (los ya mencionados *flósculos*), que en etapas tempranas son indistinguibles entre sí. Al igual que en los ejemplos de flores unisexuadas, la especialización de las flores maduras ocurre mediante el aborto temprano de órganos florales (Yu *et al.* 1999).

Tabla 2. Modificaciones observadas en flores hermafroditas y diclinas.

Mecanismo	Descripción	Ejemplos
Favorecen autopolinización		
Cleistogamia	Producción de flores cerradas que se autopolinizan antes de abrir	<i>Lacandonia schismatica</i>
Homogamia	maduración sincrónica de estambres y estigmas (carpelos)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Favorecen polinización cruzada		
Chasmogamia	Flores abiertas capaces de polinización abierta	<i>Lamium aplexicaule</i>
Dicogamia	Maduración asincrónica de estambres y estigma	<i>Annona cherimola</i> (chirimoya)
protoginia	Estigmas receptivos (al polen) previo a que el polen de la misma flor sea liberado	<i>Persea</i> spp (aguacate)
protandria	liberación de polen precede maduración (receptividad) de estigma.	<i>Daucus carota</i> (zanahoria). <i>Impatiens capensis</i>
Autoincompatibilidad	Imposibilidad de cruce/fecundación entre gametofitos genéticamente similares. El óvulo no puede ser fecundado por el tubo polínico de la misma planta (Pre- y Post-cigótica)	<i>Ipomoea batatas</i> (camote?) <i>Chicorium intybus</i> (chicorio?)
Esterilidad	Producción de órganos sexuales (o de gametos) no funcionales	Varietades de aguacate, manzana, cereza, papaya y pistache.
Heterostilia	Modificaciones en la longitud de los estilos (carpelos) para impedir u obstruir la autopolinización.	<i>Primula</i> spp 3
Síndromes de polinización	adaptaciones de distinta índole (anatómicas, cromáticas, químicas) que favorecen la acción de agentes externos para el transporte del polen.	<i>Potamogeton</i> spp <i>Naja</i> spp ; <i>Zea mays</i> y casi todos los pastos (Poaceae) anemofilia <i>Elodea</i> spp, <i>Ranunculus</i> spp, <i>Vallisneria</i> spp hidrofilia <i>Orchis</i> spp, <i>Allium cepa</i> (cebolla), <i>Rubus</i> spp (blackberry) entomofilia <i>Ananas comosus</i> (piña) ornitofilia <i>Musa</i> spp (plátano), <i>Agave</i> spp quiropterofilia

Fuente: Dellaporta S. y A. Calderón-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1241-1251. (modificada)

Los procesos de interrupción del desarrollo de estructuras florales parecieran ser la base de una parte importante de las variantes encontradas entre las flores del planeta. Al menos en algunos casos, estos procesos podrían deberse a factores regulatorios de la expresión de genes conocidos, más que a la acción de genes específicos. Dentro de una misma especie, entre especies muy cercanas, o entre taxa más lejanos, los cambios en el número y tamaño de órganos, la simetría en el arreglo y disposición de éstos, o el desarrollo desmesurado de ciertas estructuras en relación a sus pares, serían explicables invocando mecanismos similares, que a su vez habrían sido la base de los procesos de especiación y divergencia entre estos clados.

Otro tipo de flores son aquéllas en las que sépalos y pétalos son idénticos. Dicho de otro modo, el primero y segundo verticilos están ocupados por órganos de petaloides, o *tépalos*, los cuales podrían ser considerados como una fusión de órganos florales. En este caso el perianto recibe el nombre específico de *perigonio*. El número, tamaño, simetría, forma y aspecto general de las flores varía entre miembros de cada especie, pero la disposición y naturaleza de los verticilos se conserva en todas las flores existentes en el mundo. O en *casi* todas, como se verá más adelante.

Evolución: patrones y procesos

La diversidad en el mundo vivo, particularmente la de las plantas con flor, ha tratado de explicarse de innumerables formas. Uno de los grandes misterios ha sido, históricamente, el del origen y evolución de la flor misma como entidad reproductiva. La enorme variedad en formas y estilos puede explicarse, por ejemplo, invocando a la selección natural como fuerza evolutiva, aunque este argumento sólo daría cuenta de las formas observables, más que del origen mismo de la variedad.

Dentro del esquema de la Síntesis Evolutiva, las fuentes de variación son la mutación y la recombinación genética (Mayr, 1982). Una de las interpretaciones que de la Teoría Sintética han dado sus críticos (y muchos de sus seguidores más acrílicos) es que los cambios que ocurren sobre los seres vivos -aquéllos que generan variación heredable, sobre la que puede actuar la selección-, deben ocurrir en forma gradual. En sustento de esta visión, se ha recurrido a evidencias de origen múltiple, desde paleontológico hasta genético. Un ejemplo de este uso se encuentra en el hallazgo de *Archaeopteryx lithografica*, fósil encontrado en un yacimiento en Alemania en 1861, y que representa el eslabón que vincula inequívocamente a reptiles y aves (Mayr, 1982).

La gran mayoría de las transiciones evolutivas hipotetizadas no encuentran un sustento en el registro fósil, si se explican como producto de una evolución morfológica estrictamente gradual. Muchos paleontólogos gradualistas sostendrían que esto se debe a que hay ancestros intermedios (como *Archaeopteryx*) que no se han podido encontrar, por la naturaleza accidentada del registro fósil o de la investigación misma.

Pero esto no siempre ocurre así, y el no encontrar evidencias transicionales no siempre puede ser atribuído a factores tafonómicos o a errores de muestreo. No en todos los casos pudo haberse dado una transición gradual, y más allá de la imperfección del registro fósil, hay ejemplos en los que la relación entre dos especies o grupos es muy cercana (cercanía que es determinada, por ejemplo, mediante estudios de filogenética molecular), pero las diferencias fenotípicas entre ellas son abismales. En otros casos, se tiene registro del surgimiento de taxa enteros, radicalmente distintos a los preexistentes en una época determinada, cuyo origen y diversificación ocurrió en un tiempo muy corto. Demasiado corto para incluir a las generaciones suficientes para una serie gradual razonable de cambios heredables.

Estos ejemplos podrían socavar severamente las interpretaciones estrictamente gradualistas sobre la evolución de los organismos. Muchas veces se trata simplemente de extrapolaciones ligeras de los mecanismos microevolutivos a la macroevolución. Pero el que no todas las transiciones evolutivas ocurrieran de forma gradual no borra el hecho de que una proporción importante de éstas si se hubiesen dado así. *Archaeopteryx lithografica* podrá ser una quimera, en un sentido literal, pero no es producto de la imaginación de ningún hombre.

En realidad, tanto una visión como las otras tienen fundamentos sólidos. Las teorías de evolución gradual (Mayr, 1982) de los equilibrios puntuados (Eldredge y Gould, 1979, *in* Mayr, 1982) o de evolución en mosaico (Carroll, 1998) pueden encontrar sustento suficiente en la naturaleza. El error radica en suponer que, por sí solas, son explicaciones universales y excluyentes entre sí. Más allá de desacreditar alguna de las posturas, el encontrar ejemplos para cada una, permite suponer que todas son ciertas, según el caso que se revise, y buscar elementos básicos que las unifiquen, dependiendo de la escala y los niveles en que el problema se analice.

Con una visión un tanto más flexible, la escuela sintética podría darse cuenta que, considerando a la mutación como una fuente de variación por ellos aceptada (y corroborada en la naturaleza), muchos de los cambios producidos por mutaciones puntuales, o que

ocurren a través de un solo paso, son capaces de producir cambios drámaticos en el fenotipo del organismo cuyo genoma las ha sufrido.

Una gran parte de estas mutaciones serán neutrales (la abrumadora mayoría, según el modelo postulado por Kimura desde 1968; ver Li, 1997). Muchas de estas mutaciones serán deletéreas y letales, o serán eliminadas de las poblaciones al producir cambios que disminuyan la adecuación. Pero una fracción de estas mutaciones, no por mínima menos importante, será capaz de generar cambios que: no estén sujetos a la selección, se fijen por deriva, o bien resulten en un aumento en la adecuación de los individuos que las presenten. En unas cuantas generaciones, tales cambios pueden fijarse en una población, o bien dar origen a una nueva, si los individuos que los poseen se separaron de la población original.

Procesos de este tipo podrían explicar el surgimiento de grupos tan diversos como los que se aprecian a partir del Cámbrico en formaciones como la lutita Burgess (*Burgess shale*), surgidos a partir de los muy escasos que existían poco antes (en términos geológicos). En tan sólo un instante geológico, la fauna que pobló el planeta pasó de ser una colección poco diversa de organismos de tamaño reducido, cuerpo blando y poco especializado (fauna de Ediacara), a un universo sofisticado de forma y diseño. Varios de los grupos que formaron parte de la llamada 'explosión del Cámbrico', persisten aun como los organismos más exitosos (en diversidad, ubicuidad y abundancia) de nuestra época.

Algunos de los cambios mayores que dan origen a nuevos clados a través del tiempo requieren de muchas generaciones para hacerse patentes (o desaparecer por completo) en las poblaciones: tal sería el caso de los procesos de *duplicación génica*, y la posterior modificación de las secuencias/dominios duplicados; o los procesos de barajeo de exones o dominios funcionales (*exon/domain shuffling*), que pueden dar como resultado productos polipeptídicos con dominios de origen disímulo (*proteínas mosaico*). La generación de nuevos genes, proteínas y funciones, también puede ocurrir a través de otros mecanismos, como *alternative splicing* genes sobrelapados (alternancia de marcos de lectura), genes compartidos (*gene sharing*), alternancia de promotores y edición de RNA (para más detalles revisar: Li, 1997 y Shimeld, 1999). La poliploidía, la hibridación y la endosimbiosis también pueden considerarse fuentes y mecanismos de diversidad.

Pero una parte significativa de los cambios monumentales en el fenotipo, son causados por mecanismos que no requieren de miles ni cientos de generaciones, sino incluso una sola para manifestarse (y algunas decenas para hacerse apreciables en la población, si fuera el caso). Algunos de estos, ampliamente estudiadas en años recientes, son:

- Transposición de **elementos genéticos móviles (transposones)**. Transposición se define como el movimiento de material genético de un sitio cromosómico a otro. Según la especificidad del transposón, este fenómeno puede ocurrir dentro de una sola célula o individuo, o entre individuos (durante la reproducción, o a través de vectores-e.g. bacterias o virus, por lo que pueden ser lejanos filogenéticamente). Existen dos tipos de transposición –replicativa y no replicativa-, y un sinnúmero de elementos móviles (incluyendo los retrotransposones, que viajan en forma de RNA). Los primeros transposones se descubrieron en maíz a finales de los años '40 por Barbara McClintock. Por su capacidad de generar nuevas mutaciones y rearrreglos cromosómicos no logrados por otros mecanismos conocidos, se le considera como un factor determinante en los procesos evolutivos, entre los que destaca la especiación (Li, 1997) y la domesticación (Bureau, 1991).
- Mutaciones en **genes reguladores maestros (GRM, o redes y circuitos de GRM), como los genes homeóticos**. El nombre *homeótico* remite irremediablemente al término acuñado por Bateson a finales del siglo XIX, y aplicado empíricamente a partir de 1923*. *Homeosis* se refiere a la aparición de rasgos específicos en sitios inusuales. La estructura correcta (bien formada) en el lugar equivocado. Estas transformaciones de rasgos (estructuras, órganos, regiones o secuencias de éstos) ocurren al producirse mutaciones en loci o genes determinados, que en consecuencia se denominan **genes homeóticos**. Las mutaciones homeóticas pueden transformar un segmento o parte del cuerpo en la región correspondiente de otro segmento, dando lugar a fenotipos como los ampliamente conocidos en moscas de la fruta (*antennapedia*, *eyeless*, *ultrabithorax* y *labial*, entre muchos otros). En plantas, se ha descrito ampliamente a los genes homeóticos florales (ver más adelante). Más recientemente, se ha propuesto la integración de los GRM en redes y circuitos complejos, cuya estructura y función en sistemas específicos recién están revelándose (Mendoza y Alvarez-Buylla, 1998). El papel de los genes homeóticos en la especificación del plan corporal, y en la regulación genética del desarrollo en organismos pluricelulares los ha convertido en tema central para el estudio de las bases, los mecanismos, y de la evolución del desarrollo.

* El primer mutante homeótico en animales, *bithorax*, fue descubierto por Bridges y Morgan en ese año, y descrito en 1978 por E.B Lewis como parte de un conjunto mayor de genes homeóticos (complejo *bithorax*) que participan en la especificación temprana del plan corporal de *Drosophila melanogaster*. Análisis posteriores muestran conservaciones dramáticas en la secuencia, orden y función de estos genes entre animales (incluidos los vertebrados), en los que reciben el nombre genérico *Hox* (Li, 1997).

Durante los procesos que dieron origen, y permitieron la evolución de la flor, pudieron haber intervenido mecanismos y fenómenos como los descritos anteriormente. Esta consideración permitiría explicar al menos parcialmente la enorme diversificación y radiación adaptativa de las angiospermas, en lapsos temporales relativamente cortos a partir del Cretácico. Entre los factores genéticos que pudieron haber fungido como base para tales procesos de diversificación morfológica, ocupan un lugar preponderante los miembros vegetales de la superfamilia MADS-box de genes regulatorios (Lawton-Rauh *et al.*, 2000; Theissen *et al.* 1996).

Los genes MADS-box

La caja MADS, o MADS-box, debe su nombre al acrónimo derivado de los factores de transcripción que la incluyen, (todos eucariontes) y en los cuales se describió primero (MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS y Serum Response Factor o Factor de Respuesta Sérica -SRF- de levadura, plantas y humanos, respectivamente). Aunque están presentes en casi todos los grupos de organismos vivos, y en todos cumplen funciones genéricas similares (i.e. factores de transcripción muy arriba o al principio *-upstream-* de sistemas modulares de redes regulatorias) su papel específico es distinto en cada uno de ellos.

En plantas, los genes de la familia MADS-box codifican para una proteína de 240-260 aminoácidos de longitud, la cual incluye: la caja MADS, la caja K, la región I, y, en algunos genes, una extensión o extremo amino-terminal (N). En el extremo 3', se ubica la región carboxilo-terminal, con un papel probable como dominio activador de la transcripción de otros genes (Yanofsky, 1999).

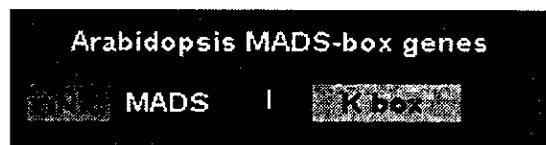


Fig. 2. Estructura general de los genes MADS en plantas (Yanofsky, 1999)

La caja MADS se ubica en el extremo 5' de todos los genes que la incluyen (genes MADS-box). Se trata de una región altamente conservada de unos 180 nucleótidos de longitud, que codifica para un dominio polipeptídico (57 aminoácidos) que se asocia al DNA, en regiones específicas de otros genes, promoviendo su transcripción. En ella, se aprecian secuencias particulares de aminoácidos, con escasa variación de un gen a otro.

La caja K es una región que codifica para un dominio polipeptídico de unos 70 aminoácidos. Su estructura es similar al motivo de hélices anfipáticas (*coiled coil*) de la queratina (*keratin* en inglés, de ahí su nombre), la cual puede permitir la interacción entre proteínas. Las regiones MADS y K están separadas por una región intermedia (*I-intervening*), muy poco conservada –y por tanto, altamente variable de gen a gen– (Riechmann y Meyerowitz, 1997; Yanofsky *et al.*, 1999).

Los genes MADS-box en plantas juegan un papel central en el desarrollo de la flor y hasta donde se conoce, en el de varias otras regiones como la raíz el fruto, el embrión, la hoja y el pólen, entre otras. Estos genes intervienen también en la transición hacia la floración, especificando la transición del meristemo apical (de la fase vegetativa a la reproductiva). De igual manera, determinan si el meristemo de inflorescencia se mantiene como tal (crecimiento indeterminado) o si asume un crecimiento determinado (floración). Aparentemente, tales funciones ocurren a través de la activación de genes blanco, más abajo en la cadena de desarrollo. Algunos de estos genes *downstream* ya han comenzado a caracterizarse (Sablowski y Meyerowitz, 1998).

Todas las proteínas con dominio MADS analizadas hasta la fecha han mostrado afinidad al DNA, en secuencias particulares. La asociación al DNA se produce cuando las proteínas se unen formando dímeros (tema revisado por Riechmann y Meyerowitz, 1997). En todos los estudios, incluidos aquéllos realizados *in vitro*, se ha visto que el dominio MADS es necesario para la asociación de la proteína al DNA, así como importante para una adecuada dimerización. Las proteínas MADS, en forma de homo- o hetero-dímeros, muestran una alta afinidad hacia una familia común de secuencias de diez pares de bases (CC(A/T)₆GG), conocidas como la caja *CAR_G* –acrónimo de: *CC-A rich-GG region*-. Además de actuar como activadores de la expresión de genes *downstream*, esta región parece estar asociada a la regulación de la expresión de los propios genes MADS actualmente conocidos (Tilly *et al.*, 1998; Theissen *et al.*, 1996).

Aquellos genes MADS-box que intervienen en el desarrollo de la flor han podido agruparse en grupos monofiléticos (conocidos como grupos de genes homeóticos florales, Purugganan *et al.*, 1995) cuyo origen se remonta a instantes históricos previos a la divergencia entre helechos y plantas con semilla. Munster *et al.* (1997) han aislado y caracterizado genes MADS-box expresados en gametofitos y esporofitos del helecho *Ceratopteris* sp. Sus datos sugieren que al menos dos genes MADS homólogos a los homeóticos florales existían ya en el último ancestro común de las plantas vasculares actuales (Pterophyta y Spermatophyta). Dichos genes sufrieron procesos de duplicación

reiterada, seguidos por otros de divergencia y diversificación. A la postre, estos genes fueron reclutados para distintas funciones (aunque aún asociadas a la reproducción), dentro de nuevas redes del desarrollo, a través de la transición que dio origen a la flor.

Estimaciones de reloj molecular sugieren que la divergencia entre los distintos linajes de genes MADS-box de flor comenzó hace 450-500 millones de años: alrededor del tiempo de origen de las plantas terrestres (calculado mediante análisis similares,; Purugganan, 1997) y el registro fósil.

Homología

El término *homología* proviene del griego *ομολογια* que significa 'acuerdo'. El concepto fue introducido por Richard Owen en 1843, para referirse a la similitud fundamental observada entre órganos y estructuras de distintos organismos, los cuales reflejan un 'acuerdo', o correspondencia, en su arreglo estructural fundamental. Esta visión, que privilegiaba a la forma sobre la función para asignar relaciones de similitud, constituyó un rompimiento de la visión arquetípica predominante desde Aristóteles, y un antecedente propicio para el surgimiento de una visión evolutiva de la forma y las relaciones entre los seres vivos.

De esta manera, se comenzó a concebir a las estructuras homólogas como tales, independientemente de las modificaciones morfológicas y funcionales que hayan ocurrido entre ellas; tales estructuras serían homólogas por lo que son, más que por lo que hacen (de Beer, 1971), como es el caso entre las alas de pájaros y murciélagos, pero también entre éstas y las aletas de un delfín, o las patas de un camello.

Varios fueron los científicos que a partir de diversas disciplinas contribuyeron a robustecer este concepto de homología (con George Cuvier ocupando un destacadísimo sitio). Sin tocar el tema directamente, Darwin estableció los fundamentos teóricos definitivos. En trabajos como '*El Origen de las Especies*' (1859) discutió elementos que resultan torales en la definición moderna de la homología: el concepto de *origen común* y las relaciones de *ancestría* que existen entre los seres vivos.

La observación de las similitudes entre estructuras (i.e. de la homología entre éstas) ve en la teoría de la evolución la explicación que le faltaba: dicha similitud ocurre en razón de un origen compartido, seguido por las posibles modificaciones sufridas por las entidades homólogas a través del tiempo y en función de distintos factores (la interacción con el ambiente, entre ellos). Homología resulta entonces la presencia de un rasgo en el ancestro común más reciente de dos especies que lo presenten (Wray y Abouheif, 1998). Establecido lo anterior, son las entidades (órganos, estructuras, genes) homólogas, los que proporcionan la evidencia de afinidad entre organismos o linajes en los que *se ha generado descendencia con modificación, a partir de un ancestro común* (i.e. *Evolución*).

Si consideramos lo improbable que resulta en realidad contar con los ancestros para su estudio directo, por lo común la homología resulta más una hipótesis sobre la historia

evolutiva de un rasgo o un linaje determinado, que una afirmación basada en observaciones directas. Cuando se habla de homología, entonces, se hace referencia a la hipótesis de que un rasgo similar entre dos taxa conocidos, es más antiguo que el proceso de divergencia que les dio origen (Wray y Abouheif, 1998).

Homología en plantas

Las hojas de una planta son apéndices laterales del tallo, diferentes de éste, y con crecimiento determinado. Comunmente presentan un primordio (yema) en la unión (axila) entre su base y el eje del tallo del cual surgen. Existen incontables formas y estilos de hoja, y entre sus modificaciones se encuentran, desde las acículas de ciertas coníferas, hasta las espinas de las cactáceas, pasando por los foliolos de las palmas y las leguminosas, y las ‘valvas’ de ciertas plantas carnívoras. Como brácteas, foliolos, escamas, espinas o zarcillos, las hojas siempre serán hojas. Pero hay estados, como en los órganos florales, en los que la relación es algo menos evidente.

Lineo lo había sugerido en sus trabajos, y los *Naturphilosophen* lo enunciaron formalmente. Como Goethe, quien desde 1790 llamó la atención de la comunidad científica al proponer en su *Metamorphose der Pflanze* que las flores estaban compuestas por conjuntos de hojas modificadas. Es decir, postuló una hipótesis de homología entre los órganos florales y las hojas. Esta faceta menos conocida del hombre de letras, ya había sido puesta de manifiesto en varios escritos en los que Goethe expresaba sus ideas sobre anatomía animal comparada. En sus términos, y en la búsqueda constante por “los patrones que conectan”, encontró en las hojas al *Proteo*ⁿ vegetal. Friedrich Wolff, algunos años antes, también había ideado tal hipótesis, al describir el desarrollo de hojas, estambres y carpelos, y comparar embriológicamente las esporófilas de distintos grupos de plantas.

Morfológicamente, este principio fundamental puede ser observado desde las formas más primitivas y evidentes, como las frondas de los helechos, o los carpelos foliosos y abiertos de *Drymis* sp., hasta las flores más estilizadas. Sépalos y pétalos asemejan hojas típicas, si bien con distinto color y textura. Tanto carpelos como estambres serían hojas plegadas sobre sí mismas para albergar a las esporas, razón por la cual se les conoce como mega- y micro-esporófilas, respectivamente. Algunos mutantes naturales, como las flores

ⁿ Proteo: dios griego del Mar, hijo de Poseidón; su padre le otorgó el don de la profecía, y de poder cambiar de forma a voluntad.

seleccionadas por tener un exceso de pétalos -en detrimento del número de órganos reproductivos- son conocidos desde tiempos remotos. Y hasta el advenimiento de enfoques experimentales más sofisticados, tales especímenes fueron inspiración y prueba de aquéllos que, como Wolff y Goethe, vieron en las hojas el sustrato natural para el origen evolutivo de las flores.

Las hipótesis que relaciona a hojas y órganos florales como estructuras homólogas, se fortaleció de forma contundente a partir de datos genéticos cuando, en el contexto de la gestación del modelo ABC de la morfogénesis floral, los experimentos de generación de triples mutantes para los genes homeóticos florales (genes A, B y C de especificación de la identidad de órganos florales) dieron como resultado 'flores' con conversión total de sus órganos (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) en hojas, casi idénticas a las del resto de la planta (Weigel y Meyerowitz, 1994).

Niveles y Conflictos

A nivel molecular, la hipótesis de homología se establece en primera instancia en base a la secuencia de los elementos constitutivos de las moléculas involucradas en la transmisión de la información (herencia). En el caso de las proteínas, se considera el arreglo sucesivo de los aminoácidos; y en los ácidos nucleicos, el de los nucleótidos, como evidencia primaria de una probable ancestría común. Cada elemento es considerado como un carácter, y sus distintas formas posibles (cuatro bases nitrogenadas en ácidos nucleicos; veinte aminoácidos en proteínas), los estados de carácter. La hipótesis de homología se fortalece conforme las secuencias comparadas comparten un mayor número de caracteres similares (presenten el mismo estado de carácter), hasta alcanzar la identidad (100% de similitud).

Aún así, este es un nivel preliminar en la postulación de hipótesis de homología. Aunque es muy poco probable que dos secuencias muy similares no provengan de un ancestro común, es necesario robustecer esta hipótesis mediante análisis más profundos. Entre estas, se incluye la asignación de valores para cada estado de carácter. Determinar qué estados se consideran ancestrales y cuáles derivados, y así proponer agrupaciones particulares, para la construcción de un árbol filogenético que refleje estas propuestas.

La hipótesis de homología se postula con base en la similitud entre secuencias. La falsificación de la hipótesis puede ser el resultado de análisis filogenéticos, de parsimonia y/o de congruencia de los caracteres puestos a prueba. Estos caracteres (secuencia de genes

o proteínas) se acomodan en árboles previamente estructurados con base en fuentes independientes de datos/caracteres. La coincidencia en topología entre árboles preexistentes, y aquellos basados en las secuencias de interés, constituyen evidencias importantes que apoyan una hipótesis de homología (ortología-paralogía).

Los análisis funcionales pueden ser una prueba para apoyar hipótesis de homología, aunque es necesario tomar sus resultados con cautela. Como ya se dijo, la posibilidad de que dos secuencias provengan de un ancestro común no disminuye por el hecho de que la función de éstas secuencias sea diferente, incluso de la función ancestral. Si por análisis y pruebas como los descritos anteriormente se cuenta con evidencias muy fuertes de que dos genes son homólogos, una divergencia en su función no debilita esta hipótesis. Sin embargo, si se cuenta con evidencias fuertes de que dos genes son homólogos, y además comparten una misma función, esta hipótesis de homología puede verse apoyada aún más.

Cuando se habla de genes homólogos, se hace referencia a las secuencias derivadas de un gen ancestral compartido. Tal derivación pudo darse a través de eventos de duplicación, o mediante la herencia directa de la secuencia, misma que por lo general conserva la estructura ancestral en los linajes derivados. Dentro de los conceptos de homología aplicables a los genes, se considera que dos genes son *parálogos* si medió entre ellos un evento de duplicación (con o sin divergencia posterior); y *ortólogos*, si se derivan de un evento de especiación (Li, 1997). Lo anterior se esquematiza en la **figura** .

Los genes parálogos se encuentran en la misma especie, los ortólogos en especies distintas. Aunque a ambos se les identifica inicialmente por comparaciones de las secuencias, es probable que dos ortólogos sean más similares que dos parálogos. Esto depende de las tasas de sustitución, y del tiempo de divergencia. Un ejemplo de genes ortólogos es el representado por *APETALA3* y *DEFICIENS*, de *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*, respectivamente. Como genes parálogos, puede mencionarse el caso de *APETALA3* y *PISTILLATA* en *A. thaliana*, o *DEFICIENS* y *GLOBOSA* en *A. majus*. *PI* y *GLO* serían –por cierto– genes ortólogos.

La llegada de la genética y la biología molecular al primer plano de la biología, significó también nuevos retos para el concepto de homología. Por un lado, la evidencia proporcionada por ejemplos como el del gen '*eyeless*' (sin ojos) en moscas de la fruta (posiblemente un caso de redundancia funcional, en el que tras varias generaciones, moscas poseedoras de este alelo deletéreo en homocigosis, son capaces de generar prole con ojos), los cuales hablan de la posibilidad de que un mismo órgano tenga bases genéticas

distintas. De modo que existen estructuras indiscutiblemente homólogas cuya formación esté controlada por genes distintos (i.e. no homólogos).

En la biología molecular del desarrollo, el descubrimiento de que los genes responsables de desencadenar muchas de las funciones ontogenéticas vitales se encontraban conservados estructuralmente (i.e. en su secuencia) a través de grupos taxonómicos muy distantes en el árbol de la vida abrió aun más el abanico de escalas y niveles de homología. Estos genes podían o no codificar o regular la formación de estructuras homólogas. En la mayoría de los casos, lo que se conserva es el mecanismo de acción, o los productos inmediatos, pero no el producto final, el cual no es considerado homólogo a sus contrapartes morfológicas en otros organismos, bajo criterios tan sólidos como disímbolos. Tal es el caso de los genes *Hox* de polaridad anteroposterior, o los que se encuentran en la base del desarrollo de ojos en dípteros, cefalópodos y mamíferos.

En el extremo, si se acepta la muy plausible teoría de que la vida tuvo un origen único en la Tierra (monofilia), todos los seres vivos compartirían un ancestro común y estarían emparentados desde su origen más difuso y oscuro. Bajo esta óptica, todas las estructuras (y genes) de todos los seres vivos serían homólogas, en el supuesto de que existió al menos una forma primordial correspondiente en el ancestro común universal.

Ante la evidencia de que la homología fenotípica no siempre está basada en homología genotípica (y su antípoda genético-molecular), resulta apremiante la redefinición de límites, que permitan mantener la utilidad conceptual y práctica de la homología en estudios comparados, sin perder de vista la existencia de niveles distintos de organización y análisis.

A través de numerosos ejemplos experimentales, se ha podido constatar que hay casos en los que pueden existir genes homólogos que den origen a estructuras homólogas, y casos en que, a pesar de existir genes homólogos y estructuras homólogas, los primeros pueden no contribuir en el desarrollo de las segundas. Y aunque el primer caso es más atractivo, es probable que el segundo sea más común (Wray y Abouheif, 1998). Esto puede explicarse mejor si se considera que un mismo mecanismo de desarrollo (codificado por el mismo gen) puede estar presente en distintos lugares (grupos celulares o especies) llevando a cabo funciones distintas. Así ocurre con la vía *Notch* de señalización, presente en procesos no homólogos en Artrópodos, Nemátodos y Cordados) y con algunos genes del desarrollo en plantas (como *AG*, *LEAFY* y *API*) involucrados en mecanismos distintos de un mismo proceso general -la floración-. Estos genes y estos mecanismos han sido reclutados para distintas funciones precisamente por su capacidad de llevarlas a cabo.

Los mecanismos moleculares de transmisión de señales, o de activación y represión de la expresión de otros genes, no se circunscriben a un solo contexto de desarrollo. A veces ni siquiera al desarrollo. Se trata de módulos o elementos que, por su flexibilidad, son intercambiables, y 'evitan' a la célula, al organismo y a la evolución la 'necesidad' de crear un mecanismo para cada proceso. La cooptación de elementos de una vía para el establecimiento de una nueva ya había sido estudiada en procesos metabólicos, y es muy probable que en el desarrollo ocurra algo muy similar.

A nivel de desarrollo, se ha perfeccionado un concepto de homología biológica, el cual postula que 'las estructuras de dos individuos, o de un mismo individuo son homólogas si comparten un conjunto de restricciones en su desarrollo, provocadas por mecanismos autorregulatorios de acción local que incidan sobre la diferenciación de los órganos'. Esta adecuación permite incluir con más seguridad dentro del concepto a ciertos casos de homología iterativa (como los órganos florales) dentro de los organismos, así como aquéllos entre individuos de la misma especie (carpelos y estambres en flores/plantas distintas; pene y clítoris entre hombres y mujeres). De la misma forma, restringe el concepto a estructuras individuales, más que a complejos de estructuras (Wagner, 1989): Los componentes de la flor, más que la flor misma; los segmentos individuales de los artrópodos, más que los tagmas o regiones multisegmentarias. Esta especificación remite a entidades que pueden compartir una organización ontogenética, más que una similitud general en términos morfológicos. En términos genéticos, lo anterior sería equiparable a la homología entre genes, las estructuras que producen, y los mecanismos moleculares e inductivos mediante los cuales los genes dan lugar a las estructuras.

En el ámbito de la genética molecular del desarrollo, existe la visión de que aún si los patrones de expresión de los genes no son tan estables como en un principio se creyó, las vías de regulación y expresión de los genes si son entidades conservadas. Esto, debido a su gran complejidad y niveles de interconexión, lo cual permite su postulación como criterios de homología. El riesgo de esta visión, que en algunos casos ha demostrado ser equivocada (e.g. las vías de genes *Pax* en el establecimiento de patrones anteriores distintos en varios grupos; o el de las vías *Notch* de señalización), es el de desasociar el concepto de homología de la estructura –visión tradicional- y aplicarla a similitudes en procesos, más que en patrones. Estos casos de conservación a varios niveles, incluidos procesos, podrían dar cuenta de homología profunda a nivel evolutivo (*homoilogía*), pero aún así podría no desembocar en estructuras homólogas.

Es frecuente también el uso erróneo del término para describir las ocasiones en que ciertas moléculas conservan su función a través de las especies. Como ya se explicó, la definición de homología es independiente de la función de un órgano o gen, y se aplica más en términos de su estructura y posición. El concepto de '*homología funcional*' se desmorona si se invocan ejemplos en los que estructuras no homólogas tienen la misma función (analogía o convergencia), o en los que un mismo gen, con una misma función, den lugar a estructuras no homólogas (Bolker y Raff, 1996).

Los casos en que hay conservación en la función de ciertos genes, o en los que genes homólogos den origen a estructuras homólogas (o participen en su desarrollo) son abundantes, y por demás atractivos. Sin embargo, no parecen ser la regla, y en ningún caso sería correcto descartar hipótesis de homología a un nivel si éstas no se ven apoyadas a otros niveles. Si la función y las vías de desarrollo conectan homologías de distintos niveles, esto puede deberse a historias comunes, pero también a restricciones en la cantidad, disponibilidad y arreglo de los elementos constitutivos de los procesos.

Hay quienes, como Bolker y Raff (1996) opinan que el estudio del desarrollo en sus vertientes genético-moleculares no aporta nada nuevo al concepto de la homología, aunque si al conocimiento de sus bases genéticas; los procesos de desarrollo que les dieron origen y la evolución de estos procesos para dar origen a la diversidad observada. Particularmente cuando existen diferencias entre niveles, y existan estructuras homólogas en cuyo desarrollo no participen genes homólogos. A este respecto, se propone que lo más adecuado para no colapsar el concepto de homología, volviéndolo inútil, es contemplar de manera separada los distintos niveles de homología, y centrar los análisis en el nivel –genético o morfológico- en el que se trabaja en un momento dado.

La conciliación entre visiones encontradas parece encontrarse en propuestas como la de Page y Holmes (1998). Estos autores advierten sobre el cuidado que debe guardarse al utilizar el término homología, pero a la vez se permiten cierta laxitud en aras de un uso práctico (y correcto) del término, aún en el plano de la biología molecular del desarrollo. Así, distinguen entre homología de genes, de secuencias y de funcionalidad. Genes homólogos incluirían módulos y exones, por ejemplo. Secuencias homólogas se referiría a dominios específicos. Al hablar de funcionalidades homólogas, distinguen entre funciones homólogas y no homólogas, refiriéndose a casos en los que una misma función desempeñada por genes similares (e.g. de lisozima) en distintas especies haya surgido una sola vez, y se haya heredado, o haya surgido independientemente.

El estudio del desarrollo

Sistemas modelo

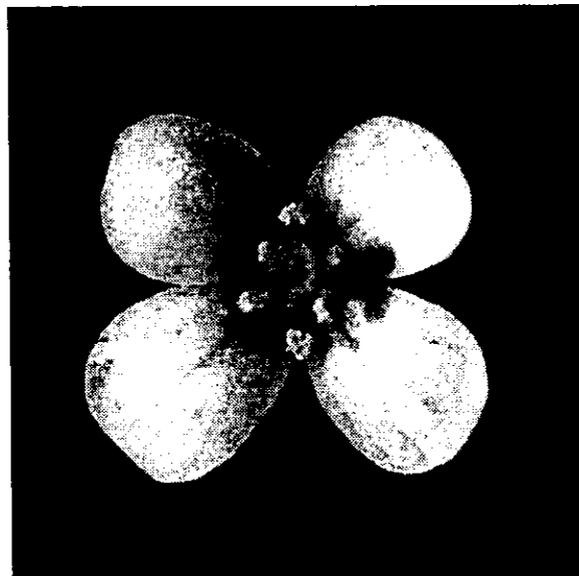
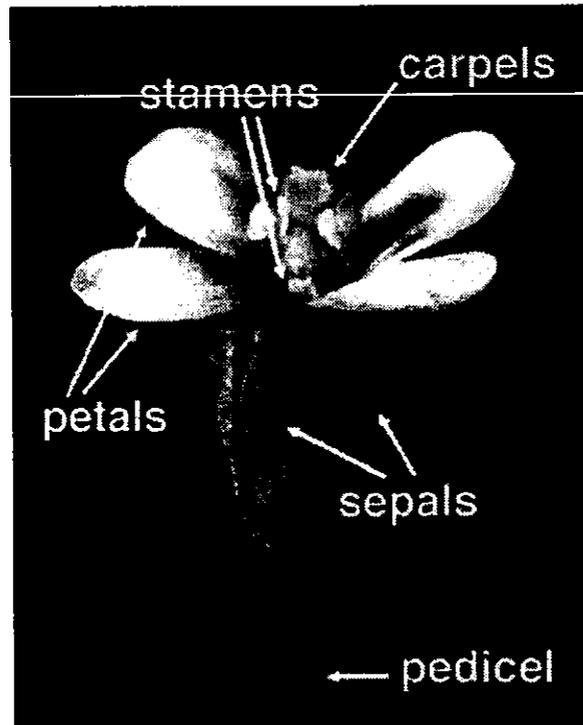
Así como en animales se cuenta con especies que por sus rasgos particulares resultan adecuados para el estudio del desarrollo, en especial de sus bases genéticas y moleculares (tal es el caso del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, o el ratón doméstico *Mus musculus*), en plantas existen varias especies a través de las cuales se ha construido el conocimiento sobre genética del desarrollo adquirido hasta la fecha. Estos sistemas modelo se han elegido básicamente por su disponibilidad, facilidad de cultivo, tiempos cortos de generación, tamaño compacto (tanto de individuos como de genomas) y fenotipos distinguibles en razón de la experimentación. A veces cuentan también razones idiosincráticas, propias de cada investigador o grupo de trabajo, mismas que no es propósito de este estudio desentrañar. Las especies vegetales más estudiadas hasta el momento son: *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), *Antirrhinum majus* (Scrophulariaceae) y *Petunia hybrida* (Solanaceae), todas dicotiledóneas (particularmente eudicotiledóneas). Algunas monocotiledóneas han sido adoptadas como especies modelo, particularmente *Zea mays* y *Oryza sativa* (Poaceae) (Bowman *et al.*, 1993; Coen y Meyerowitz 1991; Weigel 1999; Yanofsky 1999; Baum, 1998) Es mucho lo que se conoce sobre estas especies modelo, incluyendo la secuencia entera de sus genomas, como es el caso de *Petunia hybrida* y *Arabidopsis thaliana*

***Arabidopsis thaliana* como sistema modelo**

La secuenciación total del genoma de *Arabidopsis* hace apenas un año, es una característica que se suma a las múltiples ventajas que esta planta presenta, y que la han convertido en una de las plantas más estudiadas, utilizadas y útiles para estudios biológicos.

Varios son los campos en los que se emplea a *Arabidopsis* como sistema experimental, incluyendo a la fisiología, la citología y la biología molecular. Sin embargo, esta especie resulta particularmente útil en el estudio de la genética molecular del desarrollo, tema que abarca ya prácticamente todas las partes de la planta (flor, raíz, hoja, semilla y fruto, además de partes constituyentes de cada región). Tal utilidad radica en algunos de los rasgos particulares de *Arabidopsis*:

- Rasgos discretos y definidos, sencillos y accesibles al análisis.



**Estructura general de la flor de *Arabidopsis thaliana* (fenotipo silvestre)
(de Meyerowitz, 1999)**

- Genoma compacto, con una baja proporción de intrones y elementos genéticos móviles nativos.
- Tamaño reducido; facilidad y economía en su cultivo y mantenimiento
- Tiempos de generación relativamente cortos; alta producción de semillas por generación.

Otra de las ventajas que presenta *Arabidopsis*, es la de poseer una bajísima tasa de heterocigosis en sus poblaciones naturales. Esto ha sido muy útil a la hora de generar o caracterizar mutantes, así como para asociar ciertos fenotipos a genes/loci específicos. También es importante para el análisis de poblaciones naturales, considerando la alta probabilidad de encontrar variantes, en una especie tan prolífica, abundante y conocida, de la cual se cuenta con colecciones de semillas provenientes de amplias zonas del hemisferio Norte. Considerando que ya se conoce totalmente la secuencia genómica de la especie, será posible el análisis integral de estas poblaciones. Por ejemplo, la clonación posicional de Loci de Rasgos Cuantitativos (*Quantitative Trait Loci- QTL*) para características novedosas se hará de manera mucho más sencilla (Weigel *et al.*, 1999).

Bases genéticas del patrón estructural básico de la flor: el estudio a profundidad del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

El desarrollo reproductivo de las plantas se rige por factores extrínsecos e intrínsecos. Entre los primeros, se encuentran los factores ambientales, que forman las señales para la activación y acción de los segundos. Durante la fase vegetativa, el meristemo apical primario de *Arabidopsis thaliana* produce hojas de entrenudos muy cortos, formando una roseta. Previo al evento reproductivo, la planta se aboca a la acumulación acelerada de nutrientes y reservas. La transición a la fase reproductiva, regulada por redes complejas de genes reguladores de la floración, se ve influenciada por factores ambientales tan diversos como el fotoperíodo, la calidad de la luz y la temperatura. También por señales internas, como la edad y la presencia y proporción relativa de hormonas, que actúan como intermediarios macroinductores de distintos procesos celulares. Se sabe, por ejemplo, que la hormona *giberelina* participa activamente en el desarrollo floral de *Arabidopsis thaliana* (Okamoto *et al.*, 1993).

Luego de la transición entre fases, el meristemo apical de *Arabidopsis* comienza la producción de meristemas florales en vez de yemas foliares a lo largo de sus nodos. La

producción de las últimas hojas, llamadas caulinares, se caracteriza por el paulatino alargamiento de los entrenodos, y se considera como una segunda fase vegetativa. Los meristemos secundarios, surgidos de las axilas foliares, continúan este patrón de crecimiento (tallos largos en constante ramificación, con producción constante de flores en los nodos *-inflorescencias-*) y permanecen indeterminados a lo largo de toda la fase reproductiva hasta llegar a la senectud (Liljegren *et al.*, 1999).

En sus etapas tempranas, el desarrollo floral parece tener dos pasos fundamentales, en los cuales operan -en forma consecutiva- sendas clases de genes regulatorios (Parcy *et al.*, 1999):

- ***Genes de identidad del meristemo.*** Se expresan muy temprano en la transición a la floración, y a través de todos los primordios florales incipientes. Controlan la identidad del meristemo apical, en su paso de vegetativo a fértil; también controlan la identidad del meristemo reproductivo (m. inflorescencia-m. floral). En esta categoría se encuentran TFL1 y LFY, así como AG, AP1 y AP2.
- ***Genes homeóticos florales.*** Estos actúan en etapas posteriores para especificar la identidad de los órganos florales de manera específica. Su expresión ocurre en dominios precisos dentro de la flor. Aquí se ubican AP1, AP2, AP3, PI, AG.

Entre los factores internos, se cuenta también a los genes (y a sus productos), muchos de ellos ampliamente estudiados, entre los que se encuentran los de la familia MADS-box. El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene un grupo muy numeroso de genes MADS. Actualmente se conocen al menos 38, muchos de los cuales son protagonistas en el desarrollo de la flor (Riechmann y Meyerowitz, 1997; Yanofsky *et al.*, 1999).

Genes del desarrollo floral caracterizados

La mayoría de los fenotipos florales anómalos descritos por Goethe -y otros- desde 1790, son causados por mutaciones sobre genes específicos. A lo largo de la década de 1980, la información sobre estos mutantes en términos genéticos se multiplicó y sistematizó, a través de la caracterización de muchos de los mutantes ya descritos y otros nuevos seleccionados a través de exhaustivas revisiones de enormes colecciones vegetales. Muchos otros fueron generados experimentalmente, a través de la exposición de plantas y semillas a mutágenos de distinta índole (e.g. químicos, como el *Etil-Metil Sulfonato - EMS*), para su

posterior selección. Una abrumadora mayoría de las selecciones de mutantes naturales y experimentales fueron llevados a cabo en especies vegetales modelo, particularmente *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* (Coen, 1999; Bowman, 1993).

En años recientes, se ha podido identificar, aislar, clonar y caracterizar a un conjunto de genes –muchos de ellos MADS-box-, cuya función es la de controlar y especificar el desarrollo floral en estos sistemas modelo. Entre los participantes en el desarrollo de la flor se incluyen tanto genes de la floración, como de la morfogénesis floral. Así, han surgido muchos de los nombres tan ampliamente conocidos y estudiados, como LEAFY, AGAMOUS, APETALA 1, 2 y 3, PISTILLATA, y varios más de *Arabidopsis thaliana*, o PLENA, SQUAMOSA, GLOBOSA y DEFICIENS de *Antirrhinum majus*.

En la nomenclatura usual, las proteínas codificadas por estos genes se representan con mayúsculas (AG, AP3), los genes silvestres, con mayúsculas en itálicas (*AG*, *AP3*), y los mutantes de estos genes, con letras minúsculas en itálicas (*ag*, *ap3*)

▪ *Genes de identidad del meristemo*

De los genes que actúan en las primeras fases que conducen a la floración, se conoce en *Arabidopsis thaliana* a: APETALA1 (*API*), CAULIFLOWER (*CAL*), AGAMOUS (*AG*), LEAFY (*LFY-FLORICAULA* en *A. majus*) Y UNUSUAL FLORAL ORGANS (*UFO*). Se sabe que *API*, *CAL* y *AG* son genes MADS-box. La estructura de los productos polipeptídicos de *LFY* y *FLO* muestran motivos que permiten señalarlos como una nueva clase de factores de transcripción. Aunque presentan similitudes con otros grupos de proteínas, como aquéllas con regiones ricas en residuos de prolina (*proline-rich regions*), en general sus características son lo bastante particulares, y desconocidas en otras proteínas (Okamoto *et al.*, 1993).

La especificación de los meristemos florales de *A. thaliana* está controlada primordialmente por *LEAFY*, *API* y *CAL*. Las plantas homocigas para alelos nulos de *LFY* exhiben un alargamiento de la fase vegetativa, en donde se produce un exceso de hojas caulinares, con meristemos secundarios en cada axila. En estos mutantes donde *LFY* no se expresa, el inicio de la expresión de *API* se demora significativamente, lo que indica que, entre otras funciones, *LFY* es un inductor de *API*. Lo opuesto también es cierto: las plantas que expresan *API* constitutivamente, muestran también una expresión temprana y ectópica de *LFY* (Liljegren *et al.*, 1999).

Los mutantes *apl* presentan una conversión parcial del meristemo floral en meristemo de inflorescencia, lo cual provoca el surgimiento de flores secundarias a partir de las axilas de los órganos florales del primer verticilio (usualmente sépalos). Esto indicaría que AP1 podría estar involucrado en la transición entre el crecimiento indeterminado y el determinado de los meristemos reproductivos. Además, el hecho de que los rasgos de los mutantes de *AP1* se vean influenciados por el fotoperíodo, como ocurre con *LFY* puede ser evidencia de que ambos genes estén involucrados en la regulación fisiológica del desarrollo floral. El papel de *CAL* no ha sido determinado por sí solo. Los mutantes *cal* no generan un fenotipo distinguible en la mayoría de los ecotipos estudiados. Sin embargo, los mutantes dobles *apl-cal* presentan una conversión total de meristemos florales en inflorescencias, a manera de una reiteración múltiple de flores ('flores dentro de flores', a manera de lo observado en brócolis y coliflores). Esto indica que AP1 y CAL pueden reemplazarse para inducir la transición del meristemo de inflorescencia a flor. La aparente redundancia funcional parcial mostrada por *AP1* y *CAL* sugiere un origen común de los genes, los cuales serían el resultado de una duplicación con modificaciones posteriores (*genes parálogos*-Martínez y Alvarez-Buylla, comunicación personal).

La identidad de los meristemos vegetativos y florales es distinta debido en parte a la acción de genes como *TERMINAL FLOWER (TFL1)*. Todo parece indicar que este gen permite que el meristemo mantenga un crecimiento indeterminado (inflorescencia) aún siendo reproductivo. Los experimentos de sobreexpresión llevados a cabo hasta el momento, indican que *TFL1* y genes como *AP1* y *LFY* se regulan negativamente en forma recíproca. Las plantas que expresan constitutivamente AP1 (35S::AP1), al igual que las *tfl1*, muestran el mismo fenotipo. En ambos casos, luego de producir cinco hojas bracteolares, el meristemo apical de la planta da origen a una flor solitaria (y terminal), con lo cual se detiene el crecimiento. En estas plantas, los meristemos secundarios también sufren este fenómeno de determinación anómala (Liljegren *et al.*, 1999).

• *Genes homeóticos florales*

Una vez definido el destino del meristemo, comienza el desarrollo de las flores individuales; al surgir los primordios florales, inicia la activación de los genes homeóticos florales. En el caso particular de las flores, las mutaciones homeóticas pueden producir transformaciones en el tipo, número, forma o tamaño de los órganos florales. El destino de los órganos florales durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* es controlado por estos genes. Cuando la actividad de un gen especificador de la identidad de un órgano floral se pierde a causa de una mutación, se da la conversión homeótica de un tipo de órgano en otro. Es en análisis moleculares posteriores que se ha podido determinar que la mayoría de

los genes homeóticos florales caracterizados hasta ahora pertenecen a la familia MADS-box de genes regulatorios. Tal es el caso de *API*, *AP3*, *PI* y *AG* (Ma, 1994; Davies y Schwarz-Sommer, 1994). El perfil general de los genes de identidad de órganos florales se encuentra esbozado en la *tabla 3*.

Aunque ahora se conoce el papel dual de *API* en el desarrollo de la flor, que incluye la participación durante la determinación de la identidad del meristemo antes descrita, este gen fue identificado inicialmente como un gen de identidad de órganos florales, específicamente aquéllos que se desarrollan en el primero y segundo verticilos. Las flores *ap1* presentan hojas bracteolares en el primer verticilo (en vez de sépalos) y una ausencia total de pétalos. Su homólogo en *A. majus* es *SQUAMOSA (SQUA)*.

El gen *AP2* también parece tener funciones en ambos momentos del desarrollo floral. En la especificación de los órganos florales, se expresa en los verticilos 1 y 2, aunque sus mutantes (series de *ap2*) se ven afectados en las cuatro regiones florales. En general, las flores *ap2* son una imagen especular de carpelos-estambres:estambres-carpelos. Sin embargo, los fenotipos más severos incluyen la transformación homeótica de sépalos en carpelos provistos de óvulos (!), la ausencia de pétalos, que son reemplazados por estambres (defectuosos) y deficiencias generales en la fusión de los carpelos.

Estos cambios se explican al considerar la función regulatoria que *AP2* tiene sobre la expresión espaciotemporal de *AG*. En flores silvestres, la actividad de *AG* parece estar confinada a los verticilos 1 y 2. En mutantes *ap2* fuertes, *AG* se expresa desde etapas más tempranas, y a lo largo de los cuatro verticilos (Okamuro *et al.*, 1993).

AP3 y *PI* son genes que se expresan conjuntamente, formando heterodímeros, en el segundo y tercer verticilos florales. Tal actividad parece cumplir una función en la especificación de la identidad de pétalos y estambres. Entre el caudal de evidencias a este respecto, se cuenta con experimentos de mutación, por un lado, y de expresión ectópica de estos genes. En los primeros, se ha comprobado que las flores mutantes para cualquiera de estos genes (*ap3* y *pi*), o para ambos, presentan un fenotipo en el que los sépalos ocupan el lugar de los pétalos en el segundo verticilo, y en el tercero se observan carpelos en vez de estambres (Bowman *et al.*, 1989; Jack *et al.*, 1992).

Los experimentos de sobreexpresión muestran que cuando *AP3* se expresa de manera constitutiva en el cuarto verticilo, ocurre una conversión de los órganos correspondientes (usualmente carpelos) en estambres. De la misma forma, la expresión ectópica de *PI* en el

Tabla 3. Genes involucrados en el desarrollo del meristemo floral y el de la flor

Función/ Clase	Locus	Fenotipo Mutante	Función Molecular Propuesta	Ortólogo en <i>A. majus</i>
Identidad del Meristemo de Inflorescencia	<i>TERMINAL FLOWER (TFL1)</i>	floración temprana; conversión de m. infl. → m. floral	regulación negativa de LFY, AP1 y AP2 en el meristemo de inflorescencia; evita floración precoz	<i>CENTRORADIALIS</i>
Identidad del Meristemo Floral	<i>AGAMOUS (AG)</i>	patrón repetitivo e indet. de organogénesis: 'flores dentro de flores' [(sépalo, pétalo, pétalo) _n]	posible factor de transcripción	<i>PLENA (PLE)</i>
	<i>APETALA1 (AP1)</i>	producción de flores axilares	posible factor de transcripción ; posible reg. neg. de TFL1	<i>SQUAMOSA (SQUA)</i>
	<i>APETALA2 (AP2)</i>	similar al de ap1 ante crecimiento en día corto	reg. negativa de AG	aún sin determinar
	<i>CAULIFLOWER (CAL)</i>	fenotipo silvestre; dobles mutantes ap1 cal : m. floral → inflorescencia	aún sin determinar	aún sin determinar
	<i>LEAFY (LFY)</i>	conversión parcial: m. floral → tallo de inflorescencia	posible factor de transcripción; reg. positiva de AP1, AP3 y PI	<i>FLORICAULA (FLO)</i>
Identidad de Órganos Florales	<i>APETALA1 (AP1)</i> <i>MADS-box</i>	ausencia de pétalos; conversión homeótica: sépalos → hojas	posible factor de transcripción	<i>SQUAMOSA (SQUA)</i>
	<i>APETALA2 (AP2)</i> <i>(no es MADS-box)</i>	conversión homeótica: sépalos → hojas ó carpelos pétalos → estambres	reg. negativa de AG	aún sin determinar
	<i>APETALA3 (AP3)</i> <i>MADS-box</i>	conversión homeótica: pétalos → sépalos estambres → carpelos (similar a pi)	posible factor de transcripción; reg. positiva de PI	<i>DEFICIENS (DEF)</i>
	<i>PISTILLATA (PI)</i> <i>MADS-box</i>	conversión homeótica: pétalos → sépalos estambres → carpelos (similar a ap3)	posible factor de transcripción	<i>GLOBOSA (GLO)</i>
	<i>AGAMOUS (AG)</i> <i>MADS-box</i>	conversión homeótica: estambres → pétalos carpelos → sépalos	posible factor de transcripción; reg. negativa de AP1, AP2 y AP3	<i>PLENA (PLE)</i>

Fuentes: Okamoto *et al.*, 1993; Liljegren *et al.* 1999; Bradley *et al.* 1997.

primer verticilo provoca la transformación de sus órganos (usualmente sépalos) en sépalos de apariencia petaloide (Jack *et al.*, 1994; Krizek y Meyerowitz, 1996).

Los análisis de expresión llevados a cabo a estos genes (hibridaciones *in situ*) explican tales transformaciones, considerando la necesidad de que ambas proteínas estén presentes para actuar debidamente: se ha observado la expresión transitoria de *PI* solo en el cuarto verticilo durante estadios tempranos del desarrollo de la flor (Goto y Meyerowitz, 1994); y una expresión similar de *AP3* en cierto número de células de la superficie adaxial de la base de los órganos del primer verticilo (sépalos), justo la región que se ve transformada en estructuras petaloides al expresarse *PI* ectópicamente (Weigel y Meyerowitz, 1993). Conforme a lo esperado, al expresarse tanto *AP3* como *PI* ectópicamente, la conversión homeótica es total: las flores transformadas con 35S::*AP3* y 35S::*PI* muestran pétalos en los verticilos uno y dos, y estambres en los verticilos tres y cuatro (Krizek y Meyerowitz, 1996).

La expresión de *AG* comienza un poco después de la de *LFY* y *API* en los meristemas florales. Conforme avanza la organogénesis, *AG* continúa activo en los primordios de los verticilos 3 y 4 durante el desarrollo de estambres y carpelos. A través de experimentos de sobreexpresión y pérdida de función, se le atribuye a *AG* la función de especificación de la identidad de carpelos, generalmente en el verticilo 4, y de estambres en el verticilo 3 (junto con *AP3* y *PI*). Su ausencia en los verticilos 1 y 2 se debe aparentemente a la acción reguladora negativa de *AP2* (Okamuro *et al.* 1993).

El enlace entre las dos etapas del desarrollo (especificación de la identidad del meristemo y la de los órganos florales) y entre los genes participantes en cada una, es aún poco conocido. Se conoce a grandes rasgos el papel que los genes que participan en ambos procesos tienen en cada uno de éstos, aunque no la forma precisa en que cada gen es regulado para llevar a cabo su doble función. Tampoco los mecanismos de transición entre etapas y el control general de cada una. Entre los estudios a este respecto, existen los que involucran al gen *LEAFY* en la activación y el control de los genes homeóticos que actúan después del establecimiento del destino floral. Tal función estaría separada de la que *LFY* posee justamente en esta transición a la floración (Parcy *et al.*, 1999).

Por ejemplo, en mutantes *lfy* y *ufo*, el dominio y el nivel de expresión de *AP3* y *PI* se ven reducidos, lo cual refleja el papel formal de estos genes de identidad de meristemo como reguladores positivos de *AP3* y *PI*. El establecimiento de la expresión inicial de *AP3* se debe muy probablemente a la expresión transitoria de factores de expresión como *LEAFY* y

UFO. Luego de que *AP3* y *PI* son activados, su expresión se mantiene por medio de un circuito de autorregulación dependiente de ellos mismos (Tilly *et al.*, 1998).

El Modelo ABC

Los estudios en mutantes particulares condujeron a la identificación de los genes del desarrollo floral. Una vez ubicados, se procedió a dilucidar sus patrones de expresión tanto en flores silvestres como en los mutantes conocidos. Una vez que se contó con suficiente evidencia para postular definiciones sobre su identidad, mecanismo de acción y el papel general que desempeñan en el establecimiento de la identidad de los órganos florales, fue posible integrar esta información en la forma de un modelo sobre las bases genéticas de la morfogénesis floral.

Este modelo fue ideado simultáneamente por dos grupos de investigación entre 1989 y 1991. Uno, formado por Elliot Meyerowitz y John Bowman, del Instituto Tecnológico de California (*CalTech*, en Pasadena), y el otro, por Enrico Coen y Rosemary Carpenter del Centro *John Innes*, (Norwich, Inglaterra). Se le conoce como *modelo ABC*, y destaca por la elegante simpleza con que explica procesos tan complicados como los involucrados en la organogénesis floral. Hasta el momento, ha resultado ser un modelo muy robusto en la descripción de estos procesos en plantas silvestres, mutantes y transgénicas *de Arabidopsis thaliana*, así como en –casi- todas las plantas con flor analizadas a la fecha (referencias en: Mendoza y Alvarez Buylla, 1998).

De acuerdo al modelo ABC, existen tres tipos de actividades, asociadas a genes específicos, que regulan la identidad de los órganos de la flor: A, B y C, y cada uno opera en dos verticilos adyacentes a la vez. La actividad A determina la diferenciación de los sépalos; la combinación de actividades A y B establece la identidad de los pétalos; la actividad conjunta de B y C determina la identidad de estambres, y la actividad C por si sola da lugar a la formación de carpelos. Además, se establece que las actividades tienen dominios espaciales precisos de acción, debido a la regulación de cada una por las otras dos o por si misma (Mendoza y Alvarez-Buylla, 1998). Así, las actividades A y C se inhiben mutuamente, garantizando que A se exprese sólo en los verticilos 1 y 2, y C sólo en los verticilos 3 y 4. Al estar ausente cualquiera de las dos actividades (A o C), la otra se extiende a los verticilos que ésta ocupaba, y abarca así a la flor entera. La actividad B se autorregula, a través de sus elementos constituyentes. Cuando falta la actividad A o C, la B permanece sin cambio (**figura**).

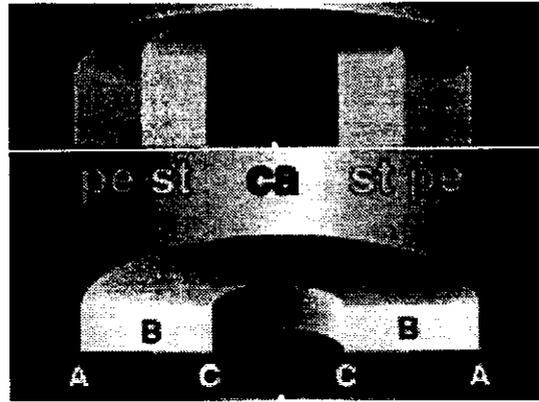


Figura 3. Representación del modelo ABC de la morfogénesis floral (Weigel, 1999).

Siempre según el modelo ABC, cada una de las actividades está asociada a un conjunto específico de genes (y sus proteínas), de entre los descritos con anterioridad. *APETALA 1* (*AP1*) y *APETALA2* (*AP2*) se consideran como responsables de la actividad A. Aunque la actividad de *AP2* es detectable en toda la flor –y más allá–, *AP1* se expresa únicamente en los verticilos uno y dos, según lo previsto en el modelo. Tanto la posibilidad de una actividad por la acción conjunta de estos genes, como la que indica que *AP2* podría sufrir modificaciones post-transcripcionales (la determinación de actividad se basa en la detección de RNA mensajero- por hibridización *in situ*) apoyan la asociación de ambos genes a la función A. (Bowman *et al.*, 1991; Mendoza y Alvarez-Buylla, 1998).

Existe evidencia suficiente, tanto de índole genética como molecular, para suponer que las proteínas AP3 y PI cumplen conjuntamente con la función B (especificación de la identidad de pétalos y estambres) en los verticilos dos y tres, respectivamente, a través de estadios distintos del desarrollo de la flor de *Arabidopsis thaliana*, y que además de necesarias, estas proteínas serían suficientes para tal propósito (Krizek y Meyerowitz, 1996).

Finalmente, el gen *AGAMOUS* se ha reportado como responsable de la especificación de estambres y carpelos. Los mutantes *ag* dan como resultado flores estériles, con el arreglo: sépalos-pétalos-pétalos-sépalos (de allí su nombre). Se ha demostrado que este gen es necesario y suficiente para lograr el fenotipo previsto por el modelo ABC, y hasta el momento es el único descrito que cumple con tales características (Bowman *et al.* 1991; Okamura *et al.*, 1993).

Recientemente se han propuesto modelos más amplios, que integran la información contenida en el modelo ABC, con la de otros genes participantes en la morfogénesis de la flor. El enfoque de estos modelos es el de representar las relaciones de activación y represión, a manera de redes regulatorias y circuitos de retroalimentación (*feedback loops*-ver: Mendoza y Alvarez-Buylla, 1998).

Diversidad: visiones y estudios

A pesar de que los datos derivados de estos sistemas modelo son de crucial importancia para la comprensión de los mecanismos de desarrollo, sería erróneo presuponer que lo observado en individuos de éstas especies puede extrapolarse automáticamente al resto de la diversidad vegetal del planeta.

Un vistazo alrededor, por muy somero que éste sea, permite advertir que *Arabidopsis thaliana* (y los sistemas modelo, para el caso) pueden ser un excelente punto de referencia, pero difícilmente pueden ser capaces de representar a la inmensa diversidad expresada en el mundo vivo -pasado y presente-. Así también, por más elegante y completo que pueda ser el modelo ABC, no es ocioso pensar que podría haber variaciones, e incluso excepciones al modelo, en alguna de las decenas de miles de especies de angiospermas conocidas (y por conocer). Algunas modificaciones han sido propuestas basadas en nuevos resultados a nivel molecular (Ma, 1994, *in*: Mendoza y Alvarez-Buylla, 1998). Se trata de la esencia misma de la ciencia, que exige comprobar o refutar constantemente las hipótesis propuestas. La falta de uniformidad-homogeneidad en la realidad, simbolizada en este caso por la diversidad del mundo vivo, no permiten circunscribirse a un puñado de especies para explicar satisfactoriamente el todo.

Conforme los inventarios y filtros de variantes genéticas (*screens*) basados en sistemas modelo se saturan, la necesidad de explorar otras formas de identificar genes regulatorios y demás novedades se hace patente. Una fuente poco aprovechada es el análisis de la variación que ocurre en poblaciones naturales, particularmente de especies poco estudiadas (Weigel *et al.*, 1999). No se trata solamente de conseguir alelos naturales que varíen entre sí en grados no encontrados mediante los métodos experimentales (mutagénesis química). La razón es –también– el aprovechamiento de la enorme ventaja que estos variantes naturales proveen, particularmente si se trata de especies e individuos sobre los que es muy difícil realizar experimentos genéticos (mutagénesis, transformaciones, cruzas), y en cuyos casos, la comprensión de sus singularidades ayudaría en la resolución de problemas, desde

puramente científicos hasta sociales. Tal es el caso de muchas especies y cultivos recalcitrantes, que imponen límites técnicos severos. Además de los éticos y legales, como en el caso de especies en peligro de extinción, carismáticas o en extremo susceptibles. En este último grupo se encuentran los humanos, sobre quienes es casi imposible realizar experimentos con holgura.

El estudio de los entretelones genéticos de la variación natural permitirían, por ejemplo, comprender las distintas reacciones de susceptibilidad y resistencia a enfermedades y demás factores ambientales adversos (e.g. estrés hídrico, térmico, mecánico, lumínico o nutricional).

Son esas, entre muchas otras razones, las que impelen a realizar investigación, basada en lo ya conocido a través de los sistemas modelo, que nos permita ampliar el conocimiento sobre los mecanismos del desarrollo, tanto en plantas como en animales. Tales estudios permiten, además, la unión entre disciplinas tan relevantes –y distantes hasta hace muy poco- en Biología, como la sistemática y la evolución, la genética, la biología molecular y el análisis del desarrollo a distintos niveles: desde el molecular hasta el organísmico, cruzando por el genómico.

Numerosos y muy diversos trabajos realizados en años recientes han confirmado parcialmente los postulados anteriores: no todos los sistemas se comportan estrictamente de acuerdo a lo establecido por el modelo ABC. Esto en ningún modo demerita su valor. Especialmente, porque lo fundamental se mantiene aún en los casos de mayor divergencia conocidos hasta hoy. Pero aún si se encontrara una excepción, un caso radicalmente distinto cuya explicación no cayera dentro de los modelos actuales, es muy probable que la mayoría de las especies seguirían comportándose de acuerdo a éstos.

Estudios particulares

En la mayoría de los casos en que el modelo ABC ha sido puesto a prueba (intencionalmente o no), se ha observado la conservación de los patrones de acción descritos para las actividades A, B y C y sus genes correspondientes. Se han identificado ortólogos de los genes homeóticos florales en un gran número de especies, y la caracterización de estos genes ha arrojado pruebas de la amplia conservación del modelo ABC. Estos análisis generalmente involucran la determinación de los patrones de expresión de los ortólogos encontrados, y la generación de mutantes de pérdida de función. Los análisis funcionales han demostrado ser instrumentos sumamente útiles para determinar el

papel de cada gen de interés a través de su expresión en distintos ambientes genéticos. También en el análisis del desarrollo en especies en las que es difícil realizar estudios genéticos (cruzas, etc). Estos análisis implican la introducción del gen de interés en el sistema de estudio. Normalmente se trata de genes de una especie introducidos en el genoma de otra especie lejana filogenéticamente, e incluyen experimentos de sobreexpresión y complementación genética. En los primeros, se utilizan vectores de sobreexpresión, con promotores constitutivos dirigiendo la transcripción del gen en cuestión. En los segundos, se emplean promotores provenientes de una de las dos especies, y que generalmente se aplican a individuos mutantes para el gen introducido. El objetivo es determinar si el gen funcional ausente (nativo) puede ser reemplazado por el transgen. Los resultados se comparan con los obtenidos en experimentos similares ya realizados en sistemas modelo, y con sus propios genes (Jack *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1994; Baum, 1998).

En algunos casos, la conservación observada es significativa pero no completa. Por ejemplo, se han observado casos en los que la identidad y el número de genes, así como su papel en la determinación de identidad de órganos se mantiene, pero el patrón de expresión de alguno(s) varía. Así lo reportaron Irish y Yamamoto (1995) para *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus*: Existen ortólogos de los genes homeóticos florales, similares en secuencia, número y función. Y Samach *et al.* (1997) describen diferencias en el patrón espacial de expresión de los genes B entre ambas especies. Otros trabajos, revelan funciones distintas entre *TERMINAL FLOWER* (*A. thaliana*) y su ortólogo en *A. majus*, *CENTRORADIALIS*. Aparentemente, el segundo carece de la función de regulación temprana de los genes de identidad de inflorescencia observada en *TFL1*, la cual evita la floración precoz (Bradley *et al.*, 1997).

Una situación diferente se presenta cuando el número de genes varía, y hay especialización, duplicidad o cambio de funciones entre los distintos ortólogos de los genes ABC. Un caso así es descrito por Mena *et al.* (1996) para el desarrollo de la flor del maíz (*Zea mays*). En ella, los autores encontraron dos genes ortólogos de *AGAMOUS* (*ZAG1* y *ZMM2*- parálogos entre sí). Aunque ambos cumplen roles correspondientes a los llevados a cabo por *AG*, las flores *zag1* no mostraban el fenotipo esperado para un homólogo de *AG*: aparentemente, uno de los dos se ha especializado para especificar (y reforzar) la determinación del meristemo floral (*ZAG1*), mientras que *ZMM2* está más involucrado en el desarrollo de estambres.

Existen proyectos más estructurados y comprensivos, que estudian la evolución de ciertos rasgos y de sus bases genético-moleculares, mediante el estudio de análisis de expresión y sobreexpresión. Un ejemplo es el trabajo que han llevado a cabo Elena Kramer y Vivian Irish de la universidad de Yale, sobre la evolución de los pétalos. El análisis de la expresión de ortólogos de los genes de función B en representantes de varias familias de Eudicotiledóneas (angiospermas basales) reveló patrones distintos a los descritos para las especies modelo (Kramer e Irish, 1998).

Kramer y Irish (1998) argumentan que, aunque el modelo ABC -tal y como fue propuesto- se conserva en la mayoría de las especies estudiadas a la fecha (e.g. *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida*, *Solanum tuberosum*, además de *A. thaliana* y *A. majus*), todas estas especies pertenecen a las eudicotiledóneas superiores. Se trata de un grupo monofilético que, si bien incluye a la gran mayoría de las especies de angiospermas, no puede considerarse que represente la diversidad de las plantas con flor. Por esta razón, y con el fin de evaluar la conservación del modelo ABC en otros grupos de angiospermas, Kramer e Irish analizaron los mecanismos genéticos subyacentes al desarrollo floral de cinco especies de Ranunculidae (subclase comprendida dentro de las eudicotiledóneas inferiores). En particular, se centraron en los genes de función B, y sus presuntos ortólogos (clonados por ellas) en estas especies. Un análisis filogenético tomando como base a estos genes les permitió proponer la existencia de dos linajes de genes de función B, resultado de una duplicación que dio origen a los ancestros de AP3 y PI, confirmando que estos genes serían parálogos entre sí.

En cuanto al modelo ABC, Irish y Kramer observaron los patrones de expresión de los presuntos genes de función B en las especies analizadas, y comparándolos con los obtenidos en estudios previos para *A. thaliana*, *A. majus* y otras eudicotiledóneas superiores. Los resultados de sus análisis revelan patrones conservados en estambres, pero muy variables en pétalos. Lo anterior, entre las especies de eudicotiledóneas inferiores y superiores, pero también a través de las eudicotiledóneas inferiores analizadas. Como explicación a esta diferencia en patrones de expresión de genes B en pétalos, se remiten a las teorías existentes que proponen un origen múltiple para estos órganos florales. En este escenario, los genes de función B (según el modelo ABC), habrían sido reclutados en distintos momentos, y de distinta forma, para contribuir al desarrollo de los pétalos. Algunas veces, incluso en conjunción con otros genes aun por caracterizarse. Al margen de la veracidad científica de estas explicaciones, mismas que pueden o no ser confirmadas por estudios posteriores, lo que se hace patente a partir de estos resultados, es que existen variaciones en lo postulado originalmente alrededor del modelo ABC.

Perfidia autem haeresis in papa haeretico in Deum committitur et in praeiudicium fidei, quae communis est omnium. Et ideo perfidiam haeresis in papa haeretico nunquam ecclesia universalis tolerabit: quia tolerando scienter pravitatem haeticam in papa efficeretur ecclesia schismatica. Quia ecclesia quae schismatico scienter adhaeret, schismatica est. Ecclesia autem schismatica non est ecclesia catholica et universalis. Ergo ecclesia universalis et catholica nunquam scienter perfidiam papae haeretici tolerabit. Quia eo ipso, quod est haeticus, est etiam schismaticus.

**William of Ockham, *Dialogos*
pars 1, lib. 7, cap. 39-44
Auctores Britannici Medii Aevi**

**Mere white truth in simple nakedness.
TENNYSON**

Lacandonia schismatica

Hasta hace pocos años, la estructura básica de la flor era prácticamente un dogma. Con base en las decenas de miles de especies de plantas con flor descritas antes de 1987, se podía afirmar con un alto grado de certeza que todas las angiospermas presentarían un arreglo floral muy similar al ya descrito para *Arabidopsis thaliana* y las flores perfectas (ext.-int.: sépalos, pétalos(o tépalos), androceo y gineceo) (fig).

Fue en enero de 1987, en el contexto del inventario de la flora mesoamericana que el Jardín Botánico de Missouri -entre otras entidades- auspiciaba en colaboración con universidades y gobiernos de México y Centroamérica, que los biólogos mexicanos Esteban Martínez y Clara Hilda Ramos colectaron en las orillas de la selva Lacandona una planta diminuta que sacudiría las concepciones que se habían construido desde que se comenzó a sistematizar el conocimiento de las plantas con flor.

Se trataba de *Lacandonia schismatica*, nombre que le fue impuesto al describirse por primera vez en 1989, en honor a su lugar de origen, y al rompimiento (cisma) que su conformación floral impone dentro del mundo vegetal (y el científico). *Lacandonia schismatica* es una monocotiledónea herbácea que crece en estratos húmedos de la selva alta perennifolia. Áfila y aclorofílica, su fuente principal de carbono es la asociación con un hongo endófito que se desarrolla al interior de sus raíces. Es, pues, una planta *micoheterotrófica* que 'prefiere' crecer entre la hojarasca y la materia en descomposición del sotobosque lacandón.

A la flor de *Lacandonia schismatica* se le han practicado estudios anatómicos, embriológicos y citológicos. Algunos de estos revelan particularidades en el núcleo celular, así como componentes específicos que resultan únicos. Estos descubrimientos, junto con los rasgos antes descritos ya muestran a esta especie como una peculiaridad botánica.

Pero sin duda el rasgo más fascinante -amén de distintivo- en *Lacandonia schismatica*, es el arreglo *sui generis* de sus flores. En ellas se observan, *ext-int* : cinco o seis tépalos, seguidos por un número variable (entre 60 y 80) de carpelos, que a su vez circundan a tres estambres. Tal disposición de los verticilos esporógenos es observable desde el origen, y a partir de estadios primordiales de desarrollo.

Diversos análisis, tanto morfológicos como moleculares, ubican a *Lacandonia schismatica* en el orden Triuridales (Martínez y Ramos, 1989; Vergara *et al.*, en prensa), y pese a su similitud con miembros de las Triuridaceae (*Triuris*, *Sciaphila*, *Triuridopsis*, entre otras), se ha propuesto una nueva familia (Lacandoniaceae: Martínez y Ramos, 1989) de la cual *Lacandonia schismatica* es la única y muy solitaria integrante.

El descubrimiento de esta especie con flores tan distintas de lo conocido, y precisamente en rasgos tan explorados recientemente, llamaban a su estudio bajo la óptica de la genética molecular del desarrollo. Esta tarea ha sido acometida en México, dentro del Laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM.

Desde 1996, Francisco Vergara, Elena Alvarez-Buylla y Elliot Meyerowitz investigan las bases moleculares del arreglo floral de *Lacandonia schismatica*, a través de varias vertientes, que incluyen: análisis de la expresión de los genes homólogos a los ABC, estudios de la función y mecanismo de expresión de estos genes y sus promotores, y análisis filogenéticos utilizando a *Lacandonia schismatica* como taxón principal.. Entre las ideas principales, se encuentra la que explica la inversión de los verticilos esporógenos en función de un cambio en la expresión de los genes ABC, particularmente los de tipo 'B'.

A través de estudios de índole molecular e informática, se han obtenido genes de *Lacandonia schismatica*, que guardan una alta similitud en secuencia de nucleótidos con *APETALA3/DEFICIENS*, y *PISTILLATA/GLOBOSA* (de *A. thaliana* / *A. majus*). Durante tales sondeos exhaustivos, no se encontró algún otro gen que tuvieran una similitud parecida. Lo anterior, aunado a la certeza (experimental, no filosófica) de que, al menos en sistemas modelo, los genes *AP3* y *PI* son necesarios y suficientes para la especificación de pétalos y estambres (función B – Krizek y Meyerowitz, 1996), permiten apoyar la idea de que pueden ser estos dos genes los que especifiquen la identidad de los estambres (y tal vez parcialmente de los tépalos) en *Lacandonia schismatica*, y por tanto, los primeros en merecer atención en un estudio de esta naturaleza.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presente tesis se inscribe dentro del proyecto general antes descrito, el cual busca dilucidar las bases genético-moleculares del arreglo floral *sui generis* de *Lacandonia schismatica*. Particularmente, a la luz del modelo ABC de la morfogénesis floral (Coen y Meyerowitz, 1991).

Para su elaboración, se contó con las secuencias de los genes de *L. schismatica* que parecen ser los ortólogos de *APETALA3* y *PISTILLATA*. Estos son a su vez responsables de la especificación de la identidad de pétalos y estambres (función **B**) en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Análisis de las secuencias de estos genes, que revelan similitudes significativas de los genes de *L. schismatica* con *AP3* y *PI* fortalecen las hipótesis de homología.

A partir de esta premisa, se consideró que los niveles de similitud entre los genes de distintas especies serían suficientes para que existiese conservación en la función que desempeñan dentro del desarrollo floral. Tal hipótesis, así como la robustez y amplitud del modelo ABC fueron puestos a prueba en este trabajo, a través del análisis funcional de estos presuntos ortólogos de *AP3* y *PI* en *L. schismatica*, en plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

El objetivo particular de este trabajo ha sido generar las herramientas experimentales para llevar a cabo dichos análisis funcionales, y la aplicación de estas herramientas en experimentos preliminares, que conduzcan a la generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* para la sobreexpresión de estos genes.

El análisis de las líneas transgénicas obtenidas a partir de estos experimentos, permitirá evaluar si la similitud observada entre las secuencias de los genes de *Lacandonia schismatica* y aquéllos de *Arabidopsis thaliana* es suficiente para generar un fenotipo comparable a los que se obtienen en experimentos similares, donde se utilizan los genes endógenos/nativos de *Arabidopsis* (i.e. conservación de función).

Las divergencias a partir de resultados previos, deberán ser evaluadas desde enfoques tanto empíricos como teóricos. Se discutirán también las implicaciones de cada posible vertiente, a la luz de trabajos previos, en el contexto del modelo ABC, y de consideraciones moleculares y evolutivas ya esbozadas en la introducción.

MATERIALES Y METODOS

ANTECEDENTES TÉCNICOS

La introducción de DNA exógeno en sistemas vegetales: el uso de *Agrobacterium tumefaciens*

▪ Características generales. Mecanismo de infección

De entre los métodos para la introducción de DNA exógeno dentro de células vegetales, uno de los más utilizados es aquel que aprovecha las propiedades infecciosas de dos especies de *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*). Ambas bacterias, (GRAM- ζ) pertenecientes a las Rhizobiaceae (familia que incluye, entre otras, a *Rhizobium* spp), son habitantes del suelo, y causantes de alteraciones en el crecimiento celular de las plantas (las enfermedades CROWN GALL y HAIRY ROOT, respectivamente).

Su capacidad de provocar estas enfermedades depende de la presencia de plásmidos inductores de crecimiento anómalo, como el *Ti* (inductor de tumores, presente en *A. tumefaciens*) y el *Ri* (inductor de raíces, presente en *A. rhizogenes*). Estos plásmidos, que consisten de varias regiones, y alcanzan tamaños superiores a las 100 kilobases (Kb- 1000 bases/pares de bases), se introducen al núcleo de las células vegetales y facilitan la inserción de DNA de la bacteria en el genoma de la planta. Además de esta región transferida (*T-DNA*), el plásmido *Ti*, contiene un conjunto de genes que, mediante las enzimas para las que codifican, permiten la transferencia del T-DNA. Estos genes forman la región *vir* (ocasionalmente se encuentran en el cromosoma bacteriano, donde reciben el nombre de *chv*), y son inducidos a partir de la detección de compuestos (como la acetosiringona y ciertos precursores de la lignina, como el alcohol coniferílico) que secreta la planta cuando se le provoca una herida.

(Figura) Diagrama simplificado del plásmido *Ti*
nopalinas P. 161, Howe, 1995).

El T-DNA está flanqueado por dos regiones casi idénticas de 25 pb llamados *bordes repetitivos* (*border repeats*, o bordes izquierdo y derecho) que permiten el reconocimiento de la región a transferirse por parte de los genes *vir*. La región del T-DNA comprende un grupo de genes responsables de la inducción de tumoraciones (oncogénesis) en la planta. Es por eso que se les conoce como genes *onc*, y entre ellos se incluyen los que codifican para ciertas hormonas vegetales (una auxina y una citokinina) que normalmente regulan el crecimiento de la planta, y que pueden inducir la proliferación celular fuera del contexto normal de desarrollo. Otros genes *onc* son los codificantes para enzimas (como la nopalina

sintetasa -NOS) que catalizan la síntesis de conjugados o asociaciones atípicas de aminoácidos, llamadas genéricamente *opinas*, y que son utilizadas por la misma bacteria como fuente nutritiva.

PARA QUÉ necesita Agro la proliferación celular excesiva y sin control?. Cómo se da la infección (por dónde-estomas, heridas)?

▪ Aplicaciones

En biología molecular, se ha cooptado el mecanismo completo de infección de *Agrobacterium* como una técnica para introducir DNA exógeno dentro de las plantas. Esto se ha logrado mediante la sustitución de los genes *onc* por aquéllos que se quiera expresar en la planta, mientras que el resto de la maquinaria de infección e inserción se mantiene intacta. La organización genética y transcripcional de la región *vir* ha sido caracterizada con cierta profundidad por Stachel y Nester (1986) realzando la importancia de *Agrobacterium* como vector para experimentos controlados de transformación genética de células vegetales, muy particularmente en análisis de sobreexpresión y complementación genética. Lo ideal sería utilizar el plásmido Ti directamente, pero su talla desmesurada dificulta considerablemente la manipulación. Por esta razón, se han diseñado técnicas alternas, o se ha recurrido a plásmidos sintéticos de un tamaño adecuado, que contengan las regiones mínimas y necesarias para la inserción del DNA extraño en el genoma de la planta.

La primera es la ***cointegración***, que consiste en la introducción de dos plásmidos (el Ti sin la región *onc*, reemplazada por otra contenida también en el segundo vector, mismo que se usó para clonar el DNA de interés y que además posee un gen de resistencia a algún antibiótico) dentro de células de *Agrobacterium*. Una vez dentro, en algunas células ocurrirá la recombinación homóloga entre ambos vectores dando como resultado un plásmido Ti que contenga: la región *vir*, el DNA exógeno -bordeado por los sitios de transferencia normales- y el gen de resistencia al antibiótico. Estas serán las que sobrevivan en un medio de cultivo adicionado con antibiótico, y por tanto, las que sirvan para una posterior transformación de células vegetales.

La segunda técnica utiliza ***vectores binarios***, que aunque poseen un tamaño mucho menor a los Ti, contienen las regiones de origen necesarias para su replicación en células bacterianas, tanto *Escherichia coli* (en las que usualmente se procesa y clona el DNA de interés) como *Agrobacterium* spp y un gen bacteriógeno de resistencia a antibiótico. El plásmido contiene también los bordes repetitivos izquierdo y derecho, que flanquean a: un

sitio múltiple de clonación (SMC/MCS en inglés), usualmente en medio de un minigen *lac* (región *lacZ'*) que contribuye en la inserción del DNA de estudio (COMO?) y en la detección de las colonias en las que hubo inserción (ver **anexo-clonación pGEM-T**); y un gen de resistencia a antibiótico para su expresión específica en plantas. Por lo general, se trata de un gen para la enzima neomicina fototransferasa, misma que puede inactivar antibióticos aminoglucosídicos, del tipo de la neomicina, la kanamicina y el G418. (Howe, 1995Ñ McBride et al. 1990). (**DIAGRAMA-pBIN19 básico**).

Dado que la región *vir*, de transferencia del T-DNA (o cualquiera región de DNA flanqueada por los bordes repetitivos) a la planta puede o no estar la misma molécula en que se encuentra dicho DNA (codificado en *cis* -recuérdese que a veces *vir* se encuentra en el cromosoma bacteriano), es posible prescindir de esta región en los plásmidos binarios, confiando en que una vez dentro de *Agrobacterium* se activarán y transcribirán las regiones *vir* presentes en el Ti 'nativo' o en el cromosoma de la bacteria. Esto ayuda a reducir aún más el tamaño del vector, hasta alcanzar las 10 Kb en su expresión mínima, lo cual facilita la sofisticación en el diseño de las construcciones, al permitir la inclusión de genes de gran tamaño, grupos de genes o promotores de distinta índole.

Por lo común los genes que se emplean, tanto los de estudio como los marcadores son ligados a promotores derivados de patógenos que atacan específicamente a plantas, como los del T-DNA del mismo *Agrobacterium tumefaciens*, o los de ciertos virus. De esta manera se garantiza su expresión y funcionamiento adecuado en casi todas las especies vegetales (comenzando por las especies modelo), aunque ha crecido la idea de que los niveles de expresión de genes dirigidos por estos promotores podrían ser modulados, al menos parcialmente, por factores del desarrollo que actúan en las plantas intactas (Walden, 1993).

Promotores constitutivos: el CaMV35S

Gran parte de la literatura acerca de promotores en plantas se origina a partir de la caracterización de genes que codifican para productos de interés particular. Ejemplos de ello son el promotor del gen de la *patatina* que codifica para una proteína de almacenamiento en papas y el promotor del gen viral responsable de inducir lesiones en tomate.

Los promotores constitutivos son aquellos que inducen la expresión de un gen de manera continua, y a una tasa constante, independientemente de los estímulos externos o el contexto celular y molecular en el que se encuentre (Lodish et al, 1995).

Conforme se ha ido comprendiendo mejor la biología molecular de fitopatógenos virales y sub-virales, se han identificado un gran número de elementos de secuencias cortas, que después son utilizados como moléculas funcionales en aplicaciones biotecnológicas. El ejemplo más conocido es el promotor constitutivo derivado del virus del mosaico de la coliflor -*Brassica oleraceae*- (*CaMV*) para la síntesis de RNA en plantas. Este promotor se distingue por ser altamente activo y ha sido utilizado en numerosas plantas modificadas genéticamente. Los primeros estudios muestran que en plantas infectadas con este virus, el promotor dirige la expresión constitutiva del gen viral que codifica RNA 35S sin requerir de productos virales adicionales (Guilley *et al.*, 1982).

Cuando la secuencia *upstream* de la región que codifica para las proteínas del gen 35S (de 343 pb) es fusionada a un marcador genético (*e.g.* GUS) e insertada en un cromosoma **vegetal**, el gen se expresa muy marcadamente en todas las células. La actividad del marcador puede ser monitoreada a través de tinciones histoquímicas en las que se incuban partes de la planta junto con el sustrato (X-glu en el caso de GUS)

Los vectores de expresión basados en patógenos virales de plantas pueden dirigir la expresión de proteínas exógenas a niveles sumamente altos. Esto permite la selección de genes en base a función, de una forma mucho más expedita que la alcanzada mediante el uso de técnicas convencionales de transformación (Samac, 2000).

Transformación de células de *Agrobacterium spp.*

Una vez que se tiene lista la construcción de DNA, sea ésta en un vector de cointegración o uno binario, ésta debe introducirse a células de *Agrobacterium*. Las técnicas principales para lograrlo son la **electroporación** y la **cruza triparental**. La primera se hace combinando el plásmido 'desnudo' (i.e. sin bacteria, extraído de ésta) con una alícuota de células **competentes** (ver ANEXO-crédito a RTL) de *Agrobacterium*, y aplicando a la solución/mezcla un pulso eléctrico que cambie la polaridad de la membrana celular, haciéndola permeable a partículas externas (el vector en este caso). La cruce triparental involucra a la cepa de *Agrobacterium* a ser transformada, y a dos de *E. coli* : la que contiene el vector y una tercera, llamada facilitadora (*helper strain*) que contiene un plásmido capaz de trasladar el vector dentro de las células de *Agrobacterium*.

Transformación de Células Vegetales

Cuando las células de *Agrobacterium* ya tienen el vector dentro, el siguiente paso es lograr la infección de las plantas por la bacteria. Esto puede ocurrir sobre plantas ya desarrolladas, fragmentos de éstas, semillas, o sobre cultivos de tejido no diferenciado (*callus* o callo). Los primeros dos casos son los más empleados. Uno de ellos consiste en el cultivo de discos de tejido cortados -principalmente de las hojas- de plantas maduras en un medio con presencia de células de *Agrobacterium* (mismas que se introducirán por los bordes) por un tiempo, luego del cual se les transfiere a un medio con antibiótico, en donde serán seleccionados aquéllos discos cuyas células recibieron e integraron el T-DNA del vector. Al cabo de un tiempo se forman

Dadas las dificultades que implica el cultivo de tejidos, la técnica que consiste en la transformación de plantas maduras va ganando adeptos aceleradamente. Una de ellas, la **infiltración**, consiste en la exposición del tejido vegetal a soluciones de células de *Agrobacterium*, sea por aspersión o por submersión, en ambientes de vacío o a presión ambiente. Dichas soluciones deben poseer una alta densidad de células en buenas condiciones, además de ciertos componentes que, al tiempo que favorecen la entrada de la bacteria a la planta (e.g. surfactantes o detergentes que disminuyan la tensión superficial), no inflijan demasiado estrés a ninguno de los organismos en cuestión (incluido el experimentador). Para más información sobre esta técnica, elegida para el presente trabajo, ver **Materiales y Métodos**.

Otras técnicas para la transformación de células vegetales con DNA exógeno son las que no utilizan células bacterianas (*Agrobacterium*, pues) para la introducción de este DNA. Los plásmidos 'desnudos' pueden entrar a las células vegetales (en semillas, o *callus*) si se logra aumentar la permeabilidad de éstas, por electroporación, tratamiento con polietilenglicol. Una técnica muy efectiva es la de biobalística (también llamada biolística), en la que el DNA de interés se asocia a la superficie de micropartículas de algún metal (usualmente oro o tungsteno), las cuales son bombardeadas a altas velocidades hacia el tejido a transformarse (**Fig. 9.13 p. 165 Howe**).

A falta de algún mecanismo de infección-inserción como el proporcionado por la maquinaria genético-molecular de *Agrobacterium*, todas estas técnicas dependen de la integración, y en algunos casos de la recombinación homóloga entre regiones similares del DNA introducido y el genoma de las células vegetales. (Howe, 1995). Una tercera vía, que combina ventajas de cada técnica, es el bombardeo con micropartículas de plantas maduras, lo cual induce en ella pequeñas heridas, para luego someterla al tratamiento con

Agrobacterium, la cual penetra con mayor facilidad, aumentando considerablemente la eficiencia de transformación.

La necesidad y conveniencia de plantas con tiempos cortos de generación, alta producción de semillas e individuos compactos y de fenotipo distinguible (para el rasgo en cuestión) y fácil de analizar, limitan considerablemente el número de especies que pueden transformarse. Otras limitaciones técnicas reducen aún más este universo.

Algunos de los requerimientos básicos (prácticos y relevantes a este estudio) para un sistema eficiente de transformación son los siguientes (Birch, 1997 + *adiciones*):

1. Amplia disponibilidad de tejido a transformarse (semillas, germoplasma, callo, etc.).
2. *Sistema vegetal bien caracterizado (fenotipos, genotipos asociados, estrategias de cultivo, reacciones a la transformación).*
3. Alta eficiencia (relativa), economía y reproducibilidad, a fin de generar el mayor número de líneas transformantes para análisis posteriores.
4. Métodos inequívocos de selección de transformantes. Altas posibilidades de distinguir y recuperar *semillas* transgénicas a partir de *plantas* transformadas.
5. Expresión estable de los genes introducidos, en el modo y patrón esperados según el sistema de control o regulación utilizado (*promotor CaMV 35S, en este caso*), más que aq uellos asociados al estado de las células al momento de la transformación, el sitio probable de integración y otros factores ajenos al objetivo del estudio (*ver discusión*).
6. Sistemas simples de integración y un bajo número de copias del gen o genes introducidos, para minimizar las probabilidades de tener interrupciones no deseadas del gen en sitios de inserción, o silenciamiento /represión de los transgenes, asociados al tamaño o el número de copias introducidas.
7. Seguridad. Evitar la aplicación de procedimientos, materiales o sustancias que requieran precauciones demasiado complicadas, o impliquen un riesgo a la integridad del experimentador, *y del ecosistema. (Ver anexo sobre Bioseguridad)*.

Afortunadamente, una planta como *Arabidopsis thaliana*, que cumple con todas las características ya enumeradas (incluyendo aquella sobre el fenotipo), ha sido también perfeccionada como sistema de transformación por distintos métodos, y resulta ideal para los objetivos del presente estudio. El resto de las providencias, inherentes a otros elementos de la transformación, y a la naturaleza misma del presente estudio, fueron también tomadas en consideración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Lo usual en experimentos de transformación de este tipo es la introducción del DNA exógeno (transformación) directamente sobre las plantas mutantes. Sin embargo, dado que las mutaciones de pérdida de función para los genes 'B' afectan el desarrollo de los órganos sexuales masculinos (estambres), las plantas mutantes para AP3 y PI son estériles. La ventaja de esta característica es que no hay necesidad de emasculación (arrancar los estambres) las flores para asegurar que no haya autopolinización. En estos casos, las transformaciones se llevan a cabo sobre plantas heterocigas (**ap3-3/+**, y **pi-1/+**), que se generaron de la siguiente manera:

Se sembraron tres charolas de macetas con semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo/variedad *Landsberg erecta* (*Ler*). Paralelamente, se sembraron charolas con semillas de mutantes de *Arabidopsis* de APETALA3 y PISTILLATA (sobre una base *Ler*): Una con semillas de ap3-3, y una con mutantes de pi-1. Las características de estos mutantes se esquematizan en la **tabla M1**.

Al florecer las plantas sembradas, al cabo de dos semanas aproximadamente, se efectuaron cruces entre las plantas mutantes y las silvestres. Los estambres de las flores silvestres (wt) se frotaron contra los estigmas de las plantas mutantes, revisando a través de un microscopio estereoscópico la adhesión del polen a éstos, así como la integridad de las flores.

Tabla M1. Obtención de plantas heterocigas fértiles

		Genotipo plantas	
		masculinas	
Genotipo plantas femeninas	Cruza	(F1)	<i>Ler</i> (+/+)
			ap3-3/+ (100%)
			pi-1/+ (100%)



Las conversiones homeóticas en las flores, mutantes para *PISTILLATA*, muestran sépalos en lugar de pétalos en el segundo verticilo, y carpelos en lugar de estambres. Estas transformaciones también son apreciadas en los mutantes florales para *APETALA3*. Entre los mutantes de *PISTILLATA*, se han caracterizado al menos tres alelos de *pi*. Estas variantes, *pi-1*, *pi-2* y *pi-3* pueden arreglarse en series alélicas (bowman et al, 1991). Las flores de *pi-1* muestran las alteraciones más notables con respecto al fenotipo silvestre. Se le considera una mutación fuerte, al mostrar una transformación total de pétalos a sépalos en el segundo verticilo. (Bowman,1994)

Las cruces se efectuaron manualmente, de la forma explicada arriba, durante varios días, y para todas las flores posibles. Al cabo de tres a cuatro semanas, se colectaron las semillas maduras y secas a partir de las silículas dehiscentes. Las semillas se mantuvieron a temperatura ambiente dentro de tubos *ependorf* de 1.5 mL microperforados (en la tapa, para circulación de aire), dentro de cajas cerradas herméticamente que contenían –además– piedrecillas desecantes. Esta medida asegura la conservación de las semillas durante largos períodos de tiempo en buenas condiciones, y a salvo de humedad, hongos y otros parásitos. Una vez listas las construcciones con los genes de *Lacandonia schismatica*, y al tiempo que éstas se clonaban, y se transformaba con ellas a las células competentes de *Agrobacterium*, se procedió a sembrar las semillas de la siguiente forma:

- 2 charolas con semillas silvestres (*Ler*)
- 2 charolas con semillas *ap3-3/+* (F1 de la cruce entre plantas *ap3-3* y *Ler*).
- 2 charolas con semillas *pi-1* (F1 de las cruces entre plantas *pi-1* y *Ler*).

Las semillas pudieron haberse sembrado mucho antes, para así tener listas las plantas en sincronía con las construcciones. Sin embargo, dadas las dificultades en la elaboración de las éstas últimas, se prefirió esperar hasta tenerlas listas y confirmadas. Esto evitó gastar semillas de difícil obtención innecesariamente.

Las plantas generadas corresponden a la T_0 (generación transformante)

Diseño de las construcciones

Preparación de los genes de Lacandonia schismatica

Conocida la secuencia completa de la región codificante de los ortólogos de genes B de *Lacandonia schismatica* por estudios previos (Vergara, 2000), se diseñaron oligonucleótidos específicos para sus segmentos 5' y 3' (antes de la caja MADS y después de la cola poli-T). A partir de una población de RNA total (extraída con *TRizol*, ver **anexo**) de *Lacandonia schismatica*, se procedió a convertir el RNA mensajero (mRNA) en cDNA. Esto se logra utilizando un oligonucleótido genérico (*oligo-dT*) que se asocia a la región poliadenilada (*cola poli-A*) de los mensajeros.

El *primer* es extendido utilizando la enzima Reverso-Transcriptasa (*RT*), obteniéndose una hebra complementaria de cDNA a partir del mRNA. El RNA es luego degradado con RNasa H, y el cDNA se utiliza como templado en una reacción de PCR que amplifica su secuencia completa. Lo anterior se hizo con la finalidad de contar con amplificadores enteros de cada gen, (necesarios para el análisis de su expresión) dado que hasta entonces se contaba sólo con fragmentos de los extremos 3' y 5' por separado.

Lo antes descrito es básicamente un protocolo de *Amplificación Rápida de Extremos 3' de cDNA (RACE 3' – GIBCO, Life technologies- anexo)* modificado. La variación respecto al procedimiento tradicional estriba en el sitio de hibridación del oligonucleótido específico al gen en su extremo 5' (3' del cDNA templado). Normalmente, en los protocolos RACE (3' y 5'), la secuencia de uno de los extremos del mRNA a amplificarse es desconocida, así que los oligonucleótidos que se utilizan se asocian a regiones intermedias del cDNA. El producto final es un segmento trunco del cDNA . El resto de la secuencia se obtiene mediante el procedimiento alterno (RACE 3' o 5', según el caso). Como para este experimento la secuencia completa ya era conocida, el oligonucleótido *forward* se diseñó antes del codón de inicio (ATG) putativo del cDNA a amplificarse.

Una vez amplificados, los cDNAs completos se clonaron en vectores pGEM[®]-T, mismos que fueron introducidos en células competentes de *E.coli (top ten)* mediante la técnica de *Heat Shock* a 42°C (PROMEGA Cloning kit. ?, ver anexo, protocolo y mapa de vector). Las células fueron crecidas en medios líquidos con el antibiótico respectivo (Luria-Bertani con carbenicilina 100 µg/mL) a 37°C en agitación durante 16-20 horas, luego de las cuales se extrajeron y purificaron los plásmidos (QIAGEN spin mini-preps- anexo).

Introducción de Sitios de Restricción

Usando estos plásmidos como templados, se amplificaron copias de cada gen por PCR, introduciendo en sus extremos sitios de restricción específicos para su ligación en vectores binarios. Para su introducción en pCAP310 (ver esquema -crédito RS), se diseñaron oligonucleótidos que insertaran sitios para BamHI y XbaI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Para su ligación en pBINJit19 (ver esquema- crédito TJ) se diseñó un sitio para digestión con BamHI en ambos extremos.

El fragmento *Bam*HI-*Xba*I que contenía la región codificante (cDNA completo) del AP3-h de *Lacandonia schismatica* se amplificó utilizando los siguientes oligonucleótidos (*primers*):

LacDEFAPfor1 5'- CATCGGATCCATCTCTAACTTCCTCCACCG – 3'

LacDEFAPrev1 5'- GCAATCTAGATCACACACAGCAACAGTAGG – 3'

Para amplificar el fragmento *Bam*HI-*Bam*HI se empleó el conjunto de oligonucleótidos formado por:

LacDEFAPfor1 5'- CATCGGATCCATCTCTAACTTCCTCCACCG – 3'

LacDEFAPrev3 5'- GAAATCTCAAAGGATCCGAAAGCTAGGC – 3'

En el caso del homólogo de PISTILLATA, el fragmento *Bam*HI-*Xba*I se generó utilizando el siguiente conjunto de oligonucleótidos:

LacPIGLfor1 5'- TGAAGGATCCTTTCAACCTCCACATTGC – 3'

LacPIGLrev1 5'- ACTTGTCTAGACTGGTCAGAGTGG – 3'

El fragmento *Bam*HI-*Bam*HI:

LacPIGLfor1 5'- TGAAGGATCCTTTCAACCTCCACATTGC – 3'

LacPIGLrev3 5'- CGCGGATCCAACATAGATTCACTTGTC – 3'

Los sitios de anclaje de los oligonucleótidos a la secuencia de cada gen se muestran en los cuadros 2 y 3. (SECUENCIA-cred. FVS)

Introducción en vectores binarios

Los fragmentos descritos anteriormente, que incluían las regiones codificantes de AP3-h y PI-h (*Lacandonia schismatica*) flanqueados por sitios de restricción apropiados, se introdujeron en los plásmidos binarios respectivos. El fragmento *Bam*HI-*Xba*I que incluía a los genes AP3-h y PI-h (cDNAs) se usó para reemplazar la región codificante inserta dentro del plásmido *pCAP310* (minigen de AP3 de *A.thaliana*) Esto se realizó a través de los siguientes pasos:

1. La doble digestión de extractos puros (*midi-preps*, QIAGEN) del plásmido *pCAP310* con las enzimas de restricción BamHI y XbaI (Gibco), y su posterior purificación (Qiaquick column purif., QIAGEN- **anexo**) a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1% .
2. Ligación de los fragmentos (cDNAs) digeridos con BamHI y XbaI en el plásmido *pCAP310* abierto. Para este paso se utilizó una enzima *T4 ligasa* (INVITROGEN), en una reacción de 20 hs de duración, a 10°C. A esta **nueva construcción** se le ha denominado .Mapa en resultados.
3. Clonación de las contrucciones. Introducción en células competentes de E.coli (top ten) por heat-shock a 42°C; crecimiento de células y extracción del plásmido. (**anexo**)

En el caso del plásmido *pBINJIT19* (ver **mapa**) el procedimiento fue muy similar, con las siguientes particularidades:

- Al no contener inserto alguno, se facilitó el paso de digestión-purificación. La digestión se hizo con BamHI (GIBCO) solamente.
- Con el fin de evitar la recircularización aleatoria del plásmido (por estar cortado en un solo sitio) se realizó un paso intermedio (entre digestión y ligación) de remoción del grupo fosfato (defosforilación) de una de las hebras del DNA de cada extremo digerido. La reacción fue la siguiente:

2.5 µL	Buffer 10X
1.5 µL	ddH ₂ O
20 µL	DNA (vector)
1 µL	Fosfatasa alcalina (de camarón)
25 µL	TOTAL

30' a 37°C, con un paso final
de inactivación, de 15' a 65°C

En ambos casos se realizaron varias reacciones de ligación, variando en cada una las proporciones vector:inserto.

A manera de confirmación del éxito de las ligaciones, se efectuaron amplificaciones (PCR) utilizando alícuotas de cada reacción de ligación como templado. Los primers empleados fueron, el 5' 35S como *forward*, y el respectivo a la secuencia del gen (LacPIGLrev 3, LacDEFAPrev3 según el caso) como *reverse*. De este modo, se aseguraba que la ligación hubiese tenido lugar, además de determinar si entre la población de ligaciones existiese alguna en la orientación esperada. Esto ahorró significó un ahorro sustancial en tiempo y reactivos, al poder discriminar en qué casos era procedente clonar las ligaciones.

Una vez transformadas las células con alícuotas de la reacción de ligación correspondiente, se esperaba al crecimiento de las colonias, se hacían cultivos líquidos a partir de los cuales se extraía el plásmido. Estos se usaron como templados en nuevas reacciones de PCR, muy similares a la descrita en el párrafo anterior, con el fin de discernir la(s) clona(s) específica(s) que incluyeran el inserto en la orientación correcta. Los plásmidos de estas clonas, ya purificados, eran seleccionadas para su posterior inserción en células competentes de *Agrobacterium*.

Para cada construcción confirmada, se prepararon reservas (*stocks*) de las células transformadas y cultivadas, en glicerol al 15% (1mL de glicerol estéril al 30% + 1mL de cultivo bacteriano), mismas que se conservan a -80°C en el LGMyE. Lo mismo se hizo posteriormente con cultivos de *Agrobacterium* sp.

CUADRO 1. CULTIVO DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA PARA INFILTRACIÓN:

- 1.** Se preparan macetas de 6.5 x 6.5 cm, con Metromix (marca y fórmula) previamente humedecido, formando montículos protuberantes, que son cubiertos por redes de tul previamente lavadas con agua clorada. Las redes se ajustan con ligas al perímetro de la maceta, sin permitir que lleguen al suelo. La mezcla de tierra no debe quedar demasiado compacta, a fin de permitir la aeración y el crecimiento adecuado de las raíces. La red debe estar en contacto con la tierra, para que las plantas crezcan por fuera, libremente.
- 2.** Las semillas se suspenden en una solución de TC (*tissue culture*) agar al 0.1% y se dejan vernalizando a 4°C de dos a tres días. La relación aproximada es de 5mg -unas 360 semillas- en 36mL de TC agar,
- 3.** Se siembran las semillas vernalizadas en las macetas, utilizando una pipeta. Se aplica un promedio de dos semillas por cada uno de cinco puntos sobre la red (cerca de las esquinas y al centro). Las macetas se acomodan en las charolas, y éstas se trasladan a cámaras de condiciones controladas (20-24°C, con fotoperíodo de 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad por día).
- 4.** Al cabo de una semana de crecimiento, se seleccionan las plantas más sanas y se remueve al resto, de manera que quede una por punto (5 por maceta).
- 5.** Transcurridos otra semana, cuando el tallo alcance al menos 1 cm de largo y ya asomen los primeros capullos, se decapitan las plantas, cortando sobre la hoja más superior del tallo de inflorescencia. Esta medida, al remover el meristemo principal, promueve el desarrollo de inflorescencias secundarias, aumentando la cantidad de flores -y semillas colectadas- por planta.
- 6.** La infiltración debe realizarse unos cuatro días después decapitadas las plantas. La tierra debe estar suficientemente húmeda como para no absorber la solución de infiltración. Previamente, se aconseja remover las flores que parezcan fertilizadas, así como todas las silicuas en desarrollo.

RESULTADOS

Resultados

Analisis preliminares

Con el fin de corroborar la hipótesis preliminar de ortología, inferida a través de las similitudes entre secuencias de los genes de *L. schismatica* y los de función **B** de *A. thaliana*, se compararon las secuencias de estos genes con las de sus presuntos ortólogos en otras especies. Principalmente, de *Zea mays* y de *Oryza sativa* (monocotiledóneas) **Fig. R1**. Se incluyó en estas alineaciones tanto a los ortólogos como a sus presuntos parálogos (AP3-h y PI-h).

Aunque se trata de análisis de distancia, puramente basados en la similitud total entre secuencias, los resultados de estas agrupaciones se usaron como base para fortalecer la hipótesis preliminar de ortología, y proseguir con los experimentos sobre una base más confiable. De ninguna manera debe pensarse que estos análisis sustituyen cuya realización sería necesaria para robustecer categóricamente la hipótesis sobre ortología y paralogía de estos genes de *Lacandonia schismatica*.

Construcciones

A través de los métodos descritos en la sección anterior, se logró obtener ligaciones exitosas de los genes de *L. schismatica* en vectores binarios., mismos que pudieron ser introducidos en células de *Agrobacterium tumefaciens*. Actualmente se cuenta con dos construcciones útiles para la sobreexpresión de los ortólogos de AP3 y PI de *Lacandonia schismatica*. Se trata de plásmidos binarios (**pBIN-JIT**) que contienen dos copias del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor, seguidos por el cDNA del gen de estudio, y una copia del gen de la Nopalina Sintetasa –NOS- en la región 3' (**2X35S::AP3-hLs cDNA::NOS** y **2X35S::PI-h Ls::NOS**). En ambos casos la resistencia es a *Kanamicina*. Se cuenta también con una construcción (**pCAP310**, cortesía de R. Sablowski) compuesta por una copia del CaMV 35S, que antecede a un minigen de AP3 (de *A. thaliana*: **35S::AP3mg At::NOS**) dentro del plásmido binario **pCGN1547**. Al contener la secuencia correspondiente a *A. thaliana*, y haber sido ya ampliamente probado, se le utilizó como control positivo. Por último, se cuenta con una construcción con base en pCAP310, que contiene el cDNA del ortólogo de PISTILLATA de *L. schismatica*, precedido por una copia de la región 35S del CaMV (**35S::PI-h**) Esta construcción no se utilizó en experimentos posteriores a lo largo de este trabajo. Se cuenta con respaldos (*stocks*) de cada una de estas construcciones en soluciones de glicerol al 15% almacenadas a –80C, así como extracciones de las mismas (*minipreps*) almacenadas a –20C.

Los mapas de estas construcciones se pueden ver en las figuras **R2** y **R3**.

Generación de líneas transgénicas

La relación entre plantas infiltradas y semillas colectadas se resume a continuación:

- 70 plantas *ap3-3/+* (3/4 de charola; 15 macetas) con la construcción **35S::AP3mg(At)::NOS** (**pCAP310**, control positivo); semillas colectadas: ~ 65,000 (1 g).
- 80 plantas *Ler (+/+)* con **pCAP310**; Semillas colectadas: ~77,000 (1.15g).
- 170 plantas *ap3-3/+* (1 1/2 charolas, 30 macetas) con la construcción **2x35S:: AP3-hLs:: NOS**; Semillas colectadas: ~90,000 (1.3g).
Muy alta mortalidad de plantas infiltradas.
- 150 plantas silvestres (*Ler +/+*) con **2x35S AP3-hLs::NOS**; Semillas colectadas: ~100,000 (1.5g). Alta mortalidad de plantas infiltradas.

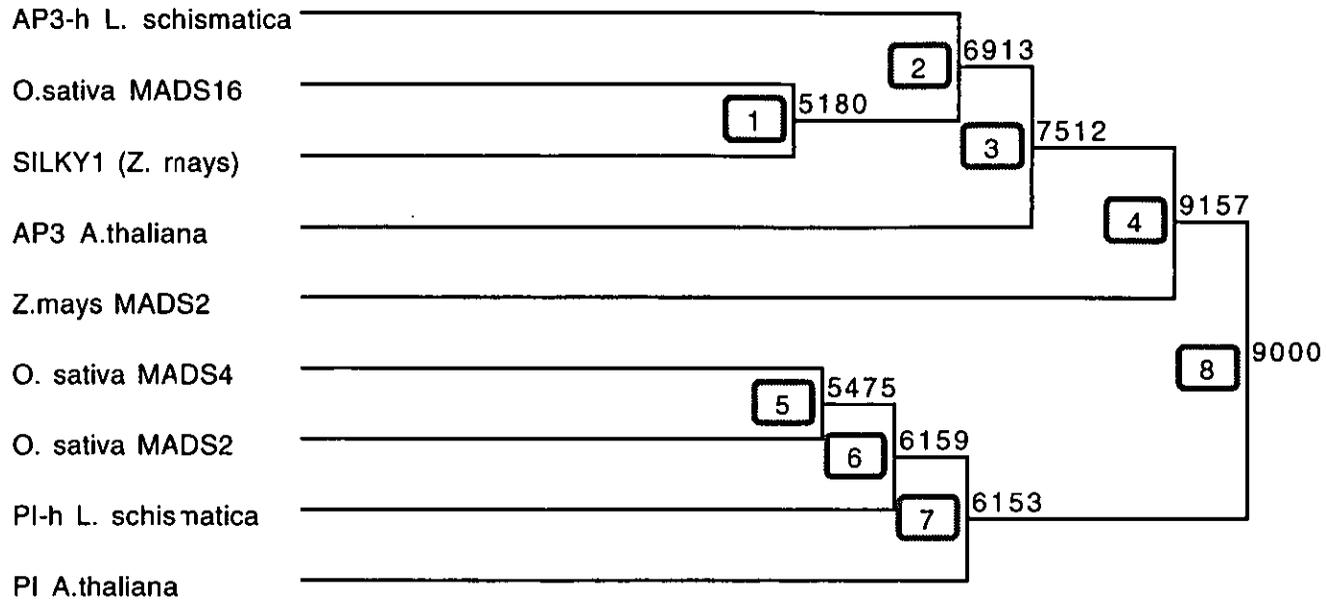
Número de plantas transformantes (resistentes al antibiótico respectivo) por fenotipo y construcción

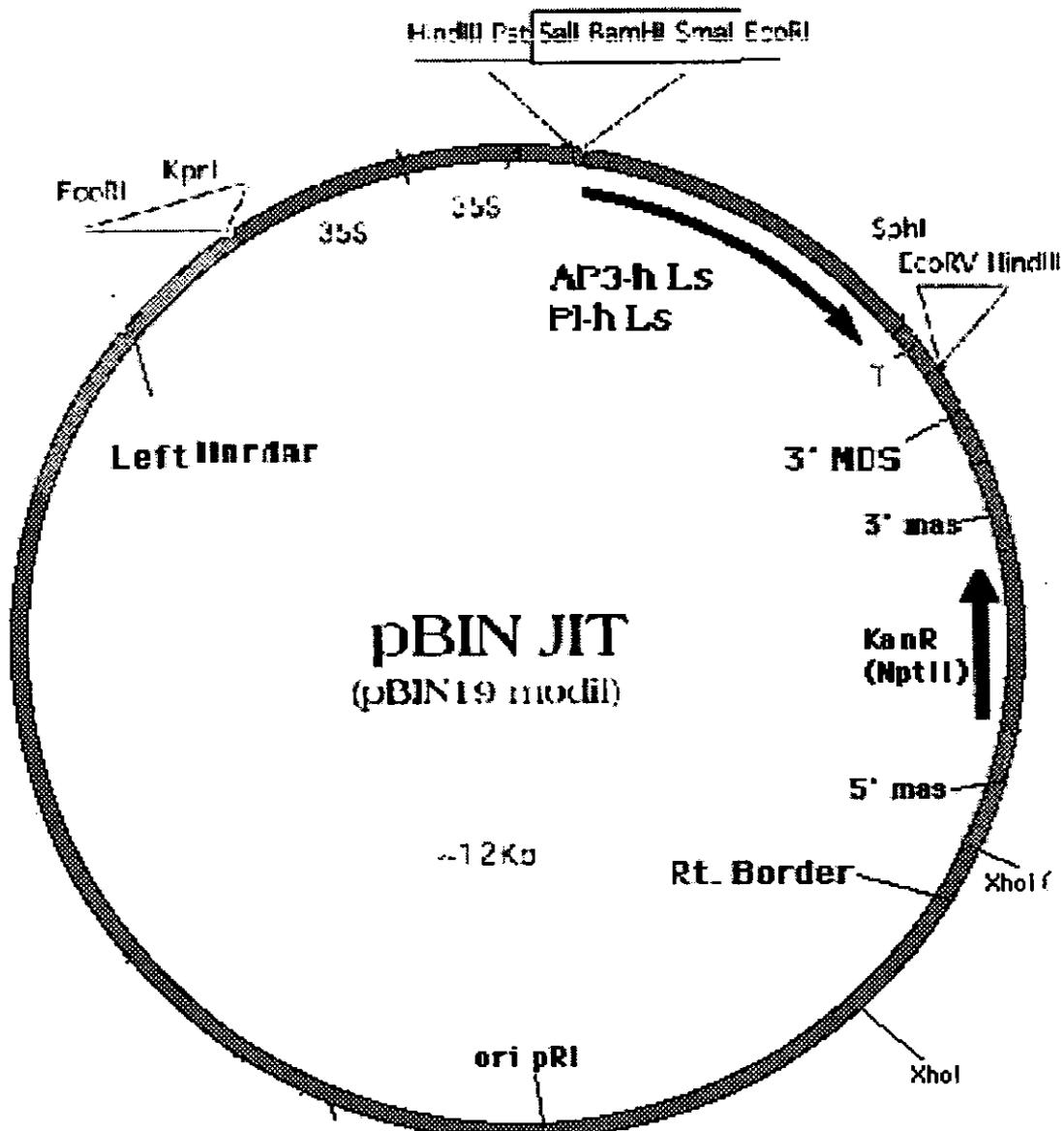
CONSTRUCCIÓN GENOTIPO	pCAP310	2x35S::AP3-hLs
Ler (+/+)	22	10
ap3-3/+ (Ler)	7	4

Similitud entre presuntos genes de función B de distintas especies La primera figura esquematiza y resume las distintas alineaciones efectuadas entre especies de dicotiledóneas y Monocotiledóneas (secuencias disponibles en el GenBank-NCBI). Los cDNAs son de los presuntos ortólogos de APETALA3 y PISTILLATA (parálogos entre si). Se les considero como tales, al ser obtenidos en experimentos utilizando como sonda a los genes respectivos de *Arabidopsis thaliana*.

El alto grado de similitud es otra evidencia que permite postular una hipótesis preliminar de homología. En la segunda figura, se enlistan las secuencias resultantes de una búsqueda BLAST (NCBI), con mayores porcentajes de similitud dentro de una base de datos (GenBank), utilizando como cebo (query) al ortólogo putativo de AP3 de *Lacandonia schismatica*. Este tipo de evidencias constituyeron la base para emprender la presente tesis.

Alineación-ortólogos AP3 yPI (GeneWorks)





Mapa de pBINJIT, vector binario derivado de pBIN19. La diferencia entre éstos radica en los sitios de clonación, que en pBINJIT se circunscribe a los indicados con un rectángulo en el esquema. Este plásmido confiere resistencia a Kanamicina, y contiene dos copias del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S). Los cDNAs de *Lacandonia schismatica* se insertaron en el sitio BamHI.

DISCUSIÓN

El presente trabajo se originó como parte de las investigaciones en torno a las bases moleculares del arreglo floral de *Lacandonia schismatica*. La intención del proyecto general ha sido explicar este arreglo a la luz del modelo ABC. Tal intento exige la identificación y caracterización de los homólogos de genes ABC, lo cual incluye sus mecanismos de expresión y el estudio de su función. El proyecto general incluye también análisis filogenéticos utilizando a *L. schismatica* como taxón principal.

El propósito principal de este trabajo fue generar las herramientas necesarias y demostrar en forma preliminar, por vías experimentales, que las similitudes observadas entre los genes descubiertos en *L. schismatica* y los de función B de especies modelo no son sólo de carácter estructural sino también funcional. En ella se intentó determinar si los ortólogos putativos de *AP3* y *PI* en *Lacandonia schismatica* cumplen la función de especificación de identidad de pétalos y estambres, mediante la generación de líneas de sobreexpresión de estos genes en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

Al inicio de esta investigación se contó con la secuencia de estos dos genes, los cuales mostraban similitudes significativas con los genes *APETALA3* y *PISTILLATA* de *A. thaliana*, así como con los ortólogos en otras especies más cercanas a *Lacandonia schismatica* (*Oryza sativa* y *Zea mays*, por ejemplo). Los resultados del análisis de estas secuencias permitieron elaborar los postulados teóricos en que se basa esta tesis, a través de distintas evidencias previas, como:

- alineaciones entre secuencias, que arrojaban porcentajes de similitud entre el 47% y el 65% (ver apéndice).
- agrupamiento de los genes de *L. schismatica* en la familia PI/AP3 de árboles de genes MADS-box (Vergara, con datos de Theissen y Purugganan) .

se había establecido previamente que los genes de *L. schismatica* eran ortólogos a *AP3* y *PI*.

En virtud de estas similitudes, en este estudio se intentó probar que los genes de *L. schismatica* conservarían la función descrita en el modelo ABC (especificación de pétalos y estambres). Por vías experimentales (introducción en plantas de *A. thaliana* a través de vectores de sobreexpresión adecuados), se determinaría si estos genes pueden generar expresiones morfológicas similares a las observadas en experimentos en los que se emplean los genes nativos de la especie modelo. El sentido de los resultados no iría en desmedro de las hipótesis de

homología, aunque si proporcionaría datos importantes sobre los procesos de desarrollo, y en particular en un ejemplo *sui generis* de diversidad vegetal.

Condiciones experimentales

A pesar de su aparente sencillez, el presente trabajo comprendía una serie de etapas y niveles, cada uno de los cuales debía cumplirse a cabalidad. Desde un principio, se establecieron las condiciones experimentales correspondientes, a fin de eliminar errores y fuentes de incertidumbre. Estas se detallan a continuación, y se acompañan de una discusión sobre las razones por las cuáles se estima que el objetivo de la tesis no se cumplió en su totalidad.

Procesamiento de los genes y diseño de construcciones

Para comenzar, la posibilidad de que los genes utilizados en los experimentos pudiesen no ser funcionales (i.e. que no fuesen capaces de producir una proteína funcional -cualquiera que fuere su función específica en la especie de estudio) debía ser descartada desde las etapas preliminares. Para esto, fue preciso verificar teóricamente que las diferencias existentes entre la secuencia de nucleótidos (una vez descartada la posibilidad de errores de amplificación y secuenciación) no se tradujeran en cambios significativos en estructura primaria del producto polipeptídico. Es decir, cambios de identidad de los aminoácidos, que pudieran modificar las propiedades de la proteína, y por ende, su función (o funcionalidad, incluso).

Algunos factores que permiten descartar la probabilidad de que los genes con que se trabajó no fueran funcionales, son:

1. que se trata de **Marcos de Lectura Abiertos** (*Open Reading Frames-ORFs-*) al traducirse la sec. de nucleótidos
2. que existen amplias similitudes entre los genes funcionales de *Arabidopsis thaliana* y aquéllos obtenidos a partir de *L. schismatica*. Las secuencia de aminoácidos obtenida a través de la traducción de estos genes son también muy similares.
3. Que aquéllas diferencias que existen entre ambas secuencias de nucleótidos:
 - a) no fueron tales en la comparación con la secuencia de los ortólogos (también funcionales) de estos genes en monocotiledóneas como *Oryza sativa*, que pueden considerarse más cercanas filogenéticamente a *L. schismatica*, y por tanto menos divergentes.
 - b) las diferencias en nucleótidos que no desaparecían en a), se ubicaban en tercera posición, y al traducir la secuencia de nucleótidos, la identidad del aminoácido correspondiente no variaba, con respecto al consenso de las especies probadas previamente (*A. thaliana* y *O. sativa*).

- c) las que no desaparecían por a) o b), eran nucleótidos que, a pesar de cambiar la identidad específica del aminoácido, no cambian su naturaleza (carga, polaridad, etc.), y por tanto pudo suponerse, que tampoco su rol particular dentro de la proteína.

Todo esto permite sustentar la afirmación de que la proteína generada a partir de la secuencia reportada y utilizada para transformar a las plantas, es funcional, y esencialmente similar a las que inducen la formación de pétalos y estambres (función B) en los sistemas modelo. Probablemente su función específica no es necesariamente la misma, pero al menos permite contar con las bases apropiadas para determinarlo experimentalmente bajo la influencia de promotores constitutivos. Aunque cabía la posibilidad de que algunas de las diferencias observadas fueran reales, y que en algún momento se estuviera ante variantes alélicas de los genes originalmente descritos y secuenciados, se optó por las clonas que no mostraran ninguna diferencia importante tras pasar por los filtros antes delineados.

Una vez hecho lo anterior, y al establecerse que las diferencias en secuencia no eran significativas, se procedió a preparar los genes para su introducción en los vehículos adecuados para su expresión última en *Arabidopsis* (plásmidos binarios → células de *Agrobacterium* sp → plantas).

Luego de numerosos intentos, se logró obtener ligaciones exitosas de los genes de *L. schismatica* en vectores binarios., mismos que pudieron ser introducidos en células de *Agrobacterium tumefaciens*. Actualmente se cuenta con dos construcciones útiles para la sobreexpresión de los ortólogos de AP3 y PI de *Lacandonia schismatica*. Se trata de plásmidos binarios (**pBIN19**) que contienen dos copias del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor, seguidos por el cDNA del gen de estudio, y una copia del gen de la Nopalina Sintetasa –NOS- en la región 3' (**2X35S::AP3-hLs cDNA::NOS** y **2X35S::PI-h Ls::NOS**). En ambos casos la resistencia es a *Kanamicina*. Se cuenta también con una construcción (**pCAP310**, cortesía de R. Sablowski) compuesta por una copia del CaMV 35S, que antecede a un minigen de AP3 (de *A. thaliana*: **35S::AP3mg At::NOS**) dentro del plásmido binario **pCGN1547**. Al contener la secuencia correspondiente a *A. thaliana*, y haber sido ya ampliamente probado, se le utilizó como control positivo.

Transformación de plantas de Arabidopsis thaliana: generación de líneas transgénicas

En la siguiente etapa, que consistió en la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con las construcciones elaboradas, había dos posibles vertientes:

- ❖ Que no hubiese transformantes, lo cual sería atribuible a fallas metodológicas en una o varias etapas del proceso experimental.
- ❖ Que hubiese transformantes:
 - a) Con resistencia al antibiótico pero sin variación en el fenotipo (rf. a lo esperado para la F2 de las cruzas/T1 de las transformaciones).

Esto indicaría que la transformación fue exitosa, pero que hay problemas de secuencia, de estructura, o bien, que existen diferencias filogenéticas que implican pérdida o cambio de función respecto a los ortólogos de *A. thaliana* (i.e. la 'brecha' filogenética es demasiado 'amplia').

b) Resistentes al antibiótico y con variación fenotípica apreciable.

En este caso, la transformación se consideraría exitosa al 100% al existir evidencias de que hubo algún tipo de integración de los transgenes en el genoma de la planta receptora. Se discutirían las diferencias entre fenotipos de sobreexpresión, con base en las distintas construcciones (control y variante experimental), y éstas a su vez en relación a experimentos previos.

Si bien en los hechos no fue posible observar los fenotipos florales, se sabe que las transformaciones fueron exitosas en algunos casos en los que se contó con plántulas resistentes a los antibióticos. La tasa de transformación fue muy baja, un tanto más de lo observado en experimentos similares¹ (aprox. 1 por cada 10,000 semillas, ~ 0.001%). Esto podría deberse a varios factores: por ejemplo, al hecho de que las transformaciones se efectuaran sobre plantas muy maduras. El retraso en la obtención de las construcciones resultó en el crecimiento de las plantas varios días más de lo recomendado (ver protocolo). Se sabe que al acercarse a la senectud, el comportamiento fisiológico de las plantas varía respecto de las plantas jóvenes, particularmente en lo relativo a la reproducción (por ej.: Liljegreen *et al.*, 1999). Este podría ser el caso también en términos moleculares. Al advenimiento de la madurez tardía, las plantas podrían comenzar a producir compuestos o factores que reprimieran u obstaculizaran el

¹ (aprox. 1 por cada 10,000 semillas ~ 0.001%)

desarrollo reproductivo normal. Aún así, este factor no impidió totalmente la transformación. Aquellos autores de protocolos de infiltración mencionan que en plantas maduras la eficiencia de transformación en efecto disminuye, aunque el proceso no se vuelve inviable. Por otro lado, la poda continua de las plantas, si bien generó un mayor número de ramificaciones secundarias y terciarias, también mantuvo a raya el advenimiento de la senectud.

Por otro lado, las técnicas de transformación utilizadas en este trabajo provocaron grados de estrés severos en las plantas. El contacto y la submersión de las plantas en la solución de infiltración -mezcla rica en sacarosa- durante un tiempo prolongado (15 minutos) pudo haber tenido un efecto osmótico adverso; y su permanencia durante varios días sobre hojas y tallos favorecieron el surgimiento de hongos, así como la pérdida de dehiscencia y el marchitamiento general de las plantas. Actualmente se conoce una variación de la técnica, que consiste en la aspersión directa de la solución de infiltración sobre el cuerpo de la planta, en vez de su inmersión total en dicha solución. Al parecer, la eficiencia de transformación no varía con esta técnica, a la vez que resulta en un menor daño para las plantas (*B. Ambrose*, com. pers.)

A pesar de la baja proporción de transformantes, al menos cuatro plantas para cada transformación se desarrollaron normalmente en el medio selectivo correspondiente. Es decir, retuvieron su verdor, experimentaron surgimiento de hojas de roseta, y continuaron un crecimiento relativamente normal (aunque algo lento) desde entonces.

Sin embargo, ninguna sobrevivió al traslado a tierra, más allá de una semana y media. Todas murieron en estadios anteriores –muy cercanos en algunos casos- al surgimiento del escapo (tallo reproductivo). Debido a esto, y por restricciones de tiempo, fue necesario interrumpir el trabajo en esta etapa. Sin embargo, según lo observado hasta el momento, este se considera parcialmente exitoso. Asimismo, se propone su consecución, con base en las siguientes consideraciones.

Consideraciones técnicas

La totalidad de la población de semillas T1 se han sembrado y se encuentran en proceso de germinación al momento de escribir estas líneas. En breve será posible observar fenotipos en los medios selectivos, mismos que servirán para determinar qué plantulas merecen seguimiento. A este respecto, será de crucial importancia el cuidado extremo durante las etapas de transplante y cultivo. Se sugieren algunas medidas:

- 1) Esperar la mayor cantidad de tiempo posible antes de realizar el traslado a tierra (*Metromix*). Para esto, es necesario asegurar que ningún tipo de contaminación (hongos, bacterias, levaduras) se desarrolle cerca de la plántula en desarrollo. De

darse el caso, habrá de realizarse un trasplante precoz, sea a tierra o a otra caja con medio de crecimiento. De todos los elementos involucrados, es posible que el estado y edad de la planta sean factores determinantes para el crecimiento o muerte de la planta en esta etapa.

- 2) Aplicar el máximo cuidado a la integridad de la raíz, cuando se realice el trasplante, debe aplicarse el máximo cuidado a la integridad de la raíz. De preferencia, deberá cortarse un círculo amplio de agar alrededor de la plántula, y trasladar a ambos al nuevo hogar.
- 3) Al paso de la plántula a macetas con tierra, se debe asegurar que ésta cubra la raíz por completo, al tiempo que la parte aérea quede libre y al descubierto. La tierra debe estar húmeda previamente, y nunca permitir que se sature de agua. Durante los primeros días, es preferible regar poco, y cubrir las charolas con domos transparentes que retengan calor y humedad.

Una vez que crezcan las plantas y sobrevenga la floración, habrán de observarse cuidadosamente los fenotipos florales, a la luz de lo ya descrito para experimentos de sobreexpresión con genes de *arabidopsis* y *antirrhinum* en plantas mutantes y silvestres de *A. thaliana*. Es importante procurar mantener un número suficiente de líneas transgénicas (10-20; ver razones más abajo). El análisis de las flores por microscopía electrónica de barrido sería recomendable, a fin de tener más detalle, incluso a nivel celular de los fenotipos resultantes. La determinación de la expresión por hibridización *in situ* podría ser útil para establecer si los patrones han cambiado (rf. plantas no transgénicas, y con transgenes nativos o ya estudiados previamente).

Se coleccionarán las semillas de esta generación, y someterlas al mismo tratamiento (esterilización, selección, trasplante). El análisis de las líneas segregantes T2 (como ya fue descrito para la generación anterior) darán la información definitiva sobre el efecto y la acción de los transgenes. Esto, debido a que muy probablemente en esta generación se observará el efecto de la expresión de los transgenes en complementos cromosómicos (homocigosis), por efecto de la segregación de los alelos.

Consideraciones Teóricas: *especulaciones sobre un resultado por venir*

Considerando que la hipótesis de trabajo no ha podido ser corroborada o refutada en base a los fenotipos florales surgidos de las transformaciones, ésta se mantiene incólume, a la espera de resultados más definitivos de éste y otros estudios. Se estima probable que estos resultados se inclinen a confirmar las hipótesis planteadas aquí, en el sentido de una conservación en la función de los genes *per se*, con base en las similitudes entre secuencias nucleotídicas.

A reserva de que los hechos revelen lo contrario, sería conveniente proseguir las investigaciones, explorando el papel de otros elementos que podrían jugar un papel relevante en la determinación del arreglo floral de *Lacandonia schismatica*.

Importancia de los promotores

El alto grado de conservación estructural entre ortólogos, a pesar del tiempo de divergencia transcurrido (expresado en términos concretos, en una enorme 'brecha' filogenética) puede deberse a una fuerte presión de selección ejercida sobre ellos. Esto debido a que, por una parte, no existan duplicados funcionales, y por otro, a que se trata de una función vital para el desarrollo de la planta. Esta función bien puede ser –aunque no necesariamente- la misma que se ha caracterizado en los sistemas modelo. Luego, es muy posible que exista también conservación de función entre los ortólogos.

A partir de dicha similitud estructural, que habla de un origen y una historia comunes, pueden derivarse numerosas hipótesis y preguntas, factibles de ser comprobadas empíricamente. Una de ellas es la que concierne a la expresión de estos genes. Otra, la que atañe a su función, que es la que dio razón de ser al presente trabajo.

La hipótesis que supone una conservación de función sobre la base de la similitud en secuencia de los genes (ortología) es en apariencia trivial. Sin embargo, la existencia de numerosos casos en los que la homología entre los genes no implica conservación de función (generación de estructuras homólogas por vía de estos genes) (Wray y Abouheif, 1998). Esto es particularmente cierto si se considera que los genes en estudio son reguladores maestros, y llevan a cabo funciones específicas (factores de transcripción; activación o represión de genes downstream) pero que pueden considerarse genéricas, en el sentido amplio, de que es posible adecuarlas a procesos distintos. Los genes blanco (*downstream*) bien podrían no ser los mismos en *Lacandonia* y *Arabidopsis*, ya sea por la distancia filogenética entre estas especies, ó por que los ortólogos han sido reclutados a lo largo de su divergencia para procesos distintos.

Aún siendo similares estos genes blanco, el resultado final puede no ser el mismo; de igual manera, si fueran distintos, la estructura resultante podría ser la esperada. Como se apuntó anteriormente, el hecho de conocer tan profundamente a una sola especie no puede hacer suponer que el resto del mundo vivo se comportará del mismo modo. El estudio del desarrollo en animales ha dado muchas sorpresas. No es difícil pensar que las plantas nos deparan algunas más. Por si esto fuera poco, el entorno molecular y mecanístico de la gran mayoría de los genes homeóticos florales es aún desconocido, salvo por contadas excepciones (p.ej., ver Sablowski y Meyerowitz, 1998).

Evidencias de que la diferencia observadas entre especies cercanas o lejanas se debe mas a regiones regulatorias que a la secuencia codificante de los genes, se encuentra en abundancia en la literatura.

Por ejemplo, Samach *et al.*, (1997) documentan diferencias significativas entre los patrones de expresión de los genes de función **B** de *Antirrhinum majus* y *Arabidopsis thaliana*, a pesar de que entre los genes mismos existe una similitud bastante alta, de 61.2% entre *AP3* y *DEF*, y de 58.4% entre *PI* y *GLO*. La secuencia de aminoácidos es aún más parecida. Los mutantes de pérdida de función para estos genes dan como resultado fenotipos muy similares, lo cual confirma que en ambas especies, estos ortólogos llevan a cabo la misma función general (aunque de distinta forma-organizacion). La diferencias en el patrón de expresión pueden tener una explicación en la divergencia observada entre los promotores de *AP3* y *DEF*, ampliamente estudiados a la fecha

En este trabajo, los autores intentan explicar(se) las diferencias en los patrones de expresión de *DEF* y *AP3*. Específicamente, la observación de que *DEF* se expresa en el cuarto verticilo de las flores de *Antirrhinum majus*, mientras que en *Arabidopsis thaliana* esto no ocurre con *AP3*, mediante la introducción de *DEF* en plantas de arabidopsis. Al hacerlo, se observó que *DEF* se expresaba en el cuarto verticilo de las plantas transgénicas, lo cual sugiere fuertemente que el responsable es el promotor de *DEF*, mismo que se introdujo junto con el gen. La manera en que los genes **B** se autorregulan y circunscriben su esfera de acción es mediante la contraparte respectiva. Mientras *DEF* se expresa en el segundo, tercero y cuarto verticilos, *GLO* sólo se expresa en el segundo y tercero, lo cual mantiene el heterodímero funcional dentro de los límites espaciales conocidos. Asimismo, en *Arabidopsis thaliana*, *PI* se expresa del segundo al cuarto verticilo, mientras que *AP3* lo hace sólo en el segundo y el tercero.

Samach *et al.* (1997) proponen que los patrones de expresión de *PI/AP3* y *GLO/DEF* están invertidos, por que hubo una especie de intercambio entre promotores. Baum (1998), sin embargo, propone que una explicación alternativa podría ser que la expresión de estos genes hubiese sufrido un 'corrimiento' o desplazamiento gradual a través del tiempo transcurrido desde que divergieron los genes.

En lo que concuerdan todos es en el rol esencial de los promotores para determinar los cambios observados. En patrones de expresión, aunque en última instancia podría ser también en fenotipo general, tanto en estos como en otros genes cuya similitud en secuencia no alcanza a explicar los fenotipos distintos que producen, ni los mecanismos mediante los cuales lo hacen.

Genes reguladores y evolución

Las estimaciones de reloj molecular, que asocian temporalmente la diversificación de los genes MADS con las de las plantas terrestres (surgimiento y divergencia de los primeros genes homeóticos florales alrededor del tiempo de divergencia de las plantas vasculares –hace 478 millones de años). La diversificación del grupo de genes AP1/AGL9, con la divergencia de helechos y plantas con semilla- 395 mya). Una diversificación/elaboración subsecuente de esta familia de genes se ha datado alrededor del momento en que las plantas con semilla diversificaron (285mya-around the time of the last common ancestor of seed plants. (Purugganan, 1997).

Sugieren que la diversificación de las plantas pudo haberse sustentado en las múltiples vías, funciones y herramientas moleculares provistos por los genes MADS-box.. Estas asociaciones se sustentan incluso a niveles taxonómicos menores, como la duplicación de AG (ortólogos ZMM2 y ZAG1, y el surgimiento de las Poaceae.

Las subfamilias de los genes MADS, y las posibilidades combinatorias de sus productos, están indudablemente correlacionados con el surgimiento y fijación exitosa de muchas de los patrones corporales de los eucariontes, e incluso pudieron haber constituido prerequisites esenciales.

Los cambios en los productos pudieron haber ocurrido por:

- Cambios en los patrones de expresión (atribuibles a los promotores)
- Cambios en la función inherentes a la secuencia de los genes (eventos de duplicación y divergencia-paralogía)

Se han encontrado ejemplos, que por su claridad resultan de gran interés para la comprensión de fenómenos evolutivos. Uno de ellos se encuentra en el trabajo de Purugganan (1997) sobre la evolución molecular de varios genes parálogos involucrados en el desarrollo floral. Se estima la tasa de sustituciones de: *AP1* y *CAL*, *AP3* y *PI*, en 2 spp de *Arabidopsis*, en otra Brassicaceae (la col, *Brassica oleraceae*), y otras dos especies algo más lejanas (*Antirrhinum majus* y *Silene latifolia*). Los resultados revelan dinámicas contrastantes de evolución molecular entre parálogos y grupos de parálogos. Tal vez el descubrimiento más interesante, es que entre los cuatro loci, es *CAULIFLOWER* el que ha evolucionado a una tasa más acelerada, lo cual puede relacionarse con el hecho de que *CAL* haya surgido como duplicado de *AP1*, y entre ambos exista un grado importante de redundancia funcional. Por ahora...

Los genes reguladores se encuentran en la base del cambio evolutivo. El hecho de que existan tantos ejemplos que muestren que estos genes pueden cambiar de función o de contexto lo refuerzan. Más aún cuando se observa que los genes regulados no varían sustancialmente entre especies muy lejanas o distintas. Pero más importante aún es determinar el rol de las secuencias regulatorias de todos los genes. Es muy probable que sean éstas las responsables del cambio de mecanismos de expresión, e incluso de función de un gen determinado.

Todo esto fortalece la hipótesis de que las novedades evolutivas surgen, en su mayoría, a partir de las modificaciones sufridas por genes preexistentes, que resultan en la adquisición de nuevas funciones. Esto se ve apoyado por los casos en que se puede asociar el reclutamiento de un gen o vía existente para un nuevo proceso, con el surgimiento de alguna novedad evolutiva, seguida a veces de divergencia filogenética o cladogénesis (Wray y Abouheif, 1998).

Escenarios alternativos

▪ deducciones a partir de integraciones y modelos

Aunque los genes homeóticos florales (GHF) han sido caracterizados extensivamente en términos genéticos (tanto como para dar origen al modelo ABC y derivaciones), es hasta hace muy poco tiempo que estos genes comenzaron a estudiarse en términos moleculares. De este modo, no es mucho lo que hasta el momento se sabe sobre, por ejemplo, la forma y mecanismos moleculares específicos en los que las proteínas producto de estos genes actúan, o sobre la interacción de los genes con otros componentes moleculares, bioquímicos y celulares. Son por ejemplo, muy recientes, los estudios sobre el transporte y mecanismos de señalización celular de factores de transcripción como los codificados por los GHF. Asimismo, sobre la forma en que estos genes se autorregulan, o son regulados por otros elementos antes, durante y después de su rol principal en las etapas tempranas de la especificación de los órganos florales, por ejemplo. Así como se ha determinado que algunos tienen actividad (y funciones) en otros momentos del desarrollo (como *AG*, *API* y *AP2* en la determinación de la identidad del meristemo floral) es factible encontrar sorpresas y novedades en las diferentes etapas de la red regulatoria en la que todos estos genes se encuentran inscritos.

Otra posibilidad para el presente estudio, a contemplarse en caso de que se demuestre que las transformaciones fueron exitosas, y aún así no puedan observarse fenotipos cercanos a los esperados, o al menos los experimentos no lo demuestren- sería el caso de una represión en *trans*^{*}. de los genes insertados a *Arabidopsis*, por factores aún no caracterizados, aunque

^{*} *trans*: factores codificados por secuencias no contiguas al gen de referenci (*cf cis*).

previstos teóricamente en modelos de redes de regulación (e.g. Mendoza y Alvarez-Buylla, 1998).

Dentro de los modelos de redes regulatorias propuesto por los autores, a partir de la evidencia experimental y teórica acumulada hasta 1998, se encuentra la predicción de la existencia de un elemento represor de la actividad **B** (a través del gen *AP3* específicamente). Este elemento no ha sido caracterizado hasta el momento. Parcy *et al* 1999. (y Weigel, dentro de su modelo del establecimiento del patrón floral) .sugieren la posibilidad de que este factor inhibitorio de *AP3* pueda ser *UFO* (*UNUSUAL FLORAL ORGANS*), A manera de lo que ocurre para *AGAMOUS*, el cual parece ser inhibido por *APETALA2* a través de la acción de cierto número de *enhancers* (potenciadores de la expresión de genes *downstream*, y que en ocasiones actúan como silenciadores-represores) redundantes (Bomblies *et al.*, 1999).

De ser así, se trataría de factores intrínsecos a la constitución molecular de los sistemas bajo análisis (arabidopsis, y probablemente lacandonia) y no de circunstancias imputables a cualquier tratamiento experimental como los abordados en este trabajo. En primera instancia, sería necesario determinar cuál de los dos factores anteriores podría ser responsable de la ausencia de los fenotipos esperados. La forma más directa sería repetir las transformaciones, esperando encontrar plantas transgénicas con inserciones del transgen en sitios distintos, en los que la expresión no se viera afectada por represores, genéricos o específicos.

▪ **enhancers**

Algunos de los fenotipos resultantes de experimentos de expresión de transgenes pueden explicarse invocando elementos regulatorios particulares, y apenas conocidos en sistemas vegetales.

Existe la posibilidad de que el transgen introducido a la planta se inserte cerca de regiones regulatorias del genoma, conocidas como *enhancers*. Cuando esto ocurre, su expresión puede verse alterada en formas diversas. Los *enhancers* por lo general potencian la expresión de los genes cercanos, sin importar la posición relativa en que estos se encuentren (*upstream* o *downstream*). Por lo general, la especificidad del promotor asociado al transgen se mantiene, y lo que varía es el nivel de expresión. Si el gen está bajo la influencia de un promotor específico (de regiones; tejidos, por ejemplo), el *enhancer* provocará un aumento en la expresión, aunque está seguirá circunscrita a la región determinada por el promotor. Si el promotor es constitutivo (o 'mínimo'), el *enhancer* potenciará la expresión del gen de manera irrestricta en tiempo y lugar.

En ocasiones, el transgen se ve expresado a niveles extrañamente bajos, o bien no se expresa del todo. Esto puede deberse a que se insertó cerca de un tipo de *enhancer* conocido como 'represor'. Una vez más, la especificidad dependerá del promotor asociado al gen. Los *enhancers* y represores son ejemplos de regulación en *cis*.

Los *enhancers* son elementos genéticos muy pequeños (8-20 pb) y con una secuencia bien definida. Si el transgen (o cualquier elemento móvil) se inserta dentro de la secuencia de un *enhancer*, éste se destruye y su acción generalmente se anula. Esto afecta al gen endógeno asociado al *enhancer*, pero la expresión del transgen no experimenta alteración alguna.

Cuando se generan plantas transgénicas, es necesario analizar el fenotipo de un buen número de líneas resultantes, a fin de establecer parámetros y verificar que la regulación observada es realmente la esperada. Cuando se caracteriza a una cantidad suficiente de líneas transgénicas, es posible elaborar una estadística y determinar qué rasgos y niveles de expresión son atribuibles a qué elemento factible (pues es poco probable que varios transgenes se hayan insertado en una región similar) (A. Colón-Carmona y E. Alvarez-Buylla, com. pers.)

Actualmente se realizan experimentos con el enfoque contrario, que consisten en la introducción de *enhancers* (sin genes asociados) constituyendo el T-DNA de vectores binarios para plantas, con el fin de inducir la expresión exagerada de genes endógenos., y así crear mutaciones dominantes y fácilmente reconocibles (Weigel *et al.*, 2000).

PERSPECTIVAS

- Experimentos similares con promotores vegetales nativos (de *Arabidopsis thaliana*, de *Lacandonia schismatica* y de especies muy cercanas, aunque sin el arreglo floral *sui generis*, como *Triuris spp* o *Sciaphila spp*), siempre en líneas transgénicas de *A. thaliana* (para comparar resultados).
- Experimentos similares (sobrexpresión, complementación, caracterización de promotores) en especies más cercanas a *Lacandonia schismatica*. En monocotiledónea como el arroz (*Oryza sativa*), por ejemplo. De particular importancia si no hay fenotipo de sobreexpresión pero se puede demostrar que esto no es imputable a errores técnico-experimentales.

CONCLUSIONES

El estudio a profundidad de los genes conocidos por su papel central en el desarrollo ocupa un sitio central en la palestra de la investigación actual. Análisis como el que dio lugar a esta tesis comienzan a ser práctica común –y necesaria- para la comprensión de los procesos desde un enfoque integral. Una comprensión que tome en cuenta, no sólo los esquemas amplios de interconexiones en una o varias especies, sino que explore éstas –y nuevas vías y procesos- en especies y grupos hasta ahora ignotos.

El desarrollo de técnicas que permiten observar los efectos de la pérdida de función (expresión-determinación de un fenotipo) de genes como los reguladores maestros, junto con las de expresión ectópica (sobreexpresión), vuelven factible su análisis a profundidad, y permiten la comprensión de, por ejemplo, su función particular, y la del papel que juegan en un contexto más amplio, dentro de los procesos del desarrollo.

Los genes regulatorios se encuentran en la base del cambio evolutivo. El hecho de que existan tantos ejemplos que muestren que estos genes pueden cambiar de función o de contexto refuerzan esta hipótesis.

Aún así, hay terrenos que recién comienzan a explorarse, y que merecerían más atención. Particularmente a raíz de las pruebas que han ido acumulándose en años recientes, y que los señalan como elementos cruciales en la diversificación de los mecanismos de desarrollo, y en consecuencia de los organismos que los presentan. Es muy probable que sean éstas las responsables del cambio de mecanismos de expresión, e incluso de función de un gen determinado. Más aún cuando se observa que los genes regulados no varían sustancialmente entre especies muy lejanas o distintas.

Las secuencias regulatorias podrían explicar los cambios en modo, tiempo y lugar que sufren los genes (entre ellos los reguladores maestros) y que dan pie a la versatilidad y ubicuidad observada. Su presencia, por ejemplo, en procesos disímboles del desarrollo y en grupos muy lejanos de organismos. La identificación y caracterización de nuevos elementos regulatorios permiten aclarar y entender mejor los mecanismos de lo ya conocido, y sus interacciones dentro del contexto de las redes y circuitos regulatorios, que cada vez parecen más intrincados.

El estudio de las secuencias regulatorias (promotores, *enhancers*, etc.) que dirigen la expresión de los genes importantes en el desarrollo, o que se encuentran en especies distintas a los sistemas modelo, pueden conducir a un conocimiento más amplio y profundo de 'las razones y las obras'

de la diversidad y la evolución, respectivamente. La posibilidad de realizar análisis directos de sobreexpresión, complementación y/o *knock-outs* en estas especies daría un impulso impresionante a los estudios comparados. Esto a su vez será benéfico tanto para los interesados en los mecanismos moleculares de desarrollo como a los que indagan en los procesos de evolución del desarrollo, de la evolución y la diversidad biológica.

Con esto se beneficiarán la inquietud, la curiosidad científica, y algunas necesidades humanas surgidas desde distintas disciplinas (Sistemática, Biología comparada, evolución molecular, agricultura y por supuesto, la genética molecular del desarrollo).

Casos concretos como el de *Lacandonia schismatica* constituyen oportunidades invaluable para alcanzar gran parte de los objetivos antes delineados. Es así, al ponderar su utilidad como especie de estudio, y como pieza dentro de tejidos ecológicos más amplios, que es posible entender a otros niveles el peligro de su ausencia. De una comprensión a este nivel, se deriva aquella sobre la importancia de proteger hábitats como la selva Lacandona, que albergan maravillas - comparables a la pequeña flor *chismática*- aún por descubrir.

A la selva, casa de la esperanza;

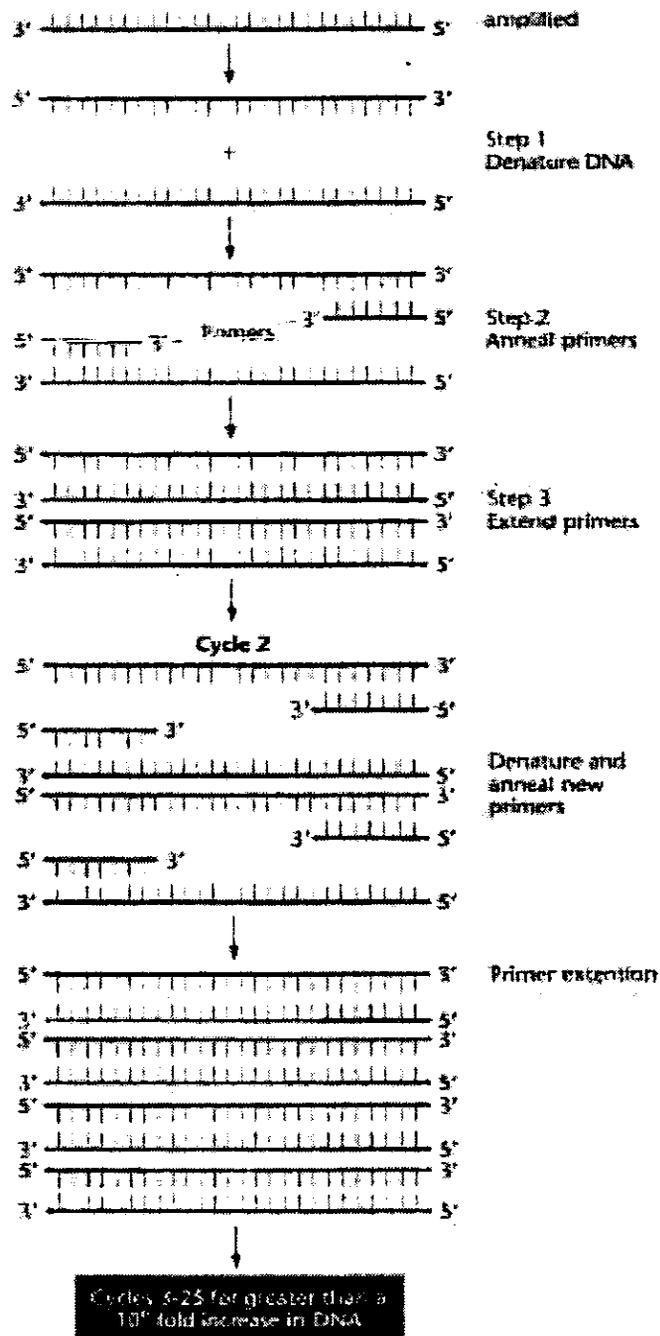
A la flor,

por contreras.

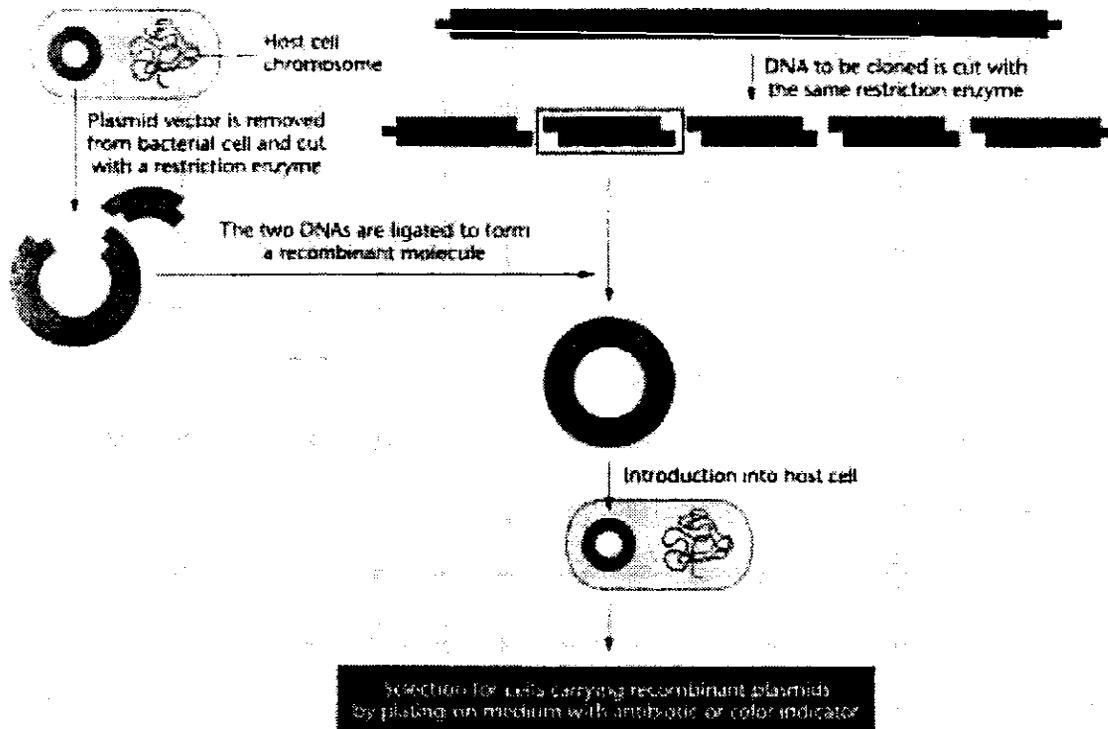
*Ciudad Universitaria
México, Distrito Federal
agosto del año 2000.*

ESTA TESIS NO DEBE
QUEDAR EN LA BIBLIOTECA

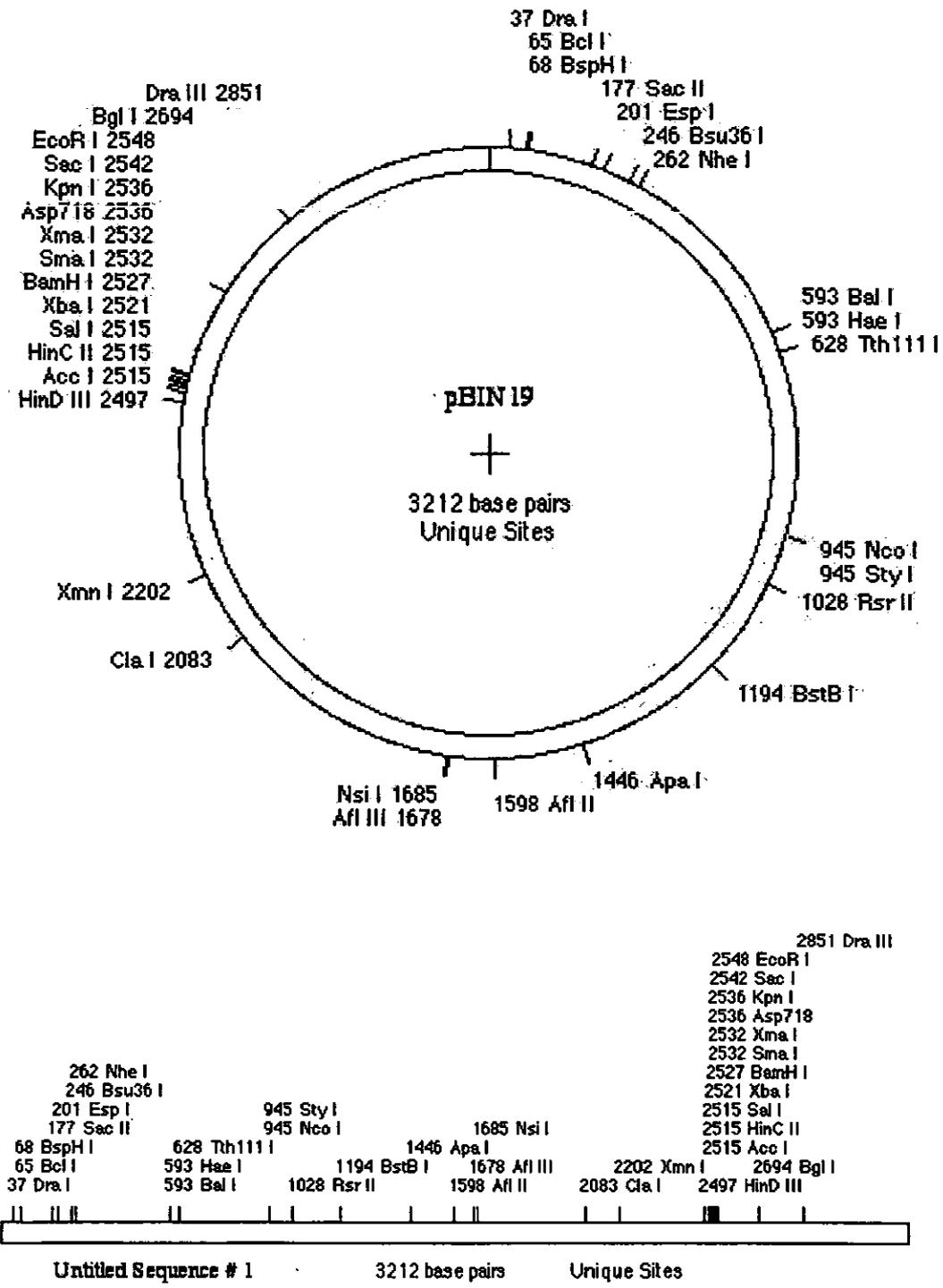
APÉNDICES



Amplificación por PCR. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su siglas en inglés), el DNA es amplificado en ciclos. En el primer ciclo se desnatura el DNA que se busca amplificar (paso 1), seguido del alineamiento de los primers en cada una de las hebras de DNA desnaturizado (paso 2). Los primers son oligonucleótidos sintéticos, complementarios a los extremos de la región que se quiere amplificar. Una combinación de nucleótidos y DNA polimerasa es agregada a la reacción, quienes se encargan de extender los primers en la dirección 3'. Esto da como resultado una molécula de DNA de doble cadena con los primers incorporados en la cadena recién sintetizada. En el segundo ciclo los productos del primer ciclo son desnaturizados obteniéndose cadenas sencillas. Los primers se alinean con estas nuevas hebras y éstas son extendidas por la polimerasa. Este ciclo se repite múltiples veces, de manera que la secuencia original de DNA es amplificada millones de veces.



Resumen de los pasos involucrados en la clonación, utilizando un plásmido como vector. Los plásmidos son aislados y digeridos con enzimas de restricción. A su vez, el DNA a clonarse se corta con la(s) misma(s) enzima(s). Los fragmentos obtenidos son religados al vector, y el plásmido recircularizado se introduce en células bacterianas para su replicación. Por lo general, los plásmidos contienen genes de resistencia a algún antibiótico, de modo que las bacterias portadoras pueden ser identificadas si se hacen crecer en un medio selectivo. Las colonias sobrevivientes son aisladas y cultivadas en un medio líquido, a partir del cual se puede recuperar el DNA plasmídico para análisis posteriores. (GenCDX).



Esquema del plásmido binario pBIN19, mostrando sitios de restricción y clonación.

Tablas . Mutantes de los genes de función 'B' en *Arabidopsis thaliana*

Secuencia de Alelos de AP3

Alelo	Mutágeno	Grado/Intensidad	Base	Mutación	Fuente/Referencia
<i>ap3-1</i>	EMS	intermedia sens. a T°	Ler	K153M 5' splice site intron 5	1-4
<i>ap3-3</i>	EMS	fuerte	Ler	Q18→stop	2
<i>ap3-4</i>	EMS	fuerte	Ler	Q7→stop	2
<i>ap3-5</i>	EMS	fuerte	Ler	Q83→stop	2
<i>ap3-6</i>	EMS	fuerte	Col	A32→P	Roger Innes-ED1503
<i>ap3-7</i>	EMS	fuerte	Col	5' splice site intron 4: GT→GA	George Redei
<i>ap3-8</i>	EMS	fuerte	<i>ap2-1</i> (Ler)	3' splice site intron 1: AG→AA	Zhongchi Liu-ZL231
<i>ap3-9</i>	EMS	fuerte	Ler	A32→V	John Alvarez-S1357
<i>ap3-10</i>	EMS	fuerte	Ler	A32→P	John Alvarez-S1359
<i>ap3-11</i>	EMS	débil	<i>ap3-1</i> - Ler	supresor intragénico <i>ap3-1</i> T→A - intron 4 - 33 bp from the 3' end of the intron - branchpoint?	5
<i>ap3-12</i>	EMS	fuerte	Ler	P60→S	Hongjun Xiang-650E1
<i>ap3-13</i>	T-DNA	fuerte	WS	T-DNA inserted in intron 6	Ioan Negrutiu-DJY12

Secuencia de Alelos de PI

Alelo	Grado/Tipo	Base	Mutación	Fuente/Referencia
<i>pi-1</i>	fuerte (conversión total p→se y est→car)	Ler	W80→stop	(Bowman <i>et al.</i> 1989; Bowman <i>et al.</i> , 1991; Hill y Lord, 1989; Goto y Meyerowitz, 1994)
<i>pi-2</i>	fuerte	Ler	S75→F	Hill y Lord, 1989
<i>pi-3</i>	fuerte	Ler	A49→V	Hill y Lord, 1989
<i>pi-4</i>	fuerte	Ler	5' splice site intron 1: GT→AT	John Alvarez-S1487
<i>pi-5</i>	intermedia conversión p→se estambres normales	<i>ap3-11</i> (Ler)	E125K	Hongjun Xiang-639E1

(Weigel, 1999).

CÉLULAS COMPETENTES DE AGROBACTERIUM

1. Inocular colonia O/N en 2 ml de YEP + antibióticos, a 28C en un agitador. ABI - 50 KAN y 25
2. Chlor, gv3 i01 - 25GEN 2. Transferir la colonia O/N 200ml YEP a un matraz de 500ml, agitar a 250rpm hasta que la D.O. sea 0.3 (4-5hrs)
3. Agitar en tubos estériles (con tapa) de 50ml a 4C 5krpm 10. Asegurarse de que las células formen una pastilla (pellet). Si no, repetir a una mayor velocidad.
4. Eliminar sobrenadante, resuspender pellet en 20ml de 1mM HEPES pH7 frío (filtrado en condiciones estériles), volver a centrifugar.
5. Repetir el paso anterior tres veces más.
6. Después de eliminar el sobrenadante, resuspender el pellet en 2ml 10% glicerol frío (filtrado en condiciones estériles).
7. Distribuir lo más pronto posible en alícuotas de 40ul en tubos estériles (en hielo previamente) congelar en LN2 y guardar a -70C.

Es posible duplicar las cantidades de este protocolo – el trabajo es casi el mismo y es posible obtener hasta 80 tubos.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *Agrobacterium* POR ELECTROPORACIÓN

Precauciones

1. Nunca cambie los niveles de potencia mientras la unidad se está cargando.
2. Mantenga la unidad en un área seca y lejos de materiales inflamables.
3. Mantenga las manos lejos de la cámara y las cubetas mientras se envían las descargas.

Preparación del DNA

El DNA debe estar libre de sales, RNA o proteínas. Si el DNA está disuelto en TE buffer, debe ser tratado con una RNasa primero y después deben realizarse dos extracciones con fenol/cloroformo. Esto removerá las proteínas y el RNA. Para remover las sales, se debe precipitar en EtOH absoluto, y lavar dos veces con etanol al 70%. Resuspender el DNA a 0.4 -1 ug/ml.

Preparando el electroporador

Hay dos tipos de cubetas, de 1 y de 2mm. La mayoría de los protocolos para *Agrobacterium* utilizan las de 2mm (Invitrogen #650009 con tapas azules).

1. Cerciórese de que esté apagada la fuente de poder.
2. Coloque el switch de Charge/Pulse en la posición de PULSE, conecte las terminales de la fuente de poder a las terminales correspondientes en la parte trasera del electroporador (de acuerdo al color). Coloque la capacidad a 50 mF y la resistencia de carga en 200W.
3. Prenda la fuente de poder. Ponga la potencia máxima, 25 W y la corriente a 25 mA. Coloque el voltaje a 1800 V. Permita que la fuente de poder se estabilice (aun en la posición de PULSE).
4. Seleccione la posición de CARGA usando el switch Charge/Pulse switch. Después de 20-30 segundos, la luz de carga comenzará a verse. Cerciórese de que el voltaje se mantenga a 1800 V.
5. Seleccione la posición de ARMED y la posición de PULSE. Después coloque la posición de DISARMED.

Electroporación

Las bacterias electrocompetentes, el medio YEP y las soluciones de DNA deben mantenerse en hielo antes de la mezcla. Nota: los siguientes pasos deben ser realizados en menos de un minuto (se deben usar guantes y lentes de protección).

1. Mezclar 1-2ml DNA (600 ng) con 40ml de células.
2. Transferir la mezcla de DNA/célula a una cubeta de hielo evitando la formación de burbujas de aire (mezcle suavemente la cubeta).
3. Seque la cubeta con una toalla de papel e insértela en la cámara con la muesca apuntando hacia usted. Cierre la tapa de la cámara.

4. Seleccione Arm/Disarm en la posición de ARM. Seleccione PULSE.
5. Cuando la luz de PULSE se apague, seleccione DISARM (una luz debe activarse) y remueva la cubeta.
6. Con la mezcla de DNA/agro aún en la cubeta, agregue 500ml de YEP frío (sin antibióticos) y mezcle la solución pipeteando suavemente.
7. Transfiera las células a un eppi e incube durante 2-4 hrs a 28C. Mantenga el electroporador en la posición de PULSE.
8. Plaquear los 200ml en YEP + antibióticos
9. Incubar a 28C; las colonias aparecerán en 2-3 días.

MINIPREP PARA Agrobacterium

Nota: las agrobacterium que se usarán para transformar deben contener al plásmido Ti.

1. Crecer las células durante toda la noche en 5 ml LB o YEP con antibióticos.

Para pMONs en ABI - 50ug/ml KAN, 50ug/ml Spec, 25ug/ml Chlor

Para pBI types en gv3101 - 50ug/ml KAN, 25ug/ml GEN

2. Transfiera 1 ml de células a uno o dos tubos de microcentrifuga.

3. Centrifugar 45 sec y remueva el sobrenadante mediante aspiración.

4. Agregar 1 ml más de células a ambos tubos y repita el paso 3.

5. Agitar el pellet (vortex), agregar 100 µl de solución MPS1, agitar de nuevo e incubar los tubos a temperatura ambiente por 5 min.

6. Agregar 20 µl of a 20 mg/ml lysozyme solution, agitar y centrifugar 1 sec e incubar 15 min a 37C.

7. Agregar 200 µl de solución MPS2 (recién hecha), mezclar suavemente por inversión (3-4 veces) e incubar 5 min en hielo.

8. Agregar 50 µl MPS3, vortex por al menos 10 sec e incubar 5 min en hielo.

9. Centrifugar por 5 min y traspasar el sobrenadante a tubos nuevos.

10. Agregar 400 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), agitar, centrifugar por 5 min y traspasar el sobrenadante a tubos nuevos. Repita este paso.

11. Repetir el paso 10 pero únicamente con cloroformo.

12. Agregar 300 µl isopropanol e incubar en hielo por 10 min

13. Centrifugar por 5 min y lavar el pellet con 70 % EtOH

15. Secar el pellet y resuspender ambos tubos en un total de 50 µl TE-buffer+RNase, usar 2µl para el PCR, congelar el resto.

SELECCIÓN CON KANAMICINA

Esterilización de semillas:

1. Colocar las semillas en tubos falcon de 15ml (aprox 700 semillas/tubo, es posible estimar la cantidad de semillas distribuyéndolas en un cuadrado de 9x9 cm dibujado en un papel).
2. Agregar agua, agitar, y esperar 10min-1/2 hora. Este paso permitirá que las semillas absorban agua, se hinchen y queden libres de arrugas y pliegues que puedan alojar bacterias u hongos.
3. Decantar. Agregar 10 ml de Etanol absoluto. Agitar vigorosamente, y desechar inmediatamente.
4. Agregar 10 mL de una solución de hipoclorito (5%) y SDS (20%). Agitar los tubos durante 10 min.
5. Remover esta solución y agregar agua destilada estéril . Repetir hasta haber realizado de 5 a 8 lavados, y que no se haga espuma al agitar. Resuspender las semillas en 10 ml de TC agar al 0.1% .

Las semillas esterilizadas pueden ponerse a vernalizar a 4°C durante 2-4 días. Alternativamente, este paso puede realizarse luego de la siembra.

Siembra en placas de selección

Todos los pasos deben realizarse en condiciones extremas de esterilidad (campana de flujo laminar, mechero(s), guantes lavados con etanol al 70% y tapabocas.

1. Distribuir las semillas en las cajas de selección (MS+Kan). Esto puede hacerse con pipetas de 1mL, o de 200uL con la punta cortada. Colocar cajas en una campana de flujo laminar hasta que la superficie del agar esté completamente solidificada y seca.
2. Colocar cajas a 4°C durante dos noches (ver protocolo anterior). Transferirlas a la cámara de crecimiento (a 20-24°C con iluminación continua).
3. Los transformantes deben ser identificables después de aproximadamente 7 días. Se deben observar plántulas de color verde oscuro con foliación secundaria y raíces que se extiendan en el medio selectivo. El crecimiento de la raíz es la característica más clara de los transformantes en estadios tempranos. Transferir a tierra.
4. Para confirmar que los transformantes son positivos, se deben transferir a una caja nueva de MS+Kan y dejarse allí por un par de días (si se ponen amarillas son positivos falsos). Si hay posibilidades de contaminación en este paso, las semillas se deben transferir a tierra los más pronto posible.
5. Las plantas deben crecer lo suficiente como para obtener semillas, coleccionar las semillas es el último paso de esta sección.

Medio de Infiltración

- 1/2 x sales Murashige y Skoog (SIGMA #5524)
- 1X vitaminas B5 (ml de un stock 1000x) (SIGMA; #G-2519). El stock 1000x se prepara con el polvo vitamínico de Gamborg (disolver 11.2g en 100ml de agua).
sucrosa 5%
- ajustar a un pH 5.7 antes de autoclavar.

Después de autoclavar, agregar: BenzilAminoPurina (BAP), 10 µl por litro de un stock 1 mg/ml en DMSO. Si se agrega la hormona inmediatamente antes de usarse, se puede conservar el medio de infiltración hasta una semana antes de infiltrar. Es recomendable agregar *silwet* al 0.01% al medio de infiltración para incrementar la eficacia de transformación, particularmente para los ecotipos *Landsberg* y *Columbia*. (*silwet* se obtiene de semillas de LEHLE #cat VIS-01 VAC-IN-STUFF (silwet L-77))

Cajas de selección:

- sales 1x Murashige y Skoog
- sacarosa 1%
- ajustar el pH a 5.7 con 1M KOH.
- agar Difco al 0.8% (8g/L)

esterilizar en autoclave, enfriar y agregar:

- vitaminas 1x MS (SIGMA #M-7150). 1ml del stock 1000x (disolver 10.3gr en 100ml de agua).
- antibiotico (kanamicina 50mg/L, o Gentamicina 50mg/L).

Medio YEP (liquido):

- 10 g /l Bacto peptona/triptona ó Triptona de Caseína (Difco)
- 10 g/l extracto de levadura (Difco)
- 5 g /l NaCl

Para cajas YEP agregar 15gr/l de agar Difco bacto.

Solución de hipoclorito:

aforar a 50 ml:

- 4ml Na Hipoclorito al 15%
- 255l Tween-20

Ligaciones utilizando los vectores fáciles (Easy Vectors)

A. Protocolo

1. Centrifugar brevemente los vectores fáciles pGEM -T o pGEM -T Vector Fácil y los tubos de Control para Inserción Control de DNA (Control Insert DNA) para colectar los contenidos del fondo del tubo.
2. Organizar las reacciones de ligación como se describe a continuación. Nota: Utilizar tubo de 5.0 ml que se conocen por tener una baja capacidad para ligar al DNA (DNA-binding) (e.g., Sarstedt Cat. # 72687005).

	Reacción Estándar	Control Positivo	Control de Respaldo
Ligasa DNA T4 con Regulador (Buffer) 10 X	1µl	1µl	1µl
pGEM -T o pGEM -T Vector Fácil (50ng)	1µl	1µl	1µl
producto PCR	Xµl*	--	--
Inserción Control de DNA	--	2µl	--
Ligasa DNA T4 (3 unidades de Weiss/ l)	<u>1µl</u>	<u>1µl</u>	<u>1µl</u>
agua deionizada a un volumen final de	10µl	10µl	10µl

*La proporción molar del vector producto PCR puede requerir de optimización.

3. Mezclar las reaccion, pipeteando. Incubar las reacciones durante la noche a 4°C.

Notas:

1. Los fabricantes recomiendan el uso exclusivo de ligasa T4 Promega, incluido en el Kit de pGEM. Otras preparaciones comerciales de T4 ligasa pueden contener actividades de exonucleasa que pueden remover las timidinas terminales del vector.
2. La ligasa DNA T4 con Regulador (Buffer) 10 X contiene ATP que se degrada durante fluctuaciones de temperatura. Se deben evitar descongelamientos múltiples al hacer uso simple de alicuotas en el regulador (buffer).
3. Si se presenta un precipitado en la Ligasa DNA T4 con Regulador 10 X descongelada, revuelva el regulador (buffer) hasta que el precipitado se convierta en solución. (Puede ser de utilidad entibiar la solución frotando el tubo entre los dedos antes de revolver).
4. Las ligaciones a bajas temperaturas son necesarias para lograr endurecer las bases sobresalientes simples (single-base overhangs). Temperaturas de ligación por encima de los 15°C pueden reducir significativamente el número de recombinantes. La experiencia ha mostrado que las ligaciones incubadas a temperaturas mayores de 15°C dan lugar a un fondo alto de colonias azules resultando de la optimización de las ligaciones "blunt-end" de los vectores T-sin cola.
5. Tiempos de incubación más cortos (mínimo de tres horas a temperatura ambiente) pueden ser utilizados, pero pueden resultar en número menor de colonias.

Transformaciones Utilizando el pGEM -T y el pGEM -T Vectores Fáciles de las Reacciones de Ligación (Easy Vector Ligation Reactions)

Utilizar células competentes de alta eficiencia (1×10^8 cfu/ μ g DNA) para transformaciones. La ligación de fragmentos con una base sobresaliente (single-base overhang) puede ser ineficiente, así es que resulta esencial utilizar células con una eficiencia de transformación de 1×10^8 cfu/ μ g DNA (o mayor) para obtener un número razonable de colonias.

Se recomienda el uso de Células Competentes de Alta Eficiencia JM 109 (# de catálogo L2001); estas son proporcionadas junto con el pGEM -T y los Sistemas II pGEM -T Vectores Fáciles (Easy Vector Systems II) Otras razas hospederas (huéspedes) pueden ser utilizadas pero ellas deben ser compatibles con el tamizado a partir de colores azul/blanco selección por color (colonias azules y blancas) y la selección con ampicilina estándar.

A. Protocolo

Re agentes a ser Proporcionados por el Usuario
(Composiciones de Solución se proporcionan en otra sección)

- Placas ó láminas LB con ampicilina/PTG/X-Gal
 - Medio SOC
1. Preparar 2 láminas con LB/ampicilina/PTG/X-Gal para cada reacción de ligación (reacciones de ligación) más dos láminas para determinar la eficiencia de transformación. Equilibrar las láminas a temperatura ambiente antes de blindar (plaqueo) (paso 10).
 2. Centrifugar los tubos que contienen las reacciones de ligación (reacciones de ligación para colectar los contenidos al fondo del tubo. Adicionar 2 μ l de cada reacción de ligación a: (a) un tubo ó tubos estériles de microcentrifugado de 1.5 ml en hielo (ver nota 1). Preparar otro tubo en hielo con 0.1ng de plásmido sin cortar para determinación de la eficiencia de transformación de células competentes (plásmido sin cortar, para determinación de la eficiencia de transformación de las células competentes).
 - 3.
 4. Remover el ó los tubos de Células Competentes de Alta Eficiencia del tipo JM109 (JM109 High Efficiency Competent Cells) de su almacenamiento a -70°C de temperatura y colocarlos en un baño de hielo hasta el punto de descongelación (aproximadamente 5 minutos). Mezclar las células agitando suavemente el tubo.
 5. Transferir **cuidadosamente** 50 μ l de células en cada tubo preparado en el paso 2 (100 μ l de células para determinación de la eficiencia de transformación). Evitar el pipeteado excesivo ya que las células son muy frágiles.
 6. Suavemente agite los tubos para mezclar y colóquelos en hielo por 20 minutos.
 7. Caliente súbitamente (heat shock) las células por 45-50 segundos en un baño de agua a 42°C exactamente (SIN AGITAR).

8. Devolver inmediatamente los tubos al hielo por 2 minutos.
9. Agregar 990µl the medio SOC a temperatura ambiente a los tubos que contienen las células transformadas con reacciones de ligación y 900µl de lo mismo al tubo que contiene las células transformadas con plasmido sin cortar (uncut plasmid) (caldo LB puede ser sustituido pero el número de colonias puede ser menor).
10. Incubar por 1.5 horas a 37°C agitando (aproximadamente a 150rpm).
11. Barnice (plate) 100ml de cada cultivo de transformación en dos láminas con antibiótico.
12. Incubar las láminas durante la noche (16-24 horas) a 37°C. Aproximadamente 100 colonias por lámina pueden ser observadas cuando se utilizan las células competentes que tienen un eficiencia de transformación de 1×10^8 cfu/µg DNA, si 100ml son barnizados (plated). Incubaciones más largas o almacenamiento de las láminas a 4°C (después de una incubación durante la noche a 37°C) pueden ser utilizadas para facilitar el tamizado azul/blanco (blue/white screening). Colonias blancas generalmente contienen inserciones; sin embargo, las inserciones también pueden estar presentes en las colonias azules.

Notas:

1. Se recomienda usar tubos de polipropileno largos (17 x 100mm) (ver catálogo Falcon #2059) ya que se ha comprobado que aumentan la eficiencia de transformación. Tubos de algunos fabricantes pueden unir (bind) el DNA y por lo tanto causar una disminución en el número de colonias. Esto debe ser evitado.
2. Colonias que contienen actividad β -galactosidasa pueden crecer relativamente muy poco en relación con células que no contienen esta actividad. Después del crecimiento durante la noche, las colonias azules pueden ser más pequeñas que las blancas, que miden aproximadamente un milímetro de diámetro.

Fatal Flaws in Food Safety Assessment: Critique of The Joint FAO/WHO Biotechnology and Food Safety Report

Mae-Wan Ho
Biology Department
Open University
Walton Hall, Milton Keynes MK7 6AA U.K.

Ricarda A. Steinbrecher
Scientific Advisor
Women Environmental Network U.K.

*This paper was commissioned by the Third World Network, 228 Macalister Road, 10400, Penang, Malaysia. Fax. 60-4-2264505.

Contents

Summary

1. Introduction
2. Biased partisan claims for the technology
3. Failure to take responsibility for major aspects of food safety
 - 3.1 Environmental impacts
 - 3.2 Production of pharmaceuticals and industrial chemicals in food
 - 3.3 Labelling and monitoring
4. Restriction of scope exempts known hazards from safety assessment
5. Erroneous claim that genetic engineering is the same as conventional breeding
 - 5.1 New hazards are inherent to genetic engineering biotechnology
6. The principle of substantial equivalence is unscientific and arbitrary

6.1 The principle is intentionally vague and ill-defined to be as flexible, malleable and open to interpretation as possible

6.2 Comparisons are designed to conceal significant changes

6.3 The principle is weak and misleading even when it does not apply, effectively giving producers carte blanche

6.4 Insufficiency of background information for assessing substantial equivalence

6.5 There is no specification of tests for establishing substantial equivalence

6.6 There is no requirement to test for unintended effects, current tests are undiscerning and may even conceal unintended effects

6.7 The spread of antibiotic resistance marker genes by horizontal gene transfer is downplayed, by ignoring scientific evidence

6.8 There is no consideration of unintended gene transfers in the general environment

7. Failure to take existing scientific evidence into account

7.1 The instability of transgenes and transgenic lines

7.2 The prevalence and scope of horizontal gene transfer in all environments including the gastrointestinal tract

7.3 DNA is not readily degraded in the environment

7.4 Transgenic bacteria, even those that are "biologically crippled" may survive and multiply in the environment

7.5 Horizontal gene transfer is now known to be responsible for spreading antibiotic resistance and virulence among pathogens

7.6 The ability of viral DNA to survive digestion in the gut

7.7 The ability of recombinant vectors to invade mammalian cells

7.8 Recombination between viral transgenes and viruses generates superinfectious viruses

8. A "safety assessment" designed to expedite product approval with little or no real regard for safety

9. Recommendations

Summary

The Food Safety Report issued jointly by the Food and Agricultural Organization (FAO) and World Health Organization (WHO) is the result of an Expert Consultation held in Rome October 1996. The Consultation was the latest, possibly the most significant attempt to reach international agreement on GE food safety. If accepted, it will set international safety standards by WHO's Codex Alimentarius Commission, which will determine, not only GE food safety, but also world trade of GE foods. It will be illegal for any country to ban GE food imports, so long as the Codex considers them safe.

The FAO/WHO Report **shows up the glaring inadequacies in safety regulation of GE foods**, designed to expedite product approval with little or no regard for biosafety. It is a case of "**don't need - don't look - don't see**", effectively giving producers carte blanche to do as they please, while serving to diffuse and allay legitimate public fears and oppositions.

The "**principle of substantial equivalence**" (SE), on which all safety assessment is based, is completely unscientific and arbitrary. A GE product assessed to be SE is regarded as safe and fit for human consumption. But the principle is vague, ill-defined, flexible, malleable and open to interpretation. "Substantially equivalence" does not mean equivalence to the unengineered plant or animal variety. The GE food could be compared to any and all varieties within the species. It could have the worst characteristics of all the varieties and still be considered SE. A GE product could even be compared to a product from a totally unrelated species. Worse still, there are no defined tests that products have to go through to establish SE. The tests are so indiscriminating that unintended changes, such as toxins and allergens could easily escape detection. A GE potato, grossly altered, with deformed tubers, was nevertheless tested and passed as SE.

The Consultation explicitly failed to assume responsibility for major areas of GE food safety, such as **labelling and monitoring; impacts on biodiversity; and the control of traditional food crops engineered to produce pharmaceuticals and industrial chemicals**. The latter will readily cross-pollinate with unmodified food plants and contaminate global food supply for years to come. Also left out are pesticide residues in food crops engineered to be resistant to herbicides, hormone residues and veterinary drugs in milk from cows fed GE bovine growth hormone (BST milk) which have to be treated for stress and infections.

Much more serious is a **list of gruesome products that will appear on our dinner table**, if the Report goes unchallenged: a range of "transgenic wastes" from GE plant residues after engineered industrial chemicals and pharmaceuticals have been extracted,

meat from failed GE experimental animals or from animals engineered to produce drugs and human proteins in their milk (e.g. Tracy, the transgenic sheep), meat from pigs engineered with human genes for organ transplants, and crops sprayed with insecticidal GE baculovirus. Baculovirus is simultaneously engineered by medical geneticists to transfer genes into human liver cells because the virus is particularly good at invading those cells.

The possibility of new viruses being generated, and of genes jumping (horizontally) across species barriers, as the result of GE biotechnology itself, are real, especially in the light of recent scientific findings. The FAO/WHO Report ignores those findings, and sidesteps the whole issue by still maintaining that there is no difference between genetic engineering and conventional breeding methods. The Report is openly partisan to the technology, making unsubstantiated claims for its benefits while omitting to mention the socioenomic impacts on small farmers, and the viable alternatives to the technology in all forms of sustainable agriculture already practiced worldwide.

Recommendations

In view of the gross inadequacies in food safety regulation and the scientific evidence pointing to serious hazards, we recommend a number of measures to safeguard the health of consumers and to protect biodiversity. The precautionary principle also demands that a moratorium on further releases should be imposed until those measures are implemented.

1. No food crops are to be engineered for producing pharmaceuticals and industrial chemicals, as the engineered crops could be mistaken for food, or cross-pollinate with non-engineered food crops. The onus must be on the producer to prove that any plant genetically engineered is not a food crop.
2. All projects involving genetic manipulation of baculovirus for insecticidal purposes should be discontinued, as this virus is being used in human gene therapy and invades human liver cells readily.
3. Complete characterization of inserted gene sequence(s) of the GE organism (GEO) must be provided in the application for market approval. This should include any antibiotic marker gene(s), promoter(s) and enhancer(s) and their effects on the expression of neighbouring genes. The presence of mobile genetic elements and other proviral sequences in the host genome likely to contribute to secondary mobility of inserts must also be stated.
4. No GEOs with uncharacterized foreign gene inserts are to be considered for release. No parts of such GEOs, nor of animals from failed GE experiments or xenotransplant animals are to be used as human food or animal feed.
5. No GEOs containing antibiotic resistant genes are to be considered for release or to be used as human food or animal feed.
6. A detailed record of the stability of the GEO over at least five successive generations of field conditions (including drought and heat) is a precondition for market approval.

(Field conditions does not mean open field conditions). This must be supported by appropriate data indicating the stability of the insert as well as the level of gene expression under different conditions in successive generations.

7. Data on the frequency of unintended gene transfers, including horizontal gene transfer from the GEO under field conditions, must be included in application for market approval.

8. Data on the frequency of horizontal gene transfer from GEO to gut bacteria must be included in applications for market approval.

9. Data on the ability of transgenes and marker genes in the GEO to invade mammalian cells must be included in applications for market approval.

10. A specified set of tests must be carried out to establish "substantial equivalence", which are sufficiently discerning to reveal unintended as well as intended effects. The comparator must be the unmodified recipient organism itself, and results of repeated tests must be provided to support the stability of the characteristics over at least five successive generations.

11. Safety assessment must include the GEO's potential to generate pathogens through genetic recombination.

12. Safety assessment must include pesticide residues where they are integral components of the product, as in herbicide-resistant transgenic plants.

13. Product segregation, labelling and post-market monitoring are non-negotiable conditions for market approval.

LITERATURA CONSULTADA

- Angenent GC, Busscher M, Franken J, Dons HJM y AJ van Tunen. 1992. Differential expression of two MADS box genes in wild-type and mutant petunia flowers. *Plant Cell* **4**, 983-993
- Baum, DA. 1998. The evolution of plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **1**:79-86.
- Birch, RG. 1997. PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 297-326.
- Bomblies K, Dagenais N, y D. Weigel. 1999. Redundant enhancers mediate transcriptional repression of AGAMOUS by APETALA2. *Dev. Biol.* **216**: 260-264.
- Bolker J y R Raff. 1996. Developmental genetics and traditional homology. *Bioessays* **18(6)**: 489-494.
- Bowman JL, Smyth DR y EM Meyerowitz. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**: 1-20.
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, y E. Coen. 1997. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* **275**: 80-83.
- Charlesworth D y PM Gilmartin. 1998. Lily or Billy- Y the difference? *Trends in Genetics* **14 (7)**: 261-262.
- Coen E. y EM Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling floral development.
- Coen, E. 1999. **The Art of Genes: How Organisms Make Themselves**. Oxford University Press. Oxford, 386 pp.
- Darwin, C 1859. **The Origin of Species**. in: Darwin. 1979.
- De Beer, G. 1971. *Homology, an unsolved problem*. In: **Evolution**. M Ridley, ed. 1997. Oxford Univ. Press. Oxford. p. 213-221.
- Dellaporta S. y A. Calderón-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* **5**: 1241-1251.
- Goethe, JW (1790-trad. inglesa de A. Arber, 1946. Goethe's Botany: The Metamorphosis of Plants. *Chronica Botanica* **10**: 90-107. (Incluye ensayos sobre Zoología -*Osteologie*, 1819- y Botánica comparada -*Ueber die Spiraltendenz der Vegetation*' in the *Morphologic und Metamorphose* tomados de *Werke* (1867)).
- Gregg, KB. 1975. The effect of light intensity on sex expression in species of *Chycnoches* and *Catasetum* (Orchidaceae). *Selbyana* **1**: 101-113.
- Guilley H., Dudley, RK., Jonard G., Balazs E., y KB Richards, 1982. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA; Detection of promoter sequences and characterization of transcripts. *Cell* **30**: 763-773.

- Howe, C. 1995. **Gene Cloning and Manipulation**. Cambridge University Press. N. York. 210 pp.
- Irish VF y Yamamoto YT. 1995. Conservation of floral homeotic gene function between *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell* **7**: 1635-1644.
- Jack, T, Brockman, LL and Meyerowitz, EM (1992) The homeotic gene APETALA3 of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* **68**: 683-697.
- Jack, T, Fox, GL and Meyerowitz EM (1994) *Arabidopsis* homeotic gene APETALA3 ectopic expression: transcriptional and post-transcriptional regulation determine floral organ identity. *Cell* **76**: 703-716.
- Koukolíková-Nicola, Raineri D, Stephens K, Ramos C, Tinland B., Nester EW y B Hohn. 1993. Genetic Analysis of the *virD* Operon of *Agrobacterium tumefaciens*: a Search for Functions Involved in Transport of T-DNA into the Plant Cell Nucleus and in T-DNA Integration. *J. Of Bacteriology*. Feb **93**: 723-731.
- Kramer EM y VF Irish. 1999. Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature* **399**: 144-148.
- Krizek, BA y EM Meyerowitz. 1996. The *Arabidopsis* homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide class B organ identity function. *Development* **112**: 11-22
- Lawton-Rauh AL, Alvarez-Buylla ER y MD Purugganan. 2000. Molecular evolution of flower development. *TREE* **15** (4): 144-149.
- Li W-H. 1997. **Molecular Evolution**. Sinauer. Sunderland, MA. 487 pp.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P y J. Darnell. 1995. **Molecular Cell Biology 3^a ed.** Scientific American Books. 1344+ pp.
- Ma, H. 1994. The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes & Dev.* **8**: 745-756.
- Márquez-Guzmán, J., M. Engleman, A. Martínez-Mena, E. Martínez y CH Ramos. 1989. Anatomía Reproductiva de *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae). *Ann Missouri Bot. Gard.* **76**: 128-135.
- Martin, C. 1996. **Transcription factors and the manipulation of plant traits.** *Current Opinion in Biotechnology* **7**:130-138.
- Martínez E y CH Ramos. 1989. Lacandoniaceae (Triuridales): Una nueva familia de México. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **76**: 128-135.
- Mayr, E. 1982. **The Growth of biological Thought. Diversity, Evolution and Inheritance.** Belknap Press. Cambridge. 974 pp.
- McBride, KE y KR Summerfelt 1990. Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **14**: 269-276.

- Mena M, Ambrose BA, Meeley RB, Briggs SP, Yanofsky MF y RJ Schmidt. 1996. Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science* **274**: 1537-1540.
- Mendoza L y ER Alvarez-Buylla. 1998. Dynamics of the genetic regulatory network for *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. *J. theor Biol.* **193**: 307-319.
- Okamoto H., Yano, A., Shirashi, H., Okada, K. y Y. Shimura. 1994. Genetic Complementation of a floral homeotic mutation, *apetala3*, with an *Arabidopsis thaliana* gene homologous to DEFICIENS of *Antirrhinum majus*. *Plant Mol. Biol.* **26**: 465-472.
- Okamuro, JK, den Boer BGW, y KD Jofuku. 1993. Regulation of *Arabidopsis* Flower Development. *Plant Cell* **5**: 1183-1193.
- Parcy F, Nilsson O, Busch MA, Lee I, y D Weigel. 1998. A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**(6702- Oct. 8): 561-6
- Purugganan, MD. 1997. The MADS-box floral homeotic gene lineages predate the origin of seed plants: phylogenetic and molecular clock estimates. *J. Mol. Evol.* **45**: 392-396.
- Riechmann JL y EM Meyerowitz. 1997. MADS domain proteins in plant development. *J. Biol Chem.* **378**: 1079-1101.
- Sablowski RWM y EM Meyerowitz. 1998. A Homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral holmeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* **92**: 93-103.
- Samac DA. 2000 Promoters for Constitutive and tissue-specific expression of transgenes in *Alfalfa* <http://www.naaic.org/TAG/TAGpapers/samac/samac.html>).
- Samach A., Kohalmi SE, Motte P, Datla R, y GW Haughn. 1997. Divergence of function and regulation of Class B floral organ identity genes. *Plant Cell* **9**: 559-570.
- Shimeld, SM. 1999. Gene function, gene networks and the fate of duplicated genes. *Cell & Developmental Biology* **10**: 549-593.
- Stachel SE y EW Nester. 1986. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* **5**: 1445-54.
- Tilly JJ, DW Allen y T Jack. 1998. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects. *Development* **125**. 1647-1657.
- Vergara-Silva, FR. 2000. Patrones de expresión de genes reguladores de la morfogénesis de la flor en *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: Triuridales). Tesis doctoral. Instituto de Ecología, UNAM. México.
- Vergara F, Ferrándiz C, Meyerowitz E y ER Alvarez-Buylla. 1999. Molecular basis and evolution of the inside-out flower of *Lacandonia schismatica*. *Presentación 15.13.2, XVI International Botanical Congress*. St Louis, USA.
- Wagner, G. 1989. The biological homology concept. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **20**: 51-69.

Weigel, D. *et al.* 1999. Lab web page:
<http://www.salk.edu/LABS/pbio-w/patterning.html>

Wray GA y E Abouheif. 1998. When is homology not homology? *Curr. Op. in Genetics and Development* **8**: 675-680.

Yanofsky, M *et al.* 1999. Lab web page:
<http://www-biology.ucsd.edu/others/yanofsky/mads/mads-new.htm>

Yu D, Kotilainen M, Pöllänen E, Mehto M, Elomaa P, Helariutta Y, Albert VA y TH Teeri. 1999. Organ identity genes and modified pattern of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J.* **17**(1): 51-62.